

**ВЕРХОВСКАЯ Анна Евгеньевна**

**РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ВАКЦИН КОМБОВАК-Р И КОМБОВАК-К**

**16.00.03 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология"**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



Владимир – 2008

Работа выполнена в Научно-производственном объединении «НАР-ВАК», г Москва

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Алипер Тарас Иванович**

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук  
**Герасимов Виктор Николаевич,**  
ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир

доктор биологических наук, профессор  
**Кузнецов Дмитрий Павлович,**  
ОАО «Покровский завод биопрепаратов»,  
Владимирская обл , Петушинский р-н,  
п Вольгинский

**Ведущая организация:** ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им ЯР Коваленко

Защита диссертации состоится 24 июня 2008г в 10 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 220 015 01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу 600901, г Владимир, мкр Юрьевец, ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Автореферат разослан «22» мая 2008 г

Ученый секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник



Г М Семенова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность темы.* Респираторные и желудочно-кишечные болезни молодняка крупного рогатого скота остаются одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии животных в большинстве стран мира, включая Россию. В большинстве случаев эти заболевания имеют полиэтиологическую структуру, проявляются тяжелыми патологическими процессами и наносят значительный ущерб животноводству. Ведущая роль в этиологии респираторных болезней крупного рогатого скота принадлежит вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), респираторно-синцитиальному, рео-, рино- и аденовирусам (Сюрин В Н с соавт, 1998, Мищенко В А с соавт, 2000, и др). Вирус диареи крупного рогатого скота, рота- (РВ) и коронавирусы (КВ) являются наиболее важными вирусными агентами, участвующими в развитии патологического процесса при желудочно-кишечных заболеваниях у телят (Гоголев М М с соавт, 1989, Соколова Н Л, 1993, Жидков С А, 1994, Сатторов И Т, 1995 и др). Гибель животных от вирусных инфекций наблюдают, как правило, при осложнении их вторичной бактериальной микрофлорой (Высокопоясный А И с соавт, 1999, Гуненков В В с соавт, 2002 и др.)

В животноводческих хозяйствах РФ все вышеперечисленные возбудители распространены практически повсеместно, вызывая появление смешанных инфекций с многообразием форм клинического проявления, что в значительной степени затрудняет их диагностику, терапию и иммунопрофилактику (Жоромыслов Г Ф с соавт, 1984, Сисягин П Н с соавт, 2002, Глотов А Г с соавт, 2002, К П Юров с соавт, 2003; Белова Н Б с соавт, 2003, Шегидевич Э А с соавт, 2003, Соколова Н Л, 2003 и др). При смешанных инфекциях трудно определить ведущую роль того или иного инфекционного агента, поэтому наиболее эффективным средством профилактики таких болезней являются комбинированные (многокомпонентные) вакцины, включающие как вирусные, так и бактериальные антигены (Harkness J W et al, 1985, Pospisil Z et al, 1996, Van Oirschot J T, 1999, Hamers C et al, 2000 и др.) В

связи с этим поиск новых вакцинных препаратов, совершенствование схем и методов их применения, использование средств терапии и иммунокоррекции для профилактики респираторных и желудочно-кишечных заболеваний у телят остается актуальной проблемой ветеринарной науки и практики

В НПО «НАРВАК» (г Москва) с 1996 г выпускается комбинированная инактивированная вакцина КОМБОВАК, предназначенная для специфической профилактики шести основных вирусных болезней крупного рогатого скота (Сергеев В А, Непоклонов А Е, Алипер Т И, Патент РФ на изобретение № 2261111 от 08 04 2004) Однако в ряде животноводческих хозяйств наблюдаются преимущественно респираторные или желудочно-кишечные болезни телят В связи с этим нами были предложены два новых варианта вакцины для профилактики смешанных вирусно-бактериальных инфекций телят различной системной направленности

**Цель работы.** Разработка и оценка эффективности вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К, предназначенных для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и пастереллеза (КОМБОВАК-Р) и вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекции и эшерихиоза телят (КОМБОВАК-К).

---

**Основные задачи исследований:**

1 Изучить эпизоотическую ситуацию по респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям у телят в ряде животноводческих хозяйств Московской области

2 Разработать схему изготовления инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К и методы биологического контроля вирусных компонентов, входящих в их состав Для этого оценить специфичность производственных штаммов вирусов, получить моноспецифические гипериммунные антисыворотки, определить режим инактивации вирусов и подобрать концентрацию адьюванта в вакцине

3 В опытах на лабораторных животных определить безвредность и антигенную активность вирусных компонентов вакцин КОМБОВАК-Р и КОМ-

БОВАК-К, а также сохранность их антигенной активности при хранении

4 Изучить гуморальный иммунный ответ у крупного рогатого скота на введение препаратов КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К. Определить оптимальную иммунизирующую дозу вакцин и схему их применения. Оценить эффективность вакцинации глубокостельных коров и ее влияние на формирование колюстрального иммунитета у потомства

5 Провести оценку эффективности вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К в животноводческих хозяйствах, неблагополучных по респираторным и желудочно-кишечным болезням телят

**Научная новизна работы** Разработаны два новых вакцинных препарата против основных респираторных и желудочно-кишечных болезней телят, различающихся по антигенному составу с учетом этиологической структуры и системной направленности, и предназначенных для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и пастереллеза (вакцина КОМБОВАК-Р), вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекций и эшерихиоза телят (вакцина КОМБОВАК-К). Показано отсутствие интерференции между вирусными и бактериальными компонентами вакцин

**Практическая значимость исследований.** Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К. Экспериментально установлена иммунизирующая доза препаратов, показана их эффективность и возможность оценки на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Показана высокая иммуногенная активность вакцинных препаратов для стельных коров и формирование колюстрального иммунитета у телят. Установлено, что в экспериментальных и производственных условиях вакцинация предлагаемыми препаратами обеспечивает выраженный протективный эффект, значительно снижая показатели заболеваемости и смертности телят

Указанные препараты производятся в НПО «НАРВАК» (г Москва) и применяются в соответствии с нормативной документацией, утвержденной в

установленном порядке

***Основные положения, выносимые на защиту***

- схема изготовления вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К и методы биологического контроля их вирусных компонентов,
- результаты исследований по изучению антигенных свойств вирусных компонентов, входящих в состав вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К, на лабораторных и естественно-восприимчивых животных,
- эффективность применения разработанных вакцин в качестве средств специфической профилактики респираторных и желудочно-кишечных болезней телят в производственных условиях

