

На правах рукописи

МАГДЕЕВА ЭЛЬВИРА АДИПОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ
ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО
РИНОТРАХЕИТА И ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

КАЗАНЬ – 2016

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Галиуллин Альберт Камилович

Официальные оппоненты: **Плешакова Валентина Ивановна** - доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Спиридонов Геннадий Николаевич - доктор биологических наук, заведующий лабораторией бактериальных инфекций ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный аграрный университет»,

Защита диссертации состоится «___» февраля 2017 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ имени Н.Э. Баумана и на сайте <http://www.kgavm.senet.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук

Трофимова Елена Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Диагностика, профилактика и ликвидация респираторных заболеваний крупного рогатого скота являются одной из актуальных проблем ветеринарной медицины. По своему распространению, смертности, вынужденному убою, снижению прироста массы тела они превалируют над всеми остальными инфекциями крупного рогатого скота. (Ю. А. Костыркин, 2005).

Респираторные заболевания крупного рогатого скота распространены во многих странах мира. Так, относительное количество неблагополучных по инфекционному ринотрахеиту стад крупного рогатого скота во Франции составляет 10 %, Испании – 60 %, Бельгии – 63 %, Нидерландах – 70 %.

После массового завоза племенного скота в 70-е и 80-е годы прошлого столетия респираторные болезни крупного рогатого скота широко распространены и на территории России (В.А. Аликаев, 1986; Ю.А. Костыркин, 2007).

Наибольшее значение из них имеют инфекционный ринотрахеит (ИРТ), парагрипп-3 (ПГ-3) и вирусная диарея - болезнь слизистых (ВД БС) (О.Г. Петрова, 2012; А.Г. Глозов, 2002; В.Г. Гумеров, 2016).

Возбудители респираторных заболеваний крупного рогатого скота, каждый в отдельности, но особенно в ассоциациях, угнетают отдельные звенья иммунной системы - как клеточные, так и гуморальные. Для увеличения сохранности молодняка актуальными остаются препараты, стимулирующие естественную резистентность и иммунореактивность организма (Топурия Г.М., 2010).

Степень разработанности темы. В условиях современного промышленного скотоводства одним из наиболее эффективных способов профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота является вакцинация.

Поэтому поиск наиболее иммуногенной вакцины, разработка способов повышения эффективности вакцинации является одной из приоритетных задач ветеринарии (N. Wanich, 2010).

Липосомальные структуры используют во многих отраслях медицины как новое, перспективное направление, позволяющее изготовить лекарственные препараты на их основе (С.М. Шульга, 2013).

Благодаря сходству с клеточными мембранами липосомы не токсичны, заключенное в них вещество защищено от разбавления и деградации в крови. Антигены могут включаться в липосомы в растворимой водной фазе или прикрепляться к мембране, что обуславливает снижение их токсичности и более продолжительную циркуляцию. Антигены, включенные в состав поверхностной мембраны липосом, потенцируют иммунный ответ на включенный в них бактериальный, вирусный или паразитарный антиген. Иммуногенное свойство возникает благодаря медленному освобождению

антигена и способности везикул со связанным антигеном мигрировать в региональные лимфатические узлы и потенцировать иммунный ответ (В.Ф. Учайкин, 2001).

Поэтому поиск новых иммуностимулирующих препаратов и введение их в состав вакцинных композиций - одна из актуальных задач ветеринарии, решение которой открывает новые пути к более эффективной профилактике многих заболеваний (Г.Ф. Коромыслов, 1983).

Цель и задачи. Целью исследований явилась разработка технологии изготовления и контроля инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, изучение её биологических свойств и определение профилактической эффективности вакцины в производственных условиях.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Изыскать оптимальный способ получения липосомальных структур;
2. Изучить биологические свойства выделенных липосомальных структур;
3. Теоретически и экспериментально обосновать необходимость создания инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота;
4. Разработать технологию изготовления и контроля инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота;
5. Определить профилактическую эффективность инактивированной липосомальной вакцины в производственных условиях;
6. Рассчитать экономическую эффективность применения инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Научная новизна результатов исследований. Впервые разработаны способы изготовления и изучены биологические свойства моновалентной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота и ассоциированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, отвечающих требованиям к препаратам, вводимым парентерально по показаниям безопасности и эффективности. При испытании данных вакцин в опытах на лабораторных животных показана их безвредность и установлена высокая антигенная активность.

