

ГАЛКИНА Татьяна Сергеевна

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ**

**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 Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир

Научный руководитель – доктор биологических наук, старший
научный сотрудник

ГЛОБЕНКО Людмила Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, старший
научный сотрудник

ДИЕВ Вячеслав Иванович

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных», г Владимир,

доктор биологических наук, профессор

ФОМИНА Наталья Васильевна

Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии
им К И Скрябина (МГАВМиБ), г Москва

Ведущая организация: ФГУ «Всероссийский государственный
центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных
и кормов (ФГУ «ВГНКИ», г Москва)

Защита диссертации состоится "24" июня 2008 г в "10" часов на заседании
диссертационного 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

I ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Из данных литературы известно, что ведущее место в инфекционной патологии плотоядных, в частности собак, занимают чума плотоядных и парвовирусный энтерит. Эти болезни отличаются высокой контагиозностью, поражают многие виды семейств собачьих, куньих, енотовидных и характеризуются весьма многообразными клиническими признаками. Восприимчивость и уровень смертности у различных видов животных варьирует в широких пределах. В популяции неиммунных собак и пушных зверей смертность может достигать от чумы плотоядных среди взрослых собак - 30-40%, среди молодняка - до 80-100%, от парвовирусного энтерита среди взрослых собак - 40-50%, а молодняка - до - 100% [М.М. Рахманина, 1993, А.А. Султанов и др., 2006]

Несмотря на большое число публикаций, касающихся этиологии, патогенеза, симптоматики, данных о поражении животных разных пород и возрастных групп недостаточно. Наиболее эффективным способом борьбы с данными заболеваниями является профилактическая вакцинация. В мировой ветеринарной практике используются как живые, так и инактивированные вакцины различной валентности против вышеуказанных болезней.

В связи со сложной эпизоотической обстановкой среди поголовья плотоядных в России, большим разнообразием штаммов возбудителей, их высокой мутагенностью, разработка вакцин против чумы плотоядных и парвовирусного энтерита является актуальной, несмотря на обилие вакцинальных препаратов, выпускаемых отечественной и зарубежной биопромышленностью.

Кроме того, анализ эпизоотической обстановки в г. Владимире по чуме плотоядных и парвовирусному энтериту не проводился в течение многих лет, также как и выделение полевых изолятов, их изучение в различных иммунохимических реакциях с целью отбора штаммов, пригодных для изготовления иммунобиологических препаратов против указанных вирусных болезней плотоядных. Учитывая частоту возникновения заболеваний собак чумой плотоядных и парвовирусным энтеритом в г. Владимире задачей наших исследований стало изучение эпизоотологии вышеуказанных болезней, выделение полевых изолятов этих вирусов и изучение их иммунобиологических свойств, для изготовления биопрепараторов.

Цели и задачи исследований. Целью настоящего исследования было изучение эпизоотической ситуации по чуме плотоядных (ЧП) и парвовирусному энтериту (ПВЭСоб) в условиях г Владимира, выделение полевых изолятов вирусов с целью изучения их иммунобиологических свойств и подбор наиболее иммуногенных штаммов, пригодных для изготовления средств специфической профилактики и диагностики этих болезней

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи

- провести сбор и анализ данных по эпизоотической обстановке по ЧП и ПВЭСоб в г Владимире за период 2004-2007 гг ,
- изучить частоту возникновения данных вирусных болезней собак разных пород, возрастов и провести анализ сезонности заболеваемости при этих инфекциях,
- оптимизировать условия выделения полевых изолятов ПВЭСоб из патологического материала различными методами и в культурах клеток,
- выделить изоляты возбудителя ПВЭСоб, изучить их биологические свойства в различных иммунохимических реакциях, выбрать перспективный штамм для изготовления средств специфической профилактики и диагностики,
- провести сравнительную оценку выделенных полевых изолятов ПВЭСоб по антигенным и иммунобиологическим свойствам,
- изучить динамику колострального иммунитета у щенков при ЧП и ПВЭСоб,
- изучить особенности формирования иммунитета при иммунизации животных отечественными и зарубежными ассоциированными вакцинами против ЧП и ПВЭСоб,
- разработать экспериментальные серии инактивированной вакцины против ПВЭСоб и определить оптимальное содержание парвовирусного антигена в прививной дозе этой вакцины,
- изучить антигенную активность экспериментальных образцов вакцин против ЧП и ПВЭСоб

Научная новизна исследований. Впервые в условиях г Владимира проанализированы эпизоотические данные по чуме плотоядных и парвовирусному энтериту собак

Отобраны полевые изоляты возбудителя ПВЭСоб и изучены их иммунобиологические свойства

Выделен оригинальный штамм возбудителя ПВЭСоб «Грей» В биологической характеристики этого штамма возбудителя ПВЭСоб изучены данные о его морфологии, культуральных, патогенных и антигенных свойствах, изучены его иммунобиологические свойства Штамм пригоден для изготовления средств специфической профилактики и диагностики этого заболевания

Оптимизированы условия выделения изолятов возбудителя ПВЭСоб из патологических материалов в культурах клеток и с помощью РГА и РТГА

Определено оптимальное содержание парвовирусного антигена в прививной дозе экспериментальной инактивированной вакцины

Изучена динамика коллострального иммунитета у щенков при ЧП и ПВЭСоб

Изучены антигенные свойства разработанных экспериментальных образцов вакцин против ЧП и ПВЭСоб в лабораторных и производственных условиях

Практическая ценность исследований В результате проведенных исследований разработаны следующие методические указания, которые одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЗЖ» (16 07 2007 г)

- «Методические указания по выделению парвовируса собак в культуре клеток»,
- «Методические указания по определению антигена парвовируса собак в вируссодержащем материале»,
- «Методические указания по выявлению антител к парвовирусу в сыворотках крови собак»

На производственный штамм «Грей» возбудителя ПВЭСоб составлен паспорт и депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, получена справка о депонировании ФГУ «ВГНКИ» от 06 05 2008 г Штамм «Грей» парвовируса собак хранится в Коллекции экзотических типов ящура и других патогенов животных ФГУ «Федерального центра охраны здоровья животных»

Данные, полученные в результате анализа эпизоотической обстановки в г Владимире по ЧП и ПВЭСоб и в ходе серологических исследований при изучении антигенных свойств вирусов ЧП и ПВЭСоб в составе вакцинальных препаратов,

вошли в нормативную документацию утвержденную заместителем Руководителя Россельхознадзора от 21.04.2008 г

- СТО «Вакцина ассоциированная против парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и чумы плотоядных»,
- Инструкция по применению вакцины ассоциированной против парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и чумы плотоядных