***Апробация работы.*** Материалы диссертации были доложены и опубликованы в материалах Международной научной конференции «Актуальные проблемы патологии животных, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» (г Владимир, 2003), на семинарах и конференциях ветеринарных специалистов (г Уфа, 2004, г Краснодар, 2004, г Казань, 2004), научно-производственных совещаниях сотрудников НПО «НАРВАК» (2003 – 2007 гг )

***Публикации.*** По материалам диссертации опубликованы 5 научных работ, в том числе две работы в издании, рекомендованном ВАК РФ

***Личный вклад соискателя.*** Работа выполнена соискателем самостоятельно. В выполнении отдельных этапов работы принимали участие д б н Т В Гребенникова (раздел 2 2 1), к б н В В Цибезов (раздел 2 2 1), д в н МК Пирожков (раздел 2 2 7), ветеринарный врач А И Кузнецова (раздел 2 3) Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи в организации и проведении исследований научному руководителю д б н Т И Алиперу и сотрудникам НПО «НАРВАК», Института вирусологии им Д И Ивановского, ФГУ «ВГНКИ»

***Объем и структура диссертации.*** Диссертационная работа изложена на 135 стр машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка

литературы и приложения Материалы диссертации иллюстрированы 24 таблицами и 16 рисунками Список литературы включает 190 источников (67 отечественных и 123 зарубежных авторов)

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** В работе использовали следующие вакцинные штаммы штамм В-25 вируса ИРТ, штамм В-19 вируса ПГ-3, штамм СТ-89 вируса ВД, штамм К-88 ротавируса и штамм КВ-90 коронавируса крупного рогатого скота

**Бактерии.** В качестве бактериального компонента для вакцины КОМ-БОВАК-Р использовали концентрат культур *P multocida* (серогруппы А, В, D) и *Paetolytica* Для вакцины КОМБОВАК-К использовали концентрат культуры *E coli*, содержащий соматические (O9, O78, O115), капсульные полисахаридные (K80, K30) и адгезивные антигены (K 99, F-41)

**Культивирование вирусов.** Вирусы ИРТ, ВД, КВ и РВ выращивали в перевиваемой культуре клеток МДВК, вирус ПГ-3 – в перевиваемой культуре клеток ЛЭК Для культивирования рота- и коронавируса в поддерживающую среду добавляли трипсин в концентрации 5 мг/см<sup>3</sup> среды Накопление вирусов в культуре клеток оценивали по цитопатическому эффекту, вирус ПГ-3 также по гемагглютинирующей активности с использованием эритроцитов морской свинки Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>

**Инактивация вирусов.** Для инактивации вирусов использовали формалин, содержащий не менее 37% формальдегида Полноту инактивации вирусов оценивали по отсутствию их размножения в чувствительной культуре клеток в течение четырех пассажей

**Референтные антисыворотки.** В исследованиях использовали моноспецифические референтные антисыворотки к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, рота- и коронавирусам крупного рогатого скота, полученные из Центральной ветеринарной лаборатории, Вейбридж, Великобритания

**Гипериммунные антисыворотки.** Получение моноспецифических гипериммунных антисывороток к вирусам ИРТ, ПГ-3 и ВД крупного рогатого скота проводили по разработанной схеме

**Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлонни (РДП).** Применяли для определения активности и специфичности антигена вируса ИРТ. При постановке реакции использовали 1%-ный гель агарозы на 0,01 М трис-НСI буфере, рН 8,0

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Для идентификации вируса ВД в биологическом материале была использована «Тест-система для обнаружения вируса диареи крупного рогатого скота методом ПЦР» (НПО НАР-ВАК, Россия)

**Электрофорез в ПААГ-ДСН.** Анализ структурных компонентов вирусных препаратов проведен методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) в буферной системе U K Laemmli (1970)

**Иммуноблоттинг (ИБ).** Для определения антигенной активности вирусных препаратов белки после электрофоретического разделения перенесли на нитроцеллюлозную мембрану «Immobilon-NC» (Millipore, США) в «полусухой» буферной системе (J Kyhse-Andersen, 1984)

**Адьюванты.** В качестве адьювантов при производстве вакцин использовали 6%-ный гель гидроокиси алюминия (ГОА) и сапонин

**Экспериментальные животные.** В качестве лабораторных животных использовали белых мышей массой 18-20 г, морских свинок массой 350-400 г, кроликов массой 3-3,5 кг, а в качестве естественно-восприимчивых – крупный рогатый скот, сформированных в соответствующие группы по принципу аналогов. Материалом для исследований служила сыворотка крови животных, в которой определяли содержание вирус-специфических антител в различных серологических тестах

**Реакция нейтрализации (РН).** РН ставили микрометодом в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) по стандартной методике с постоянной дозой

соответствующего вируса ( $1000 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ) Вируснейтрализующий титр сыворотки выражали как предельное ее разведение, ингибирующее развитие ЦПД вируса в 50% зараженных культур клеток

**Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** Методы использовали для обнаружения вируса ПГ-3 и выявления специфических антител в сыворотке крови морских свинок и крупного рогатого скота Для обнаружения КВ и специфических антител использовали «Набор для диагностики коронавирусного энтерита крупного рогатого скота методом гемагглютинации» (ВИЭВ им Я Р Коваленко, Россия) Реакции ставили микрометодом в полистироловых планшетах с U-образным дном с использованием эритроцитов морской свинки или мыши

**Коммерческие ИФА-наборы.** В опытах использовали «Набор компонентов для выявления ротавирусного антигена в фекалиях крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа» (ВИЭВ им Я Р Коваленко, Россия) Для выявления антител к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, КВ и РВ крупного рогатого скота использовали ИФА-наборы соответствующей специфичности (SVANOVA, Швеция)

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала Вероятность различий считалась существенной при  $P < 0,05$

## **2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**2.1. Серологический мониторинг вирусных инфекций крупного рогатого скота в хозяйствах Московской области**

При анализе эпизоотической ситуации по ИРТ, ПГ-3 и ВД в отдельных хозяйствах Московской области ( $n=7$ ) учитывали отчеты ветеринарных служб обследованных хозяйств, наличие клинических признаков и патолого-анатомических изменений у животных, а также результаты собственных се-

рологических исследований

Результаты серологического исследования показали, что из 135 обследованных голов крупного рогатого скота, антитела к вирусу ИРТ были обнаружены у 87 (64%), к вирусу ПГ-3 – у 93 (68,9%), к вирусу ВД – у 82 (60,7%) животных. При этом во всех хозяйствах у 32 – 61% обследованных животных были выявлены вируснейтрализующие антитела к двум или трем возбудителям одновременно, что указывает на необходимость применения поливалентных вакцин в системе противоэпизоотических мероприятий.