Научно обоснована и экспериментально подтверждена иммунизирующая доза, способ введения и схема применения липосомальных вакцин.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в расширении знаний об иммуностимулирующих свойствах липосом.

Созданные вакцины обосновывают перспективность дальнейших исследований по углубленному изучению иммуностимулирующих свойств липосомальных структур.

Проведена комплексная сравнительная оценка гематологических и биохимических показателей, изучена напряженность иммунитета у опытных животных. Теоретически и практически обоснована высокая профилактическая эффективность применения липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота в производственных условиях.

Методология и методы исследования. Методологической основой проведенных исследований явилось обоснование конструирования вакцин на основе липосомальных структур для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Исследования проводились с использованием вирусологических, биологических, серологических и статистических подходов.

Подробное описание методологии и методов проведения исследований отражены в главе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделение и изучение биологических свойств липосомальных структур;
2. Конструирование инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота и изучение её антигенной активности на лабораторных животных;
3. Изучение иммунобиологических свойств ассоциированной инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота в лабораторных условиях;
4. Результаты изучения профилактической эффективности инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота в производственных условиях.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом выполненных исследований с использованием современных методов.

Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и доложены на Международных научных конференциях «Актуальные вопросы зоотехнии и ветеринарной медицины: опыт, проблемы, и пути их решения», Казань, 2015;

- «Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры», Саратов, 2016;

- «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования», Казань, 2016.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в числе которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК России.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена в 117 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов исследований, заключения, практических предложений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 12 рисунками. Список литературы включает 148 источников, из них 94 отечественных и 54 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре микробиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ).

Вирусы. При изготовлении экспериментальных серий вакцин использовали антигены вируса парагриппа-3 – штамм «ПТК- 45/86» и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота – штамм «ТК-А (ВИЭВ) - В2».

Животные. Для исследований в лабораторных условиях были отобраны 131 гол. белых беспородных мышей массой тела 16 - 20 г. и 96 кроликов живой массой 2,0-2,5 кг. В производственных условиях опыты проводились на 175 гол. крупного рогатого скота. Животные подобраны по принципу аналогов и находились в одинаковых условиях содержания и кормления.

Диагностические наборы: Иммуноферментная тест-система «ИФА-АНТИ-ИРТ» изготовленная в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»;

Набор диагностикума парагриппа-3 крупного рогатого скота в РТГА изготовленный в ФГУ «Курская биофабрика - фирма «БИОК».

Антитела к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота также определяли в реакции нейтрализации (РН) на перевиваемой линии культуры клеток MDBK с использованием вакцинного штамма «ТК-А (ВИЭВ)-В2» герпесвируса типа I крупного рогатого скота;

Выделение липосом. Основной компонент для получения липосом – фосфатидилхолин (лецитин), получали из куриного желтка.

Аппаратура: - Для ультразвуковой обработки антигенов ПГ-3 и ИРТ использовали аппарат UM-4 фирмы "Unitra" (емкость ванны 4 дм³, частота 25 кГц).

Для выпаривания и получения липидной пленки использовали роторный испаритель RVO-64 (Чехословакия).

Ультраструктуру липосомальных везикул изучали под электронным микроскопом JEM 100CX-2 («Jeol» Japan) методом негативного контрастирования.

Определение стерильности препаратов проводили на питательных средах, по ГОСТ 28085 и согласно «Руководству МЭБ по стандартам для диагностических тестов и вакцин» на бактериальное загрязнение, исключение контаминации грибами и микоплазмами.

Безвредность липосомальных структур определяли на белых лабораторных мышах, методом введения различных доз вакцин.

Определение концентрации белка. Концентрацию антигена в экспериментальных сериях вакцин оценивали при помощи спектрофотометра СФ-46 по формуле:

$$C = \frac{A - B}{2,51} \times P.$$

где С – количество белка, мг/мл;

А – показатель оптической плотности при длине волны 235 нм;

В – показатель оптической плотности при длине волны 280 нм;

Р – разведение пробы.