Основные положения, выносимые на защиту

- эпизоотическая обстановка в г. Владимире по чуме плотоядных и парвовирусному энтериту собак,
- оптимизация условий выделения возбудителя ПВЭСоб из патологического материала и в культуре клеток,
- биологические свойства полевых изолятов возбудителя ПВЭСоб,
- серологическая диагностика ЧП и ПВЭСоб в РН и РТГА,
- оценка напряженности иммунитета при применении экспериментальных вакцин против ЧП и ПВЭСоб,
- иммунобиологические свойства экспериментальных образцов вакцин против ЧП и ПВЭСоб в лабораторных и производственных условиях,
- уровень колостральных антител у щенков при ЧП и ПВЭСоб

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации были доложены и опубликованы в материалах «Актуальные проблемы науки в АПК 56-й международной научно-практической конференции» (Кострома, 2004), «XV Московского международного ветеринарного конгресса» (Москва, 2007) и докладывались на заседаниях ученого совета ФГУ «ВНИИЗЖ» в 2004-2007 гг

Публикация научных исследований. Основные результаты отражены в 7 опубликованных работах, в том числе 4 работы опубликованы в изданиях по перечню ВАК РФ

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы выполнены совместно с д.б.н. А.П. Пономаревым, к.б.н. О.П. Бядовской, м.н.с. А.Е. Вечеровым, за что автор выражает им сердечную благодарность

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты

собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения и приложения Работа иллюстрирована 8 рисунками и 12 таблицами Список используемой литературы включает 201 источник, в том числе 37 работ на русском языке

Исследования по диссертационной работе выполнялись в 2004-2007 гг в ФГУ «ВНИИЗЖ» Отдельные опыты были проведены в Центре животных «Валента» г Владимира

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Сбор и анализ эпизоотических данных по ЧП и ПВЭСоб был проведен на основании данных «Журналов по регистрации больных животных», «Историй болезни», которые ведутся в ветеринарных учреждениях города Владимира («Артемида», «Горветстанция», ЦЖ «Валента») и собственных лабораторных исследований заболеваемости животных за период 2004-2007гг Основным материалом для изучения эпизоотической обстановки в городе по выше указанным болезням являлись пробы сывороток крови, смывы с конъюнктивы и носовой полости, слюна, корочки с кожи и подушечек лап, фекальные массы, а также пробы из патологического материала в виде кусочков языка, кишечника с содержимым, печени, селезенки, сердца, взятые от подозреваемых собак по заболеванию ЧП и ПВЭСоб

Эпизоотологическое обследование и анализ полученных результатов проводили по методам эпизоотологического исследования, описанным Джупиной СИ (1991)

Вирусы В работе использовали вакциниальный штамм «Рокборт» вируса ЧП, вакциниальный штамм «R-72» вируса ПВЭСоб, штамм «Дан» возбудителя ПВЭСоб, штамм «Родники» возбудителя ВЭН, а также выделенные из патологического материала изоляты № 1 и № 2 возбудителя ПВЭСоб

Культуры клеток. На различных этапах применяли перевиваемые культуры клеток Vero (почки зелено-мартышки), ППК (почки поросенка), MDCK (почки собаки), CrFK (почки кошки), FS (селезенки кошки), ЭН (эмбриона норки) и первичнотрипсинизированные культуры клеток ПК (почки котенка), ПЩ (почки щенка), СК (селезенка котенка), ТК (тестикулы козленка)

Животные В работе использовали 644 беспородных и разных пород щенков собак 1-3 месячного возраста, 5 беспородных щенков собак и 5 котят 1-7 дневного возраста. Кроме того, было использовано 36 кроликов породы шиншилла массой 2,5-3,0 кг и 50 беспородных белых мышей массой 18-21 г.

Растворы и реактивы. При культивировании клеток и наработке вирусного материала использовали поддерживающие среды, приготовленные по стандартным прописям

Стерильность вирусных материалов и полученных вакцинных препаратов проверяли высевом на бактериальные среды тиогликоловую (ТГС), мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), согласно ГОСТу 28085-89

Инактивацию парвовируса проводили раствором димера аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ), pH до 7,2-7,4 доводили 70% раствором уксусной кислоты. Эффективность инактивации проверяли путем проведения трехкратных последовательных «слепых» пассажей в культуре клеток FS, при этом учитывали, что инактивированный вирус не должен вызывать накопление гемагглютининов от пассажа к пассажу

При постановке РГА и РТГА использовали фосфатно-буферный раствор (ФБР) с pH 6,4 и 6,6. Для определения гемагглютинирующего титра возбудителя ПВЭСоб ставили РГА с эритроцитами свиньи. Наличие специфических антител к возбудителю ПВЭСоб в сыворотках крови животных определяли в РТГА

Реакцию нейтрализации (РН) проводили по общепринятой методике

ИФА выполняли с помощью коммерческих наборов для определения антигенов ПВЭСоб и ЧП фирмы «Нарвак» (Россия) по прилагаемой инструкции по применению

Культивирование вирусов. Вирусы культивировали на полностью сформированных монослойных культурах клеток возбудитель ПВЭСоб (штамм «R-72») в к/кл ППК, возбудитель ПВЭСоб (штамм «Грей») в к/кл FS, выращенных в 1,5 л матрасах. Вирус ЧП (штамм «Рокборн») культивировали в к/кл Vero, выращенной в 3 л роллерных сосудах. Подбор чувствительных культур клеток для штамма «Грей» возбудителя ПВЭСоб осуществляли путем серийных пассажей

вируса в первичнотрипсинизированных культурах клеток ПК, ПЩ, СК, ТК и в перевиваемых культурах клеток ППК, МДСК, Vero, CrFK, FS, ЭН

Контроль вакции Готовые вакцины контролировали на стерильность, полноту инактивации, безвредность, антигенную и биологическую активность

Оценка эффективности экспериментальных образцов вакции против ЧП и ПВЭСоб. Изучение напряженности постvakцинального иммунитета против ПВЭСоб и ЧП проводили на беспородных щенках содержащихся в ЦК «Валента» г Владимира Ассоцииированную экспериментальную вакцину против ЧП и ПВЭСоб вводили животным в возрасте 1,5 месяцев Сыворотки крови исследовали на наличие вирусспецифических антител через 7, 14, 21, 30 дней и 3 месяца (срок наблюдения) Экспериментальную инактивированную сорбированную моновакцину против ПВЭСоб вводили щенкам 4-х недельного возраста Сыворотки крови исследовали на наличие вирусспецифических антител через 7, 14, 21, 30 дней, 3 и 6 месяцев (срок наблюдения)

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы STAT на PC IBM

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка эпизоотической ситуации по чуме плотоядных и парвовирусному энтериту собак в условиях г. Владимира за период 2004-2007 гг

В настоящее время в г Владимире зарегистрировано 1,8 тысяч собак При оценке результатов анализа эпизоотической ситуации по данным заболеваниям установлено, что за период 2004-2007 гг было зарегистрировано 162 случая заболевания ЧП, 205 – ПВЭСоб (рис 1) К данным инфекциям восприимчивы были все собаки, независимо от их породной принадлежности, однако четко прослеживалась зависимость заболеваемости животных от возраста. Наибольшую восприимчивость к заражению ЧП и ПВЭСоб проявляли щенки в послеотъемный период в возрасте от 1,5 месяцев и до 1,5 лет, также неиммунизированные животные, а к вирусу ЧП и взрослые собаки в возрасте 9-12 лет

Отмечено, что случаи заболевания собак ПВЭСоб за период 2004 - 2007 гг встречались чаще, чем ЧП Возможно, это связано с постоянной тенденцией к

увеличению числа бездомных животных в городе, а также циркуляцией полевых изолятов среди неиммунного поголовья собак.