## 2.2. Разработка схемы изготовления и методы биологического контроля вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К

2.2.1 Характеристика производственных штаммов вирусов, используемых для производства вакцин. Основным методом идентификации всех производственных штаммов вирусов крупного рогатого скота была РН с использованием моноспецифических референтных антисывороток. Кроме того, специфичность вируса ИРТ подтверждали в РДП, вируса ПГ-3 и КВ – в РТГА и в иммуноблоттинге, вируса ВД – в ПЦР и РВ – в ИФА (табл 1)

Таблица 1.

*Оценка специфичности производственных штаммов вирусов, входящих в состав вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К*

Метод идентификации	Вирусы				
	ИРТ	ПГ-3	ВД	РВ	КВ
РН*	+	+	+	+	+
РДП*	+	-	-	-	-
РТГА*	-	+	-	-	+
ПЦР	-	-	+	-	-
ИФА	-	-	-	+	-
ИБ*	-	+	-	-	+

*Примечание* «+» - означает положительный результат идентификации вируса соответствующим методом, «-» - исследование не проводилось, \* - в данном методе использованы референтные антисыворотки соответствующей специфичности

В РДП вирус ИРТ с титром инфекционной активности  $7,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  формировал видимый преципитат с гомологичной референтной антисывороткой в разведении 1:8. Моноспецифичность вируса была подтверждена отсутствием реакции с референтными антисыворотками к гетерологичным ви-

русам крупного рогатого скота

Параллельно с РН антиген вируса ПГ-3 был исследован в РТГА Гомологичная референтная антисыворотка тормозила развитие гемагглютинации вируса ПГ-3 в титре 1 1024

Вирус ВД, кроме РН, идентифицировали с помощью ПЦР Генотипная РНК вакцинного штамма СТ-89 соответствовала геному вируса ВД

Коронавирус крупного рогатого скота проверяли с помощью набора для РТГА Исследуемый антиген агглютинировал эритроциты мыши в титре 1 128, а в РТГА с положительной референтной антисывороткой давал задержку гемагглютинации в титре 1 160

В ИБ испытуемые препараты ПГ-3 и КВ при взаимодействии с референтной антисывороткой формировали четкие окрашенные полосы в соответствующих зонах миграции

Идентификацию ротавируса крупного рогатого скота помимо РН проводили в ИФА При учете полученных результатов было установлено, что значение ОП 450 в лунках с испытуемым РВ-антигеном соответствовало показателям ОП 450 положительных контролей

Таким образом, в результате проведенных исследований была подтверждена идентичность производственных штаммов вирусов ИРТ, ПГ-3, ВД, РВ и КВ и сделан вывод о том, что данные штаммы можно использовать в дальнейшей работе

2 2 2 Получение и иммунохимическая характеристика гипериммунных антисывороток к производственным штаммам вирусов В результате проведенных экспериментов была разработана схема иммунизации кроликов концентрированными вирусными антигенами и получен набор моноспецифических гипериммунных антисывороток (ГИС) к вирусам ИРТ, ПГ-3 и ВД (табл 2) для дальнейшего контроля специфичности вирусных компонентов вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К

Таблица 2.

Оценка содержания вирус-специфических антител в ГИС

Метод определения	Титр антител к вирусам					
	ПГ-3		ИРТ		ВД	
	ГИС	Референс-антисыворотка	ГИС	Референс-антисыворотка	ГИС	Референс-антисыворотка
РН	1 512	1 2048	1 1024	1 320	1 1024	1 1280
РТГА	1 64	1 1024	-	-	-	-
РДП	-	-	1 16	1 2	-	-

2.2.3. Определение режима инактивации вирусов формалином В качестве инактиванта вирусов ИРТ, ПГ-3, ВД, РВ и КВ использовали формальдегид в различных концентрациях. Инактивацию проводили при 37°C в течение 24, 48 и 72 час. Полноту инактивации вирусов определяли по отсутствию их размножения в культуре клеток МДВК в течение 4-х пассажей (табл. 3)

Таблица 3.

Результаты определения режима инактивации вирусов формалином

Вирус	Концентрация формальдегида, %	Экспозиция при 37°C, час		
		24	48	72
ИРТ	0,1	+	+	+
	0,2	+	+	+
	0,3	+	+	-
ВД	0,1	+	-	-/-
	0,2	-	-	-/-
ПГ-3	0,1	+	+	-/-
	0,2	-	-	-/-
РВ	0,1	+	+	-/-
	0,2	+	-	-/-
КВ	0,1	+	+	-/-
	0,2	+	-	-/-

Примечание «+» - означает наличие остаточной инфекционности вируса, «-» - вирус инактивирован полностью, «-/-» - исследование не проводилось

Как видно из данных табл. 3, формальдегид полностью инактивировал вирус ИРТ в концентрации 0,3% при экспозиции 72 час; вирус ВД - в концентрации 0,1% при экспозиции 48 час и 0,2% при экспозиции 24 и 48 час, вирус ПГ-3 - в концентрации 0,2% при экспозиции 24 и 48 час, рота- и коро-

навирус – в концентрации 0,2% при экспозиции 48 час

2.2.4. Определение оптимальной концентрации адьюванта Для определения оптимальной концентрации ГОА были приготовлены экспериментальные серии вакцины КОМБОВАК-Р против респираторных инфекций телят и вакцины КОМБОВАК-К против инфекций желудочно-кишечного тракта телят, в состав которых вошли вирусы и бактерии соответствующей направленности. Приготовили несколько вариантов с различным содержанием ГОА. В контроле вместо бактериального компонента в том же объеме добавили физиологический раствор, ГОА - 10% от общего объема препарата. Для приготовления всех вариантов вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К использовали вирусные компоненты, полученные в одно время, с определенной инфекционной активностью и инактивированные формалином в определенном ранее режиме. В каждом варианте вакцины вирусы содержались в одинаковых соотношениях. В качестве экспериментальной модели использовали морских свинок, сформированных в группы (n=10 в каждой группе), которых иммунизировали изготовленными вариантами вакцин подкожно однократно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. Взятие крови проводили на 21 сутки после инъекции вакцины, полученные сыворотки крови исследовали в РН (табл 4,5)