Наибольший пик заболеваемости собак ЧП и ПВЭСоб отмечался весной и осенью.

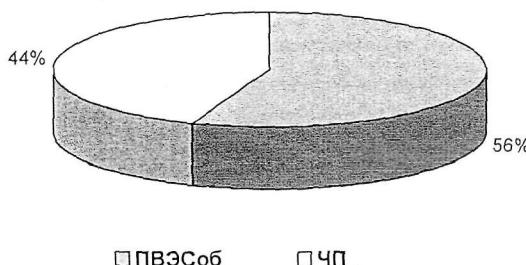


Рис.1. Заболеваемость собак парвовирусным энтеритом и чумой плотоядных в г. Владимире за 2004-2007гг.

Установлено, что заболеваемость собак ПВЭСоб и ЧП зависела от сезона года. Так, весной ПВЭСоб регистрировался в марте-мае, а в осенне-зимний период в октябре-декабре. Случаи ЧП регистрировались весной в марте-мае и в осенне-зимний период, начиная с сентября по декабрь.

Анализ исследований биоматериалов и сывороток крови собак при изучении ситуации по чуме плотоядных

Биоматериалы были отобраны от 290 собак со следующими клиническими признаками: отсутствие аппетита, угнетение, повышение температуры тела, истечения из глаз и носовой полости, рвота, понос, судороги. Были проведены исследования сывороток крови собак на наличие антител против ЧП в РН и проб биоматериалов (смычки с конъюнктивы и носовой полости, слюна, пробы крови, корочки с кожи и подушечек лап, кусочки органов) в ИФА на наличие антигена ЧП. Результаты лабораторных исследований проб на наличие антигенов в ИФА и вируснейтрализующих антител в РН, взятых от собак различного возраста, представлены в таблице 1.

Показано, что больные ЧП собаки имели разный уровень вируснейтрализующих антител в РН (низкий $\leq 2,0 \log_2$ или высокий $\geq 7,0 \log_2$). В ИФА все испытуемые пробы от больных животных дали положительную реакцию. А у собак, поступивших с такими же клиническими признаками и имевших разный

уровень вируснейтрализующих антител в РН, от низкого ($\leq 2,0 \log_2$) до высокого ($\geq 7,0 \log_2$), и в ИФА, не давших положительную реакцию, диагноз чумы плотоядных не подтвердился

Таблица 1
Результаты исследования проб биоматериалов от подозреваемых в заболевании ЧП собак в РН и ИФА

Возраст ж-ных	РН		ИФА				Выздоравлиющие ж-ные	
	Титр антител (\log_2)	Кол-во ж-ных	при жизни.		посмерт			
			наличие антигена ЧП	Кол-во ж-ных	наличие антигена ЧП	Кол-во ж-ных		
От 2 месяцев до 1 года	< 2,0	50	+*	50	+	5	72	
	5,0-7,0	15	-**	15	-	20		
	> 7,0	32	+	32	+	-		
Всего по группе		97	-	97	-	25	72	
От 2 до 4 лет	4,5-6,0	135	-	135	-	10	125	
Всего по группе		135	-	135	-	10	125	
От 9 до 12 лет	< 2,0	37	+	21	+	10	41	
	-	-	-	16	-	-		
	> 7,0	21	+	21	+	7		
Всего по группе		58	-	58	-	17	41	

* «+» – положительная реакция, **«-» – отрицательная реакция

Попытки выделения полевых изолятов вируса ЧП из патматериалов и адаптации их в культуре клеток были безуспешны. Были исследованы различные культуры клеток (Vero, HeLa, MDCK, BHK) на чувствительность к вирусу ЧП в течение 7 «слепых» пассажей. При исследовании проб зараженных культур клеток на наличие антигена ЧП в ИФА результаты были отрицательными.

Анализ исследований биоматериалов при изучении ситуации по парвовируспному энтериту собак

Пробы биоматериала (фекальные массы, кишечник, язык) были отобраны от 200 собак в возрасте от 1,5 месяца до 1 года, подозреваемых в заболевании ПВЭСоб и исследованных в РГА, ИФА и РТГА.

При исследовании в РГА из 200 отобранных проб в 38 отмечали отсутствие агглютинации, в 15 - титры колебались от 1:4 до 1:32 ГАЕ, при идентификации гемагглютинирующих агентов в РТГА со специфической иммунной сывороткой

кроликов, полученной на штамм «Дан» возбудителя ПВЭСоб получен отрицательный результат В остальных 147 пробах титры гемагглютининов составляли 1 8-1 32768 ГАЕ, а гемагглютинирующий агент был идентифицирован в РТГА как парвовирус

Выделение полевых изолятов возбудителя ПВЭСоб из патматериала

Для выделения возбудителя ПВЭСоб из патматериала использовали пробы фекалий, языка, сердца, печени, селезенки, кишечника и содержимого кишечника, взятые от павших или эвтаназированных щенков больных ПВЭСоб

Для исследования из данных проб патматериала готовили 10%-ную суспензию, которую затем центрифугировали Надосадочную жидкость исследовали на наличие вируса в ИФА и РГА

Установлено, что наибольшая концентрация вируса ПВЭСоб отмечалась в ИФА в пробах, приготовленных из языка, кишечника, фекалий, активность которого в РГА составляла 1 128 – 1 32768 ГАЕ, а в пробах, приготовленных из сердца, печени, селезенки, содержимого кишечника вирус выявить не удалось Следовательно, в качестве основного патматериала для выделения возбудителя ПВЭСоб пригодны пробы языка, кишечника и фекалий

Изучение иммунобиологических свойств полевых изолятов возбудителя

ПВЭСоб

В период 2005 г от 11 больных и павших беспородных щенков в возрасте 1,5-3 месяцев, содержащихся в приюте Центра Животных «Валента» г Владимира, с подозрением на заболевание ПВЭСоб, были отобраны 16 проб патматериала (фекалий, язык и кишечник), из них были приготовлены 10%-ные вируссодержащие суспензии При электронной микроскопии, проведенной совместно с д б н А П Пономаревым, в двух пробах, приготовленных из языка и кишечника, были выявлены вирусные частицы диаметром приблизительно 22 нм, морфологически сходные с парвовирусом собак Эти изоляты были обозначены, как изолят № 1 и изолят № 2 При постановке РГА титр парвовируса изолята № 1 составлял 1 4096 ГАЕ, а изолята № 2 - 1 2048 ГАЕ Специфичность была подтверждена в РТГА, ИФА и ПЦР