**Таблица 4.**

*Антигенная активность вирусных компонентов, входящих в состав различных вариантов вакцины КОМБОВАК-Р*

Концентрация ГОА, %	№ группы	Титр вируснейтрализующих антител *, (M ± m)		
		ИРТ	ПГ-3	ВД
10	I	20,8 ± 6,7	12,8 ± 4,3	64,0 ± 3,9
20	II	32,0 ± 0	38,4 ± 4,3**	134,4 ± 17,9 **
30	III	14,4 ± 3,5	28,8 ± 7,1**	51,2 ± 7,5
контроль	IV	22,4 ± 8,7	14,4 ± 3,5	57,6 ± 4,2

**Примечание:** \* - здесь и далее в таблицах и рисунках титры антител приведены в обратных величинах, \*\* - статистическая достоверность различий по отношению к контрольной группе, P < 0,05

Сравнительный анализ полученных результатов позволил заключить, что оптимальная концентрация ГОА при изготовлении вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К должна составлять 20% от общего объема препарата. Кроме того, показано, что добавление бактериальных компонентов к вирус-

ным вакцинам не влияет на антигенные свойства вирусных компонентов, входящих в их состав

Таблица 5.

Антигенная активность вирусных компонентов, входящих в состав различных вариантов вакцины КОМБОВАК-К

Концентрация ГОА, %	№ группы	Титр вируснейтрализующих антител *, (M ± m)		
		ВД	РВ	КВ
10	I	57,6 ± 14,3	140,8 ± 17,1	140,8 ± 17,1
20	II	140,8 ± 17,1**	204,8 ± 17,6**	179,2 ± 14,5**
30	III	121,6 ± 18,5 **	108,8 ± 14,2	140,8 ± 17,1
контроль	IV	76,8 ± 12,8	153,6 ± 15,7	115,2 ± 28,6

2.2.5 Изготовление опытных серий вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К На основе полученных данных были изготовлены опытные серии вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К В состав первой вошли вирусы ИРТ, ПГ-3, ВД и концентрат культур *P. multocida* и *P. haemolytica*, в состав второй – вирусы ВД, РВ, КВ и концентрат культуры *E. coli*

При проведении технологических производственных мероприятий вирусные антигены выращивали в перевиваемой культуре клеток МДВК (ИРТ, ВД, РВ и КВ) и ЛЭК (ПГ-3) Инфекционная активность вирусов, использованных для изготовления препаратов, составляла не менее 7,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> Вирусы инактивировали формалином в ранее установленных режимах

Инактивированные вирусные и бактериальные<sup>1</sup> компоненты смешивали с ГОА (20% от общего объема), добавляли сапонин в концентрации 500 мг/л (аналогично технологии изготовления прототипной вакцины КОМБОВАК) и мертиолят натрия в концентрации 1 10000 в качестве консерванта Концентрация вирусных антигенов в готовых препаратах составила не менее 7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, концентрация пастерелл в вакцине КОМБОВАК-Р составила 9 млрд м.т. в дозе (*штам* *P. multocida* 8683 (*тип* *A*), 1231 (*тип* *A*), 656 (*тип* *B*), *T-80* (*тип* *D*), *P. haemolytica* 169 в равных количествах), концентрация *E. coli* (антигены соматические 09, 078, 0115, капсульные полисахаридные *K 80*, *K 30*, адгезивные *K 99*, *F-41*) составила 60 млрд м.т. в дозе

<sup>1</sup> производства ФГУП «Армавирская биофабрика»

Каждую опытную серию вакцины проверяли на стерильность путем высева на МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро, а также исследовали на полноту инактивации вирусных компонентов путем проведения четырех последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток МДВК

Готовые препараты проверяли на безвредность в опытах на белых мышках и морских свинках Морским свинкам ( $n=5$ ) вакцину вводили подкожно в дозе  $1,0 \text{ см}^3$ , белым мышам ( $n=5$ ) – внутривентриально в дозе  $0,2 \text{ см}^3$  За привитыми животными наблюдали в течение 10 дней Опытные серии вакцин были безвредными, не вызывали общей температурной и местных воспалительных реакций, и все животные оставались здоровыми в течение срока наблюдения

2.2.6. Контроль антигенной активности вирусных компонентов вакцины Антигенную активность вирусных компонентов препарата КОМБОВАК-Р определяли на морских свинках Для определения иммунизирующей дозы вакцины КОМБОВАК-Р использовали 3 группы морских свинок по 10 голов в каждой Морских свинок прививали однократно подкожно животных I-ой группы – в дозе  $0,25 \text{ см}^3$ , животных II-ой группы – в дозе  $0,5 \text{ см}^3$ , животных III-ей группы – в дозе  $1,0 \text{ см}^3$  Контролем служили 5 неиммунных морских свинок У всех животных через 21 сут после иммунизации исследовали сыворотку крови на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД в РН, к вирусу ПГ-3 – в РТГА (табл 6)

Таблица 6

*Уровень антител в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-Р в различных дозах*

Группа жив-х	Доза препарата, $\text{см}^3$	Титр антител к вирусам, $M \pm m$		
		ИРТ (РН)	ПГ-3 (РТГА)	ВД (РН)
I	0,25	0	$19,2 \pm 7,1$	$51,2 \pm 7,2$
II	0,5	$54,0 \pm 5,5$	$80,0 \pm 3,2$	$96,0 \pm 10,7$
III	1,0	$13,3 \pm 4,6$	$10,6 \pm 0,9$	$213,3 \pm 27,3$
контроль	-	0	0	0

Из данных, приведенных в таблице 6, видно, что вакцины в дозе  $0,25$

см<sup>3</sup> оказалось недостаточно, а доза 1,0 см<sup>3</sup> оказалась избыточной для формирования выраженного иммунного ответа к вирусам ИРТ и ПП-3. При этом титр антител к вирусу ВД прямо пропорционально зависел от дозы введенного препарата. Таким образом, на основании сравнительного анализа полученных результатов, оптимальной иммунизирующей дозой вакцины, была выбрана доза равная 0,5 см<sup>3</sup>

Определение антигенной активности вирусных компонентов препарата КОМБОВАК-К проводили по аналогичной схеме (табл. 7)

Таблица 7.

*Уровень антител в сыворотке крови морских свинок, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-К в различных дозах*

Группа жив-х	Доза препарата, см <sup>3</sup>	Титр вируснейтрализующих антител, М±m		
		ВД	РВ	КВ
I	0,25	28,8 ± 2,1	35,2 ± 1,7	86,4 ± 5,7
II	0,5	120,4 ± 13,2	192,5 ± 18,5	160,2 ± 14,5
III	1,0	104,0 ± 14,8	160,0 ± 16,4	183,0 ± 19,2
контроль	-	0	0	0

Из приведенных в таблице 7 данных видно, что введение морским свинкам вакцины КОМБОВАК-К в дозах 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup> вызывает образование антител ко всем вирусным антигенам приблизительно на одном уровне. При введении вакцины в дозе 0,25 см<sup>3</sup> уровень антител в 3-4 раза ниже, чем у животных II-ой и III-ей групп. Таким образом, доза 0,5 см<sup>3</sup> является оптимальной для контроля антигенной активности вакцин на морских свинках.

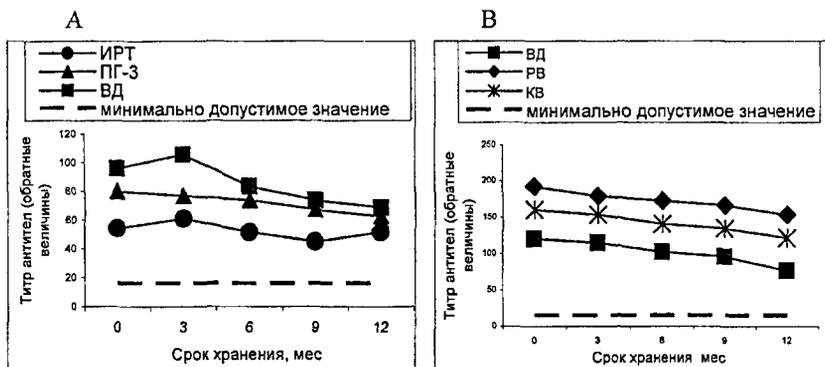
2.2.7 Контроль иммуногенной и антигенной активности бактериальных компонентов вакцин. При проведении испытаний вакцину КОМБОВАК-Р вводили внутримышечно кроликам (n=5) в дозе 1,5 см<sup>3</sup>, через 30-35 сут инъекцию повторяли, удваивая дозу. Через 14 сут после последней инъекции вакцины у кроликов отбирали пробы крови, полученные сыворотки крови смешивали в равных объемах и сборную пробу вводили подкожно белым беспородным мышам в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Через сутки 10 иммунизированных и 10 контрольных мышей заражали вирулентным штаммом *P. multocida* №1231

(тип А) в дозе 5 LD<sub>50</sub>. В течение 7 сут все контрольные мыши погибали, а 90% опытных животных остались живыми

Для определения антигенной активности адгезивных антигенов *E coli* в вакцине КОМБОВАК-К, препарат вводили кроликам (n=5) однократно подкожно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. Через 21 сут сыворотку крови от каждого животного исследовали на наличие антител к адгезивным антигенам К99, F-41 в реакции агглютинации. Реакцию оценивали в крестах по общепринятой методике. В результате исследований было установлено, что у большинства (85-95%) иммунизированных животных титр специфических антител в сыворотке крови превышал значение 1/200 при оценке реакции не ниже чем в два креста.

Иммуногенную активность вакцины КОМБОВАК-К по отношению к соматическим антигенам *E coli* проверяли на белых беспородных мышках массой 18-20 г, которым подкожно двукратно с интервалом 10 сут вводили испытуемый препарат в дозе 0,1 см<sup>3</sup>. На каждый эксперимент брали по 20 опытных и по 20 контрольных (неиммунизированных) животных. Через 18 сут после повторной инъекции вакцины мышей заражали внутрибрюшинно оттитрованной летальной дозой двух штаммов *E coli* серогрупп О78 и О115. На штамм каждой серогруппы использовали 10 вакцинированных и 10 контрольных животных. В течение 7-12 сут в среднем 90% контрольных мышей погибали, а 85% опытных животных оставались живыми.

2.2.8 Контроль антигенной активности вирусных компонентов вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К в процессе хранения. Необходимым условием внедрения в практику новых вакцинных препаратов является сохранность их активности в процессе хранения. Поэтому мы определяли антигенную активность вирусных компонентов опытных серий вакцин в процессе их хранения в течение 12 месяцев при температуре 4°C. Для этого морских свинок (n=10 в каждом опыте) иммунизировали испытуемой вакциной, хранившейся 3, 6, 9 и 12 мес, однократно подкожно в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Через 21 сут после вакцинации сыворотку крови животных исследовали в РН (рис 1)



**Рисунок 1.** Содержание ВНА в сыворотке крови животных, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК-Р (А) и КОМБОВАК-К (В) в различные сроки хранения

Из приведенных данных видно, что при хранении препаратов при 4°C антигенная активность вирусных компонентов вакцин снижается незначительно. Введение препаратов через 3, 6, 9 и 12 мес после изготовления приводит к формированию выраженного гуморального иммунного ответа у морских свинок, который характеризуется высоким содержанием ВНА к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, РВ и КВ соответственно.

### 2.3. Оценка антигенной активности и определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К для крупного рогатого скота

2.3.1. Оценка гуморального иммунного ответа у стельных коров и телят, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-Р Для оценки антигенной активности вирусных компонентов вакцины КОМБОВАК-Р и определения иммунизирующей дозы препарата были использованы 3 группы глубокоостельных коров ( $n=20$  в каждой группе), которых иммунизировали за 40-50 суток до предполагаемого отела внутримышечно в дозах 2,0, 3,0, и 5,0 см<sup>3</sup> соответственно. Второй эксперимент был поставлен на телятах в возрасте 40-50 сут, полученных от невакцинированных матерей, сформированных также в 3 группы по 20 голов в каждой. Животных каждой группы вакцинировали внутримышечно в дозах 1,0, 2,0, и 3,0 см<sup>3</sup> соответственно. Ревакцинацию ко-

ров и телят проводили через 14 суток после первой иммунизации в тех же дозах. Перед каждым введением препарата и через 21 сутки после 2-й вакцинации у всех животных брали кровь и определяли уровень вирус-специфических антител в сыворотке крови методами РН и ИФА (табл 8, 9)

Таблица 8.