Для изучения патогенных свойств данных изолятов парвовируса использовали 13 клинически здоровых беспородных щенков 2-3 месячного возраста Перед

опытом животных выдерживали на голодной диете в течение 24 ч. Первой группе животных вводили изолят № 1, второй - изолят № 2 в виде 10%-ной вирусной суспензии однократно внутрь в объеме 20 см³ и внутривенно в объеме 5 см³ на каждое животное. Животным контрольной группы в количестве 3 голов вводили такими же способами микрофильтрат гомогената кишечника здорового щенка. После заражения щенков во всех случаях отмечали клиническую картину энтерита. Легкое переболевание наблюдали у щенков при введении внутрь и внутривенно изолята № 2, в фекалиях щенков парвовирус присутствовал на 2-3-е сутки, максимальное его выделение было на 5-6-е сутки в титре не превышающем 1 128 ГАЕ. У щенков при введении изолята № 1 наблюдали более выраженные клинические признаки болезни ПВЭСоб, в двух случаях со смертельным исходом. В фекалиях парвовирус обнаруживали на 2-е сутки, максимальное количество его было на 5-6-е сутки в титрах 1 256-1 4096 ГАЕ. На 9-10-е сутки в фекалиях щенков парвовирус не обнаруживали. У контрольных щенков, при совместном содержании с опытными, также в фекалиях обнаруживали парвовирус, который на 5 сутки выделяли в титрах 1 32-1 64 ГАЕ и максимальная его концентрация было в титрах 1 128 ГАЕ на 7-е сутки, а на 9-10-е сутки парвовирус не обнаруживали.

При исследовании сывороток крови щенков в РТГА, установлено, что после однократного введения опытным группам животных изолятов № 1 и № 2 вируса ПВЭСоб наблюдалось накопление антител к парвовирусу (рис 2).

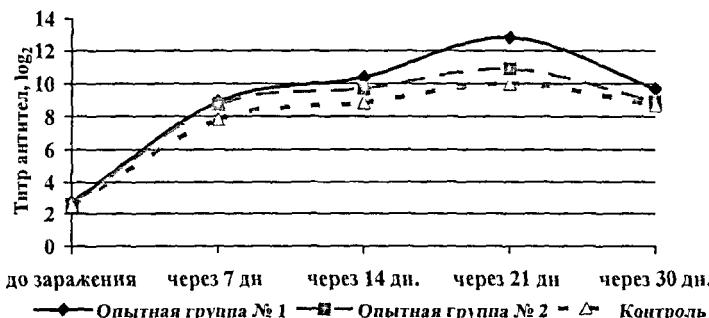


Рис. 2 Динамика накопления антител в сыворотке крови щенков в РТГА

Показано, что после введения вируса (изоляты № 1 и № 2) титр специфических антител в сыворотке крови щенков повышался и был

максимальным на 21 сутки и составлял $12,8 \pm 0,27 \log_2$ при инъекции изолята № 1, а при инъекции изолята № 2 уровень антител был $10,9 \pm 0,74 \log_2$. К 30 дню после заражения у всех опытных животных наблюдали снижение титра антител на $2,0-3,0 \log_2$. У контрольных щенков также были обнаружены антитела к возбудителю ПВЭСоб, которые повышались и на 21 сутки составляли $10,0 \log_2$, а к 30 дню титр антител к возбудителю ПВЭСоб снижался и составлял $8,5 \pm 0,5 \log_2$.

Для изучения антигенных свойств изолятов № 1 и № 2 использовали кроликов, которым вирусы вводили подкожно в виде 10%-ной суспензии в объеме 2 см^3 и внутримышечно в объеме 1 см^3 однократно. В опыте было 3 группы животных по 5 голов в каждой, одна из которых была контрольной. Первой группе инъцировали изолят № 1, второй группе - изолят № 2. Контрольным животным вводили такими же способами микрофильтрат гомогената кишечника здорового щенка. За животными наблюдали в течение 21 суток с еженедельным отбором проб крови для исследования сывороток на наличие специфических антител к ПВЭСоб (рис 3).

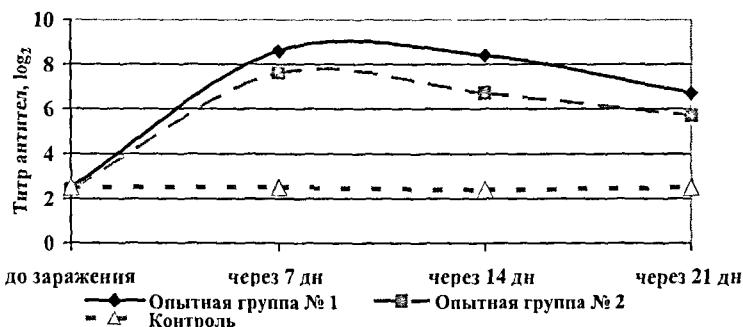


Рис 3 Динамика накопления антител в сыворотке крови кроликов в РТГА

У кроликов в опытных группах через 7 дней после введения изолятов уровень антител в сыворотке крови возрастал по сравнению с исходным и составлял в среднем по группе к изоляту № 1 – $8,6 \log_2$, а к изоляту № 2 – $7,6 \log_2$. К 21 дню происходило их постепенное снижение на $2,0 - 3,0 \log_2$ и уровень антител составлял в среднем по группе к изоляту № 1 – $6,7 \log_2$, а к изоляту № 2 – $5,7 \log_2$.

У контрольных животных при совместном содержании с опытными, повышения уровня специфических антител к ПВЭСоб не наблюдалось. При

исследовании фекалий лабораторных животных в РГА возбудитель ПВЭСоб не был обнаружен. Было установлено, что однократное внутримышечное введение вируса кроликам не вызывало у них каких-либо клинических признаков болезни, но индуцировало образование антигемагглютинирующих антител.

Выделение полевых изолятов парвовируса в культуре клеток

Для выделения парвовируса были использованы первичнотрипсинизированные и субкультуры клеток ПЩ, СК и перевиваемые культуры клеток MDCK, FS. Наиболее чувствительными оказались первичнотрипсинизированная культура клеток СК и перевиваемая культура клеток FS. Результаты выделения возбудителя ПВЭСоб изолятов № 1 и № 2 в культурах клеток ПЩ, СК, MDCK и FS представлены в таблице 2.