*Уровень специфических вируснейтрализующих антител в сыворотке крови коров после иммунизации вакциной КОМБОВАК-Р*

Группа животных	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Титр вируснейтрализующих антител*, М±m			
		К вирусу	До вакцинации	Через 14 сут после 1-й вакцинации **	Через 21 сут после 2-й вакцинации **
I	2,0	ИРТ	64,9 ± 8,1	176,3 ± 15,3	181,3 ± 10,3
		ПГ-3	64,6 ± 4,9	156,4 ± 25,5	170,7 ± 39,5
		ВД	30,2 ± 8,3	346,1 ± 18,8	391,1 ± 29,6
II	3,0	ИРТ	57,3 ± 6,6	234,7 ± 31,1	209,1 ± 16,2
		ПГ-3	54,9 ± 5,2	241,8 ± 18,8	233,2 ± 25,3
		ВД	28,6 ± 2,2	412,4 ± 26,9	412,5 ± 18,2
III	5,0	ИРТ	55,4 ± 4,8	102,8 ± 26,1	136,6 ± 18,5
		ПГ-3	57,1 ± 8,6	182,2 ± 16,4	211,7 ± 27,8
		ВД	18,5 ± 7,4	507,1 ± 33,0	339,7 ± 25,5

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что на 21-е сутки после второй вакцинации глубокостельных коров вакциной КОМБОВАК-Р, титр ВНА к вирусу ИРТ вырос в 2,8 раза при введении препарата в дозе 2 см<sup>3</sup>, в 3,6 раза – при введении препарата в дозе 3 см<sup>3</sup> и в 2,4 раза - при введении препарата в дозе 5 см<sup>3</sup>. В среднем по группам титр составил 1 181,3, 1 209,1 и 1 136,6 соответственно. Уровень ВНА к вирусу ПГ-3 увеличился в 2,6 раза при введении препарата в дозе 2 см<sup>3</sup>, в 4,2 раза – 3 см<sup>3</sup>, в 3,7 раза – 5 см<sup>3</sup> и составил 1 170,7, 1 233,2 и 1 211,7 соответственно. Титр ВНА к вирусу ВД вырос в 12,9 раза при введении препарата в дозе 2 см<sup>3</sup>, в 14,4 раза – 3 см<sup>3</sup>, в 18,4 раза – 5 см<sup>3</sup> и составил 1 391,1, 1 412,5 и 1 339,7 соответственно. Результаты ИФА подтвердили результаты РН ( $r=0,82$ ,  $P < 0,05$ ). Таким образом, для практического применения для стельных коров была выбрана доза 3 см<sup>3</sup>.

Таблица 9.

Уровень специфических антител в сыворотке крови телят  
после иммунизации вакциной КОМБОВАК-Р

Группа жив-х	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Титр вируснейтрализующих антител*, М±m			
		К вирусу	До вакцинации	Через 14 сут после 1-й вакцинации **	Через 21 сут после 2-й вакцинации **
I	1,0	ИРТ	1,1 ± 3,0	12,5 ± 1,1	85,7 ± 3,1
		ПГ-3	5,7 ± 6,9	18,3 ± 5,2	117,1 ± 17,9
		ВД	2,6 ± 2,1	53,7 ± 15,1	401,7 ± 38,0
II	2,0	ИРТ	7,0 ± 8,8	76,0 ± 9,4	205,0 ± 33,7
		ПГ-3	5,0 ± 9,5	36,5 ± 8,7	294,0 ± 24,5
		ВД	5,0 ± 7,3	96,0 ± 21,9	664,0 ± 52,9
III	3,0	ИРТ	6,2 ± 2,3	71,2 ± 12,2	198,3 ± 23,5
		ПГ-3	6,2 ± 6,8	35,1 ± 16,3	288,3 ± 21,3
		ВД	3,9 ± 1,5	96,2 ± 11,2	506,1 ± 48,6

Данные таблицы 9 свидетельствуют о том, что вакцинация телят вакциной КОМБОВАК-Р привела к формированию выраженного иммунного ответа и статистически достоверному приросту антител ( $P < 0,01$ ) Максимальное содержание антител к вирусам ИРТ, ПГ-3 и ВД было зарегистрировано на 21-е сутки после второй вакцинации каждой из трех испытуемых доз вводимого препарата Однако наиболее высокий титр, как вируснейтрализующих антител, так и всего пула специфических антител выявляемого в ИФА, был зафиксирован у телят при введении вакцины КОМБОВАК-Р в дозе 2 см<sup>3</sup> (доза для практического применения) При этом установлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью РН и ИФА ( $r=0,88$ ,  $P < 0,05$ )

2 3 2 Оценка гуморального иммунного ответа у стельных коров, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-К Антигенную активность вирусных компонентов вакцины КОМБОВАК-К и определение иммунизирующей дозы препарата проверяли на глубокостельных коровах Схема опыта была аналогична описанной в п п 2 3 1 Результаты исследований приведены в табл 10

Таблица 10.

Уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови коров  
после иммунизации вакциной КОМБОВАК-К

Группа жив-х	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Титр вируснейтрализующих антител*, М±m			
		К вирусу	До вакцинации	Через 14 сут после 1-й вакцинации **	Через 21 сут после 2-й вакцинации **
I	2,0	ВД	26,2 ± 2,3	254,3 ± 15,6	310,2 ± 15,0
		КВ	25,9 ± 6,8	428,4 ± 16,8	514,5 ± 22,0
		РВ	19,6 ± 11,5	684,1 ± 21,3	870,6 ± 27,9
II	3,0	ВД	18,9 ± 6,4	476,7 ± 30,1	512,0 ± 21,3
		КВ	29,0 ± 5,6	1351,6 ± 14,0	1792,6 ± 19,1
		РВ	23,6 ± 2,9	961,3 ± 26,2	1229,0 ± 31,4
III	5,0	ВД	23,5 ± 5,3	383,1 ± 20,1	258,0 ± 35,1
		КВ	26,7 ± 8,1	898,2 ± 10,9	717,2 ± 14,9
		РВ	21,9 ± 6,3	872,1 ± 25,4	1024,3 ± 12,9

Полученные нами данные показали, что после применения вакцины КОМБОВАК-К титр антител к вирусу ВД в сыворотке крови коров при введении препарата в дозе 2 см<sup>3</sup> достоверно увеличился в 11,8 раз, при введении препарата в дозе 3 см<sup>3</sup> – в 27 раз и при введении препарата в дозе 5 см<sup>3</sup> – в 10,9 раз. Титр антител к коронавирусу вырос в 19,8 раз при вакцинации в дозе 2 см<sup>3</sup>, в 61,8 раз – в дозе 3 см<sup>3</sup>, в 26,8 раз – в дозе 5 см<sup>3</sup>. Уровень антител к ротавирусу увеличился в 44,4 раза при введении препарата в дозе 2 см<sup>3</sup>, в 52 раза – в дозе 3 см<sup>3</sup>, в 46,7 раза – в дозе 5 см<sup>3</sup>.

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее выраженный иммунный ответ ко всем трем вирусным компонентам вакцины КОМБОВАК-К наблюдался у стельных коров, вакцинированных в дозе 3 см<sup>3</sup>, при этом титр антител был в 2-3 раза выше, чем при иммунизации животных препаратом в дозе 2 см<sup>3</sup>. Увеличение дозы с 3 до 5 см<sup>3</sup> не оказывало существенного влияния на прирост специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных. Таким образом, доза 3 см<sup>3</sup> была признана оптимальной для практического применения.

### 2.3.3 Оценка колострального иммунитета у новорожденных телят

Применение вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К направлено, в первую очередь, на создание колострального иммунитета у новорожденных телят,

поэтому важно было оценить не только иммунный ответ у вакцинированных коров, но и уровень колостральных антител у потомства

В эксперименте были использованы 7-14 дневные телята ( $n=55$ ), рожденные от коров иммунизированных различными дозами вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К, контролем служили телята аналогичного возраста ( $n=10$ ) полученные от невакцинированных коров. Все опытные и контрольные телята своевременно получали молозиво от своих матерей в течение первых двух часов после рождения и содержались в одинаковых условиях. Оценку колострального иммунитета проводили путем определения титра ВНА в сыворотке крови всех опытных и контрольных животных (табл. 11, 12). Помимо РН, содержание специфических антител к вирусам ИРТ, ПГ-3 и ВД крупного рогатого скота определяли в ИФА.

Таблица 11.

*Уровень колостральных антител у 7-14 дневных телят, полученных от коров, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-Р*

Группа животных	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Титр ВНА к вирусу*, М±m		
		ИРТ	ПГ-3	ВД
опыт	2,0	169,5 ± 25,6**	155,3 ± 32,1**	340,8 ± 15,6**
	3,0	214,1 ± 15,2**	205,5 ± 29,7**	453,2 ± 16,9**
	5,0	115,3 ± 26,3**	180,6 ± 35,0**	340,1 ± 20,8**
контроль	-	35,6 ± 9,8	42,9 ± 3,3	8,9 ± 2,6

Таблица 12.

*Уровень колостральных антител у 7-14 дневных телят, полученных от коров, иммунизированных вакциной КОМБОВАК-К*

Группа животных	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Титр ВНА к вирусу*, М±m		
		ВД	КВ	РВ
опыт	2,0	256,5 ± 32,8**	597,2 ± 22,7**	597,9 ± 16,4**
	3,0	704,3 ± 24,2**	768,2 ± 12,8**	1067,0 ± 13,7**
	5,0	340,9 ± 25,3**	870,5 ± 36,8**	640,5 ± 11,8**
контроль	-	12,6 ± 2,8	14,9 ± 6,3	8,1 ± 4,6

Сравнительный анализ содержания колостральных антител в сыворотке крови телят, получавших молозиво от вакцинированных коров (опыт), и телят, получавших молозиво от невакцинированных животных (контроль), показал, что титр специфических сывороточных антител ко всем вирусам у

телят опытной группы был значительно выше, чем у телят контрольной ( $P < 0,01$ ) Результаты ИФА подтвердили результаты РН ( $r=0,82$ ,  $P < 0,05$ ) Самые высокие титры антител отмечали у телят, получавших молозиво от матерей, иммунизированных испытываемыми вакцинами в дозе  $3 \text{ см}^3$

Установлена высокая степень коррелятивной зависимости между содержанием вирус-специфических колостральных антител в сыворотке крови 7-14-дневных телят и титром вирус специфических антител в сыворотке крови вакцинированных матерей ( $r=0,79$ ,  $P < 0,05$ )

#### **2.4. Эффективность использования вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К в производственных условиях**

Эффективность разработанных вакцин изучали в производственном опыте в четырех хозяйствах Московской области, неблагополучных по респираторным и желудочно-кишечным болезням молодняка крупного рогатого скота В каждом хозяйстве опыт проводили на фермах с самым высоким процентом заболеваемости, гибели и выбраковки молодняка (опытные) На одной из ферм каждого хозяйства испытания не проводились, и животные данной фермы являлись контрольными

2.4.1 Испытание эффективности инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и пастереллеза телят (КОМБОВАК-Р) Для профилактики респираторных болезней телят использовали вакцину КОМБОВАК-Р При проведении опытов вакцинировали а) глубокостельных коров с целью формирования колострального иммунитета у потомства и б) телят старше 1,5 мес возраста Глубокостельным коровам вакцину вводили внутримышечно двукратно в дозе  $3 \text{ см}^3$  Первую вакцинацию проводили за 45-60 сут до отела, вторую – через 10-14 сут В течение года было вакцинировано 448 глубокостельных коров, количество контрольных животных составляло 175 голов Телят в возрасте 1,5-4 мес возраста вакцинировали дважды в дозе  $2 \text{ см}^3$  с интервалом 20-25 сут Телят старше 4 мес возраста вакцинировали двукратно в дозе  $3 \text{ см}^3$  с интервалом 3-4 недели В экспериментах было задействовано 435

телят, контролем служили 146 телят

Эффективность вакцины определяли по эпизоотологическим показателям снижению уровня заболеваемости телят респираторными болезнями, а также по снижению процента их гибели и вынужденной выбраковки

По результатам исследований было установлено, что заболеваемость новорожденных телят респираторными болезнями на опытных фермах снизилась в среднем с 62 до 19%, гибель и вынужденная выбраковка телят снизилась с 9,3% до 2,6%, тогда как на контрольных фермах аналогичные показатели составили 53% и 8,1% соответственно

2.4.2. Испытание эффективности инактивированной комбинированной вакцины против вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и эшерихиоза телят (КОМБОВАК-К) Для профилактики желудочно-кишечных инфекций новорожденных телят использовали вакцину КОМБОВАК-К. Вакцинировали глубокостельных коров с целью создания напряженного колострального иммунитета у потомства. Вакцину вводили внутримышечно двукратно в дозе 3 см<sup>3</sup> первый раз за 45-60 сут до отела, второй раз – через 10-14 сут. Эпизоотологическую эффективность вакцины определяли по снижению уровня заболеваемости новорожденных телят желудочно-кишечными болезнями, а также по снижению процента гибели и выбраковки телят. В течение года было вакцинировано 815 глубокостельных коров и нетелей, контролем служило 348 невакцинированных животных.