Таблица 2
Выделение полевых изолятов ПВЭСоб в культурах клеток

Кол-во пассажей	Титр, в РГА							
	Изолят № 1				Изолят № 2			
	ПЩ	СК	MDCK	FS	ПЩ	СК	MDCK	FS
1	1 16-	1 64-	1 32-	1 64-	1 16-	1 16-	1 16-	1 32-
	1 128	1 1024	1 128	1 1024	1 32	1 128	1 32	1 128
2	1 32-	1 64-	1 16-	1 128-	1 16-	1 64-	1 4-1 8	1 64-
	1 128	1 1024	1 64	1 4096	1 32	1 128		1 256
3	1 16-	1 128-	1 2-1 8	1 256-	1 4-	1 64-	< 1 2	1 128-
	1 32	1 1024		1 8192	1 8	1 512		1 512
4	1 4-	1 128-	< 1 2	1 512-	< 1 2	1 32-	-*	1 128-
	1 8	1 1024		1 8192		1 128		1 512
5	< 1 2	1 256-	-	1 512-	-	1 32-	-	1 256-
		1 1024		1 4096		1 128		1 512
6	-	1 64-	-	1 512-	-	1 64-	-	1 128-
		1 512		1 4096		1 128		1 512
7	-	1 64-	-	1 512-	-	1 16-	-	1 128-
		1 128		1 4096		1 64		1 512
8	-	1 64-	-	1 512-	-	1 16-	-	1 128-
		1 128		1 4096		1 64		1 512

*(-) – отрицательная реакция

При адаптации изолятов возбудителя ПВЭСоб к данным культурам клеток в течение 8 пассажей накопление гемагглютининов было не одинаковым. Высокие титры гемагглютининов наблюдались у изолята № 1 как в первичнотрипсинизированной и субкультуре клеток СК (1 128-1 1024 ГАЕ), так и в перевиваемой культуре клеток FS (1 256-1 8192 ГАЕ), в культурах клеток ПЩ и

MDCK максимальное их накопление составляло 1:32-1:128 ГАЕ, но к 3-му пассажу они снижались и при дальнейших пассажах не выявлялись.

У изолята № 2 накопление гемагглютининов было значительно ниже, так в первичнотрипсинизированной и субкультуре клеток СК (1:64-1:512 ГАЕ), в перевиваемой культуре клеток FS (1:128-1:512 ГАЕ), а при выделении в культурах клеток ПЦ и MDCK максимальный титр его составлял 1:16-1:32 ГАЕ и последующие пассажи не вызывали накопление гемагглютининов.

Идентификация изолята возбудителя ПВЭСоб методами электронной микроскопии и ПЦР

Для электронно-микроскопического исследования изолята № 1 ПВЭСоб была взята вирусодержащая суспензия с активностью 1:4096 ГАЕ в РГА, полученная после инфицирования 3-суточного монослоя культуры клеток FS с последующим концентрированием вируса.

Концентрированные препараты готовили путем осаждения с ПЭГ-6000 и дополнительным дифференциальным центрифугированием при 25000 об/мин в течение 1,5 ч. Электронно-микроскопическое исследование проводили совместно с д.б.н. А.П. Пономаревым. Вирус негативно контрастировали при помощи 4% фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) с pH=6,8, вироны были представлены однородными сферическими частицами диаметром 18-22 нм. Концентрация виронов существенно увеличивалась после дифференциального осаждения (рис. 4).

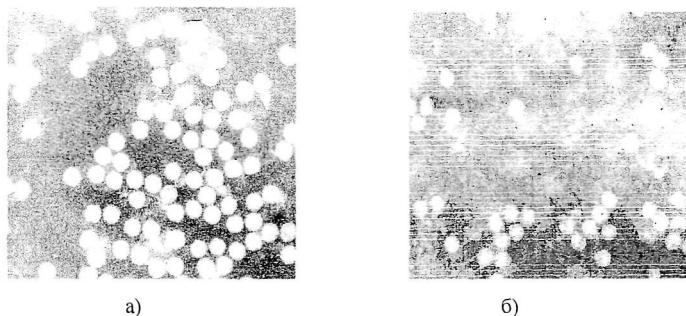


Рис. 4. Электронные микрофотографии виронов, выделенного изолята ПВЭСоб

Примечание: а) после осаждения вируса ПЭГ (8%); б) после дифференциального осаждения. ЭМ марки JEM 100-B (Япония). 4% ФВК, pH 6,8. Инструментальное увеличение 200000.

При электронно-микроскопическом исследовании была подтверждена принадлежность изолята № 1 возбудителя ПВЭСоб к семейству *Parvoviridae*. Проверку идентичности исследуемого материала к парвовирусу собак 2 типа проводили методом ПЦР (Pereira C.A.D. e.a.2000) совместно с м.н.с. А.Е. Вечеровым. В исследованиях использовали праймеры гена VP2 парвовируса собак 2 типа. Выделение ДНК осуществляли с использованием стекловолокнистых фильтров. Нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов кДНК определяли методом прямого секвенирования с использованием праймеров P2a и P2b (локализация: 3025-3045 н. и 3685-3706 н.).

Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле (рис.5).

Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Положительными считали пробы с длинной фрагмента около 680 п.н.

Первичная структура анализируемого участка генома исследуемого образца полностью идентична с таковой штаммов и изолятов парвовируса собак 2 типа, выделенных в разных регионах, представленных в компьютерной базе данных Gen Bank.

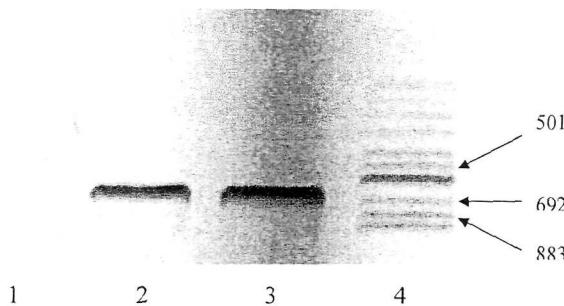


Рис. 5. Электрофорез продуктов ПЦР

Примечание: 1 – отрицательный контроль, 2 – изолят № 1, 3 – штамм «Дан» возбудитель ПВЭСоб, 4 – маркер pUC Mix Marker, (стрелками обозначены длины фрагментов п.н.).

Методами электронной микроскопии и ПЦР была подтверждена принадлежность изолята № 1 возбудителя ПВЭСоб к семейству *Parvoviridae*. Было подтверждено антигенное родство изолята № 1 при постановке перекрестной РТГА со специфическими сыворотками кроликов, полученными на штамм «Дан»

воздбудителя ПВЭСоб и штамм «Родники» воздбудителя ВЭН Выделенный вирус отличался более высоким гемагглютинирующем титром при культивировании в культуре клеток СК и FS, обладал более патогенными и антигенными свойствами, это дало основание для паспортизации и депонирования его в коллекции микроорганизмов ФГУ «ВНИИЗЖ» как штамм воздбудителя ПВЭСоб (изолят № 1), получивший авторское название «Грей»

Культивирование воздбудителя парвовирусного энтерита собак штамма

«Грей» и изучение его иммунобиологических свойств

Чувствительность различных культур клеток к воздбудителю ПВЭСоб

На начальных этапах исследования штамма «Грей» воздбудителя ПВЭСоб адаптировали к различным культурам клеток и определяли наиболее продуктивную клеточную систему для культивирования с целью изучения его биологических свойств Чувствительность данных культур к вирусу определяли по уровню накопления в них гемагглютининов в процессе 5 последовательных пассажей Активность воздбудителя ПВЭСоб определяли в РГА Полученные результаты приведены в таблице 3

Таблица 3

Чувствительность различных первичных и перевиваемых культур клеток к воздбудителю ПВЭСоб в РГА

Культура клеток	Пассажи				
	1	2	3	4	5
ПЩ	1 16-1 128	1 32-1 128	1 16-1 32	1 4-1 8	< 1 2
ПК	1 64-1 512	1 64-1 512	1 128-1 512	1 64-1 128	1 64-1 128
СК	1 64-1 1024	1 64-1 1024	1 128-1 1024	1 64-1 128	1 64-1 128
ТК	1 16-1 32	1 4-1 8	< 1 2	-*	-
MDCK	1 32-1 128	1 16-1 64	1 2-1 8	< 1 2	-
CrFK	1 128-1 512	1 128-1 1024	1 256-1 4096	1 256-1 2048	1 128-1 1024
FS	1 64-1 1024	1 128-1 4096	1 256-1 8192	1 512-1 8192	1 512-1 4096
Vero	1 8-1 16	1 2-1 4	< 1 2	-	-
ППК	1 16-1 32	1 4-1 16	< 1 2	-	-
ЭН	1 32-1 128	1 8-1 16	< 1 2	-	-

*«-» - отрицательная реакция

Показано, что более чувствительными культурами клеток к вирусу были кошачьи линии клеток (СК, ПК, CrFK и FS), гемагглютинины в них накапливались в процессе 5 последовательных пассажей в высоких титрах (1 128-1 8192 ГАЕ), в

культурах (ПЩ, ТК, MDCK, Vero, ППК, ЭН) они снижались уже к 3-му пассажу (1 2-1 32 ГАЕ) или вообще не наблюдались. Видимого цитопатического действия ни в одной из культур клеток вирус не проявлял. По нашим данным, в качестве наиболее перспективной для репродукции этого вируса, является перевиваемая культура клеток FS, максимальное его накопление наблюдалось на 4-5 пассаже в титре 1 512-1 8192 ГАЕ. Применение первичнотрипсинизированных и субкультур клеток не удобно и не экономично из-за сезонности получения доноров ткани, а также невозможности длительного пассирования вируса *in vitro* вследствие низкой технологичности данных культур. Однако, первичнотрипсинизированные культуры клеток ПК или СК могут быть использованы для освежения указанного вируса при культивировании его методом перемежающихся пассажей.

Таким образом, в дальнейшем в качестве системы культивирования для штамма «Грей» вируса ПВЭСоб использовали культуру клеток FS.

Изготовление экспериментальных образцов инактивированной сорбированной вакцины против ПВЭСоб и изучение ее свойств

С целью определения оптимального количества парвовирусного антигена в инактивированной сорбированной вакцине была проведена серия опытов на лабораторных и восприимчивых животных с вакцинами, содержащими антиген с различной гемагглютинирующими активностью.

Для этого при изготовлении экспериментальных образцов вакцины использовали инактивированный парвовирусный антиген с различным гемагглютинирующим титром. Было установлено, что при введении лабораторным и восприимчивым животным вакцин с различной активностью вируса прослеживалась тенденция к увеличению титра антител в сыворотках крови с повышением гемагглютинирующей активности парвовируса в вакцине.

У кроликов самый высокий титр антител в среднем составлял $10,50 \pm 0,50$ - $11,66 \pm 0,28 \log_2$ при введении вакцины с гемагглютинирующей активностью вируса $9,0$ - $11,0 \log_2$ соответственно.

Аналогичные исследования были проведены на восприимчивых животных. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Уровень накопления антител у щенков на введение опытных образцов инактивированной сорбированной вакцины против ПВЭСоб с разной активностью

Активность вируса, \log_2 в РГА	Титр антител, \log_2 в РТГА	
	до иммунизации	через 21 день
5,0	$5,25 \pm 0,35$	$5,25 \pm 0,35$
6,0	$4,75 \pm 0,35$	$7,5 \pm 0,70$
7,0	$4,75 \pm 0,35$	$7,5 \pm 0,70$
8,0	$5,25 \pm 0,35$	$9,5 \pm 0,70$
9,0	$5,25 \pm 0,35$	$10,0 \pm 0$
10,0	$5,25 \pm 1,06$	$10,25 \pm 0,35$
11,0	$4,75 \pm 0,35$	$10,25 \pm 0,35$

Как показали результаты исследований, представленные в таблице 4, при введении щенкам опытной инактивированной вакцины против ПВЭСоб с активностью вируса 5,0 \log_2 выявить прирост антител не удалось, а при введении вакцины с активностью парвовируса 6,0-8,0 \log_2 получили прирост антител на уровне $7,5 \pm 0,70$ - $9,5 \pm 0,70$ \log_2 , соответственно, который соответствовал защитному уровню. При введении вакцины с активностью вируса 9,0-11,0 \log_2 титр антител составлял $10,25 \pm 0,35$ \log_2 .

Изучение динамики накопления вирусспецифических антител против ЧП и ПВЭСоб при вакцинации собак

Заключительным этапом нашей работы была оценка эффективности применения ассоциированных вакцин против ЧП и ПВЭСоб, изготовленных разными производителями.

Для исследования были взяты ассоциированные вакцины отечественного производства «Биовак DPA», «Мультикан-4», «Ассоциированная вакцина против чумы плотоядных, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита» и зарубежного производства «Гексадог», «Нобивак PUPPY DP», «Нобивак DHPPi», «Вангард 7», «Вангард 5L», содержащие в своем составе антигены ЧП и ПВЭСоб. Опыты проводились на щенках собак разных пород.

После применения вакцин у всех иммунизированных животных наблюдался высокий уровень антител, который составлял к вирусу ЧП $5,5\text{-}7,5 \log_2$, а к возбудителю ПВЭСоб $7,5\text{-}9,5 \log_2$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что исследуемые вакцины против чумы плотоядных и парвовирусного энтерита, обладали выраженной антигенной активностью.

Кроме того, в сравнительных опытах изучали антигенную активность производственной серии вакцины, изготовленной в ФГУ «ВНИИЗЖ», состоящей из двух компонентов: лиофилизированной живой против ЧП (штамм «Рокборн»), ПВЭСоб (штамм «R-72») и растворителя; и экспериментальной вакцины, состоящей из двух компонентов: жидкой инактивированной сорбированной против ПВЭСоб (штамм «Грей») и лиофилизированной живой против ЧП (штамм «Рокборн»). А также мы изучали антигенные свойства моновалентных вакцин, состоящих из: лиофилизированной живой против ПВЭСоб (штамм «R-72») и инактивированной сорбированной против ПВЭСоб (штамм «Грей») на беспородных щенках. Результаты исследований представлены на рисунке 6.