По результатам исследований было установлено, что после применения вакцины заболеваемость новорожденных телят желудочно-кишечными болезнями на опытных фермах снизилась в среднем с 68 до 23%, гибель и выбраковка телят снизилась с 8,6% до 3,2%, тогда как в контрольных группах средние показатели заболеваемости и смертности телят по причине желудочно-кишечных болезней составили 56% и 9,4% соответственно.

### 3. ВЫВОДЫ

1. Серологическими методами установлена циркуляция вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи крупного рога-

того скота в животноводческих хозяйствах Московской области. При этом во всех семи хозяйствах у 32–61% обследованных животных были выявлены вируснейтрализующие антитела к двум или трем возбудителям одновременно.

2 Для специфической профилактики респираторных и желудочно-кишечных болезней крупного рогатого скота разработана схема изготовления инактивированных комбинированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и пастереллеза телят (КОМБОВАК-Р) и против вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и эшерихиоза телят (КОМБОВАК-К).

3 Подтверждена специфичность производственных штаммов вирусов, входящих в состав вакцин КОМБОВАК, КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К. Получены и охарактеризованы моноспецифические гипериммунные сыворотки к вирусам инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи крупного рогатого скота. Для производства безопасных и иммуногенных препаратов определены режимы инактивации вирусов и концентрация адьюванта в вакцинах.

4 В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанные вакцины безвредны, обладают выраженной антигенной активностью и индуцируют формирование гуморального иммунного ответа у морских свинок и кроликов, а также сохраняют свою активность в течение всего срока хранения.

5 В экспериментальных условиях на естественно-восприимчивых животных установлены схемы применения и определена оптимальная иммунизирующая доза инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К для стельных коров, составляющая  $3,0 \text{ см}^3$ . При этом двукратная иммунизация коров вакцинами КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К приводит к увеличению титра вируснейтрализующих антител ко всем вирусным компонентам вакцин в 3-4 раза и в 10 и более раз соответственно. Для телят оптимальная иммунизирующая доза вакцины КОМБОВАК-Р составила

2,0 см<sup>3</sup> Двукратная вакцинация телят препаратом КОМБОВАК-Р приводит к увеличению титра вируснейтрализующих антител к возбудителям инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи крупного рогатого скота в 7 и более раз

6 Вакцинация стельных коров препаратами КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К приводит к формированию выраженного колострального иммунитета у потомства Уровень вирус-специфических антител в сыворотке крови 7-14 дневных телят, полученных от вакцинированных матерей, более чем в 5 раз превышает аналогичные показатели у телят, полученных от невакцинированных животных

7 В производственных условиях установлена профилактическая эффективность вакцинации стельных коров и телят разработанными вакцинами В результате использования инактивированной комбинированной вакцины КОМБОВАК-Р в неблагополучных хозяйствах уровень заболеваемости респираторными болезнями снизился в 3,3 раза, процент гибели и вынужденной выбраковки телят – в 3,6 раза Вакцинация глубокостельных коров инактивированной комбинированной вакциной КОМБОВАК-К и своевременная выпойка молозива новорожденным телятам позволила снизить уровень заболеваемости молодняка желудочно-кишечными болезнями в 3 раза, процент гибели и выбраковки телят – в 2,7 раза

#### 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы исследований по разработке и применению вакцин КОМБОВАК-Р и КОМБОВАК-К вошли в следующие нормативные документы

- Извещение №1 об изменении ТУ 9384-003-42418073-01 «Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синтициальной, рота- и коронавирусной болезней телят (КОМБОВАК)» от 01 03 2001г , согласовано с Департаментом ветеринарии МСХ РФ 02 02 2004,

- Инструкция по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи

и пастереллеза телят (КОМБОВАК-Р), утверждена Россельхознадзором 30 03 2007,

- Инструкция по применению вакцины инактивированной комбинированной против вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и эшерихиоза телят (КОМБОВАК-К), утверждена Россельхознадзором 30 03 2007

## **5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1 Хитрова, А Е Профилактика заболеваний органов дыхания и пищеварения телят с использованием вакцины КОМБОВАК в хозяйствах промышленного типа / А Е Хитрова, М И Швыдкова // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях» – Воронеж, 2002 – С 613-614

2 Хитрова, А Е Получение и характеристика гипериммунных сывороток к вирусам инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота / А Е Хитрова, О А Верховский, И В Непоклонова // Материалы международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» – Владимир, 2003 – С 222-226

3 Хитрова, А Е Оценка антигенной активности вирусных компонентов опытной серии вакцины «КОМБОВАК-К» на лабораторных животных / А Е Хитрова // Материалы Международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» – Владимир, 2003 – С. 438-440

4 Хитрова, А Е Антигенная активность вакцин Комбовак-Р и Комбовак-К / А Е Хитрова, Г Л Соболева, В А Сергеев, Т И Алипер, И В Непоклонова // Ветеринария – 2004 – №11 – С 21-24

5 Хитрова, А Е Эффективность применения комбинированных вакцин серии КОМБОВАК / А Е Хитрова, В А Сергеев, Т И Алипер, О А Верховский // Ветеринария – 2006 – № 9 – С 17-20

22

---

Подписано в печать 16 05 2008 г  
Печать трафаретная

Заказ № 429  
Тираж 100 экз

Типография «11-й ФОРМАТ»  
ИНН 7726330900  
115230, Москва, Варшавское ш, 36  
(495) 975-78-56, (499) 788-78-56  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)