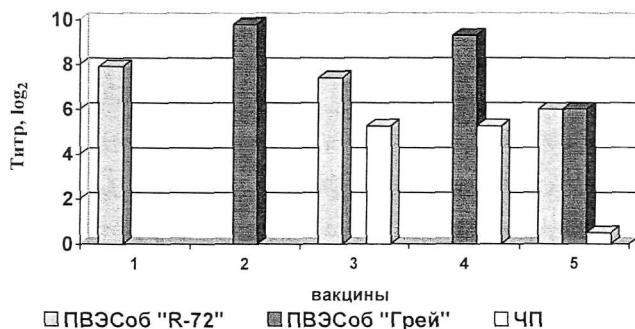


Рис. 6. Показатели антигенной активностиmono- и ассоциированных вакцин против болезней плотоядных

Примечание: 1 - вакцина против ПВЭСоб (штамм «R-72»), 2 - против ПВЭСоб (штамм «Грей»), 3 - ассоциированная вакцина против ЧП (штамм «Рокборн») и ПВЭСоб (штамм «R-72»), 4 - ассоциированная вакцина против ЧП (штамм «Рокборн») и ПВЭСоб (штамм «Грей»), 5 - титр антител до вакцинации.

После иммунизации экспериментальной и производственной вакцинами, содержащими в своем составе антиген чумы плотоядных, титр антител к вирусу

ЧП в сыворотке крови щенков находился приблизительно на одном уровне и составлял в среднем $5,25 \pm 0,35 \log_2$. Уровень антител к возбудителю ПВЭСоб (штамм «R-72») в сыворотке крови животных, вакцинированных моновалентной вакциной, составлял в среднем $7,9 \pm 0,36 \log_2$, при иммунизации вакциной производственной серии против ЧП и ПВЭСоб титр антител к парвовирусу был в среднем $7,4 \pm 0,41 \log_2$. У животных, иммунизированных экспериментальной инактивированной сорбированной моновалентной вакциной уровень антител к возбудителю ПВЭСоб был выше и составлял $9,8 \pm 0,27 \log_2$, при введении экспериментальной вакцины против ЧП и ПВЭСоб титр антител к парвовирусу также был высоким и в среднем составлял $9,3 \pm 0,57 \log_2$. У контрольных животных уровень антител к возбудителю ПВЭСоб оставался в пределах $6,0 \log_2$.

Анализ полученных результатов показал, что исследуемые вакцины против чумы плотоядных и парвовирусного энтерита обладали выраженной антигенной активностью, но более выраженные результаты наблюдались при иммунизации вакцинами экспериментальной инактивированной сорбированной моновалентной и экспериментальной ассоциированной против ЧП и ПВЭСоб, содержащими в своем составе антиген парвовируса штамма «Грей».

Для изучения сроков формирования и напряженности иммунитета у животных к возбудителю ЧП и ПВЭСоб после вакцинации экспериментальной вакциной против ЧП и ПВЭСоб в 2006-2007 гг нами были проведены испытания на 48 щенках собак, содержащихся в ЦЖ «Валента» г Владимира. Вакцинацию щенков проводили в возрасте 1,5 месяцев двукратно с интервалом в 21 день подкожно в область холки. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Показано, что испытуемая вакцина создает напряженный иммунитет по отношению к возбудителю парвовирусного энтерита собак и чумы плотоядных. Титр антител после двукратной вакцинации составлял в среднем $10,63 \pm 0,44 \log_2$ к возбудителю ПВЭСоб и сохранялся в течение 3-х месяцев на уровне $9,48 \pm 0,44 \log_2$. Титр вируснейтрализующих антител к вирусу ЧП через 21 день после второй вакцинации в среднем составил $6,47 \pm 0,24 \log_2$ и сохранялся на высоком уровне на протяжении 3-х месяцев (срок наблюдения).

Таблица 5

Уровень антител к вирусу ЧП и ПВЭСоб в сыворотке крови щенков, иммунизированных экспериментальной вакциной

Возраст животных	Средний титр, \log_2			
	Опыт		Контроль	
	ЧП	ПВЭСоб	ЧП	ПВЭСоб
1 месяц	1,73±0,25	7,63±0,39	1,53±0,22	7,63±0,43
1,5 месяца Первая вакцинация	1,11±0,21	6,53±0,43	1,16±0,23	6,50±0,45
Через 7 дней	1,95±0,50	6,55±0,42	<1,0	6,50±0,33
Через 14 дней	3,55±0,25	7,75±0,32	<1,0	6,33±0,23
Через 21 день Вторая вакцинация	4,32±0,22	9,57±0,41	<1,0	5,31±0,43
Через 7 дней	5,57±0,35	9,59±0,39	<1,0	5,31±0,35
Через 14 дней	6,53±0,17	10,51±0,41	<1,0	5,36±0,38
Через 21 день	6,47±0,24	10,63±0,44	<1,0	5,28±0,35
Через 3 месяца после второй вакцинации	6,28±0,19	9,48±0,44	<1,0	5,29±0,36

Следующий этап работы заключался в определении порога восприимчивости щенков к возбудителю ПВЭСоб и оптимальных сроков вакцинаций против ПВЭСоб. Для этого у 6-ти щенков одного помета отбирали кровь, начиная с 4-х недельного возраста каждую неделю, затем в возрасте 2, 2,5, 4,5 и 6 месяцев для исследования сывороток на наличие колостральных антител против возбудителя ПВЭСоб в РТГА (рис 7)

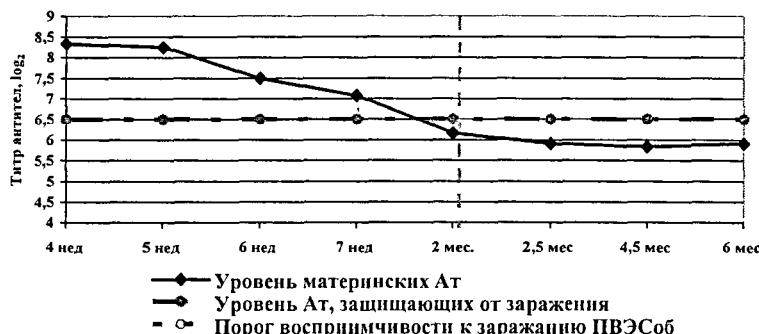


Рис 7 Динамика снижения уровня колостральных антител в сыворотке крови щенков

Показано, что защитный уровень материнских антител начинал снижаться с 5-ти недельного возраста, в 2-х месячном возрасте титр был $6,16 \pm 0,40 \log_2$, при наличии такого титра антины становятся восприимчивыми к парвовирусному энтериту

Для изучения эффективности вакцинации щенков инактивированной сорбированной вакциной против ПВЭСоб из штамма «Грей» с наличием высокого уровня колостральных антител нами были проведены опыты на 12 беспородных щенках одного помета

Вакцинация щенков в 4-х недельном возрасте не ведет к высокому накоплению титра антины после первой иммунизации, но через 21 день после повторной иммунизации уровень антины к возбудителю ПВЭСоб составлял в среднем $9,25 \pm 0,75 \log_2$ в 2-х месячном возрасте и к 6-ти месячному возрасту он начинал снижаться и составлял $8,25 \pm 0,27 \log_2$ (срок наблюдения) И наоборот, в ранее проведенных опытах по иммунизации щенков с 1,5-го месячного возраста (табл. 5), уровень антины к возбудителю ПВЭСоб уже после первой иммунизации к 21 дню составлял $9,57 \pm 0,41 \log_2$ и сохранялся на высоком уровне в течение 6 месяцев (срок наблюдения)

Следовательно, иммунизацию щенков инактивированной сорбированной вакциной против ПВЭСоб в раннем возрасте в присутствии высокого титра колостральных антины проводить возможно, это может исключить вероятность естественного инфицирования щенков после 2-х месячного возраста полевыми вирусами ПВЭСоб

3. ВЫВОДЫ

- 1 Анализ эпизоотической обстановки по заболеваемости чумой плотоядных и парвовирусным энтеритом собак в г. Владимире, осуществленный в период 2004-2007 гг показал, что данные болезни широко распространены среди поголовья собак. За указанный период было зарегистрировано 162 случая заболевания чумой плотоядных и 205 – парвовирусного энтерита собак
- 2 Установлено, что к данным инфекциям восприимчивы собаки, независимо от их породной принадлежности. Прослеживалась четкая зависимость заболеваемости животных от возраста. Наибольшую восприимчивость к заражению чумой плотоядных и парвовирусным энтеритом собак проявляли щенки в послеотъемный

период в возрасте от 1,5 месяцев и до 1,5 лет, а к вирусу чумы плотоядных - и взрослые собаки в возрасте 9-12 лет

3 Отмечено, что парвовирусный энтерит собак регистрировался в марте-мае, а также в октябре-декабре. Заболевание чумой плотоядных устанавливалось в марте-мае и в осенне-зимний период, начиная с сентября по декабрь

4 Определены оптимальные условия выделения полевых изолятов парвовирусного энтерита собак из патологических материалов. Наибольшая концентрация парвовируса выявлялась в пробах, приготовленных из языка, кишечника и фекалий

5 При выделении из проб патматериала полевых изолятов парвовирусного энтерита собак, отобраны наиболее чувствительные первичнотрипсиированные культуры клеток ПК, СК и перевиваемые культуры клеток CrFK, FS

6 Подтверждена специфичность и изучены иммунобиологические свойства штамма «Грей» возбудителя парвовирусного энтерита собак. Оптимизированы условия его культивирования в культуре клеток FS, обеспечивающие получение больших объемов вирусодержащего материала с титром не ниже $10,0 \log_2$ в РГА, пригодного для производства высокоспецифичных биопрепаратов

7 Установлено, что приготовленная экспериментальная инактивированная сорбированная вакцина против парвовирусного энтерита собак из штамма «Грей» была безвредной и ареактогенной для щенков собак, не контагиозной при совместном содержании вакцинированных и серонегативных животных и обладала выраженной антигенной активностью

8 Определено оптимальное содержание парвовирусного антигена в прививной дозе экспериментальной инактивированной вакцины против парвовирусного энтерита собак, с активностью парвовируса в вакцине не ниже $10,0 \log_2$ в РГА, обеспечивающее напряженный иммунитет у щенков

9 Показано, что у животных после применения экспериментальной инактивированной сорбированной вакцины формировался иммунитет, который по напряженности не уступал иммунитету, сформированному при применении стандартной производственной лиофилизированной вакцины

10 Установлена целесообразность применения экспериментальной инактивированной сорбированной вакцины для профилактики парвовирусного

энтерита собак в раннем возрасте в присутствии колостральных антител в титре более $7,0 \log_2$ в РТГА

4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования рекомендуются следующие методические указания, которые одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «ВНИИЭЖ» (16 07 2007 г.)

- «Методические указания по выделению парвовируса собак в культуре клеток»,
- «Методические указания по определению антигена парвовируса собак в вирусодержащем материале»,
- «Методические указания по выявлению антител к парвовирусу в сыворотках крови собак»

На производственный штамм «Грей» возбудителя ПВЭСоб составлен паспорт и депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, получена справка о депонировании ФГУ «ВГНИКИ» от 06 05 2008 г Штамм «Грей» парвовируса собак хранится в Коллекции экзотических типов ящура и других патогенов животных ФГУ «Федерального центра охраны здоровья животных»

Данные, полученные в результате анализа эпизоотической обстановки в г Владимира по ЧП и ПВЭСоб и в ходе серологических исследований при изучении антигенных свойств вирусов ЧП и ПВЭСоб в составе вакциниальных препаратов, вошли в нормативную документацию утвержденную заместителем Руководителя Россельхознадзора от 21 04 2008 г

- СТО «Вакцина ассоциированная против парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и чумы плотоядных»,
- Инструкция по применению вакцины ассоциированной против парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и чумы плотоядных

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 Влияние дополнительного компонента на антигенность ассоциированной вакцины против болезней плотоядных / Н В Мороз, В Ю Фоменко, Л А Глобенко, Т С. Галкина, В Ю Антипова // Актуальные проблемы науки в АПК Мат 56-й междунар научно-практ конф - Кострома, 2004 – Т 2 - С 114-116

- 2 Усовершенствование технологии изготовления ассоциированных вакцин против вирусных болезней плотоядных / Н В Мороз, В Ю Фоменко, Л А Глобенко, В М Захаров, Т С. Галкина, Ю В Антипова // Труды Федерального центра охраны здоровья животных – Владимир, 2005 – Т 4 – С 241-247
- 3 Галкина, Т.С. Динамика накопления вирусспецифических антител против чумы плотоядных и парвовирусного энтерита при вакцинации собак / Т С Галкина, Л А Глобенко, Н В Мороз // Ветеринарная патология - 2006 - №4 - С 149-152
- 4 Галкина, Т.С. Эпизоотическая ситуация по чуме плотоядных у собак в условиях г. Владимира / Т С. Галкина, Л А Глобенко, Н В Мороз // Ветеринарная патология - 2006 - №4 - С 147-149
- 5 Галкина, Т.С Изучение и оптимизация условий выделения возбудителя парвовирусного энтерита собак / Т С Галкина, Л А Глобенко // Всероссийский конгресс 15-й Международный ветеринарный конгресс по болезням мелких домашних животных - М , 2007 - С 4 - 5
- 6 Галкина, Т С. Изучение биологических свойств полевых изолятов парвовируса собак / Т С. Галкина // Ветеринарная патология - 2007 - №3 – С 51-55
- 7 Галкина, Т С Эпизоотическая ситуация по парвовирусному энтериту у собак в г. Владимире / Т.С. Галкина, Л А Глобенко // Ветеринарная патология - 2007 - №3 – С 55-57