Цифровой материал обрабатывали с помощью программного комплекса Microsoft Excel 2007, с вычислением средних арифметических (М), их среднестатистических ошибок (m) и критерия достоверности (р); цифровые данные оценивали с применением степени достоверности по Стьюденту.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Клинико-эпизоотологический и серо-иммунологический мониторинг респираторных заболеваний в хозяйстве

Диагностика респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота основывалась на проведении комплексных клинико-эпизоотологических, патологоанатомических, серо-иммунологических, вирусологических и бактериологических исследований.

В период с 2013 по 2016 гг. исследовано 135 проб сыворотки крови, полученных от невакцинированных против респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота: коровы 50, нетели 25 и телята каждой возрастной группы по 20 проб сыворотки крови.

Результаты серологических исследований представлены на рисунке 1.

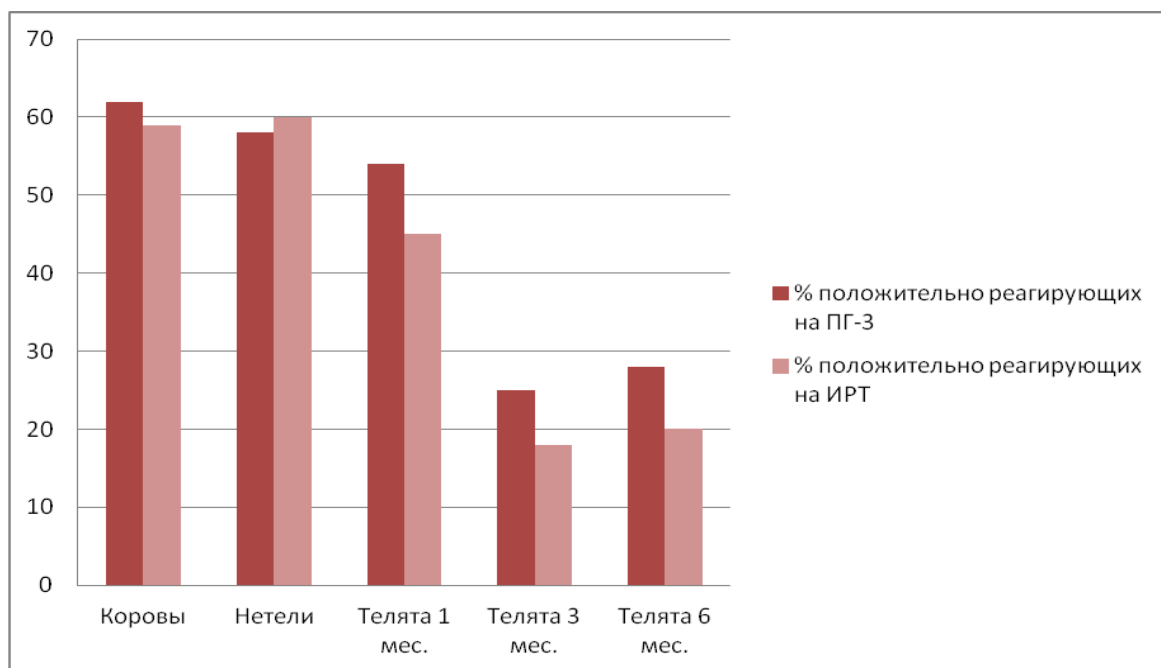


Рисунок 1 - Структура положительно реагирующих проб сывороток крови крупного рогатого скота в отношении герпесвирусной типа I и парагриппа-3 крупного рогатого скота

В результате проведенных исследований установлена высокая серопозитивность проб крови к антигенам вируса парагриппа-3 (62,0 %) и герпесвирусу типа I - (60 %) крупного рогатого скота.

2.2.2 Мониторинг сезонности респираторных инфекций в хозяйстве

Вспышки респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в ООО «Кутлушкино» Чистопольского района РТ чаще всего регистрировались в зимне-весеннее и осенне-зимнее время (рисунок 2). Заболеваемость животных с клиническими признаками ИРТ повышалась с начала января и постепенно снижалась к середине апреля, следующая волна роста числа заболеваний регистрировалась с середины октября и до конца ноября.

Рост заболеваемости животных с признаками инфицирования их вирусом ПГ-3 наблюдали в зимне - весенний период, с начала февраля и до середины марта, с последующим его снижением к концу апреля. Второй пик роста заболеваемости животных парагриппом-3 приходился на осенний период, а именно конец августа - середина ноября.

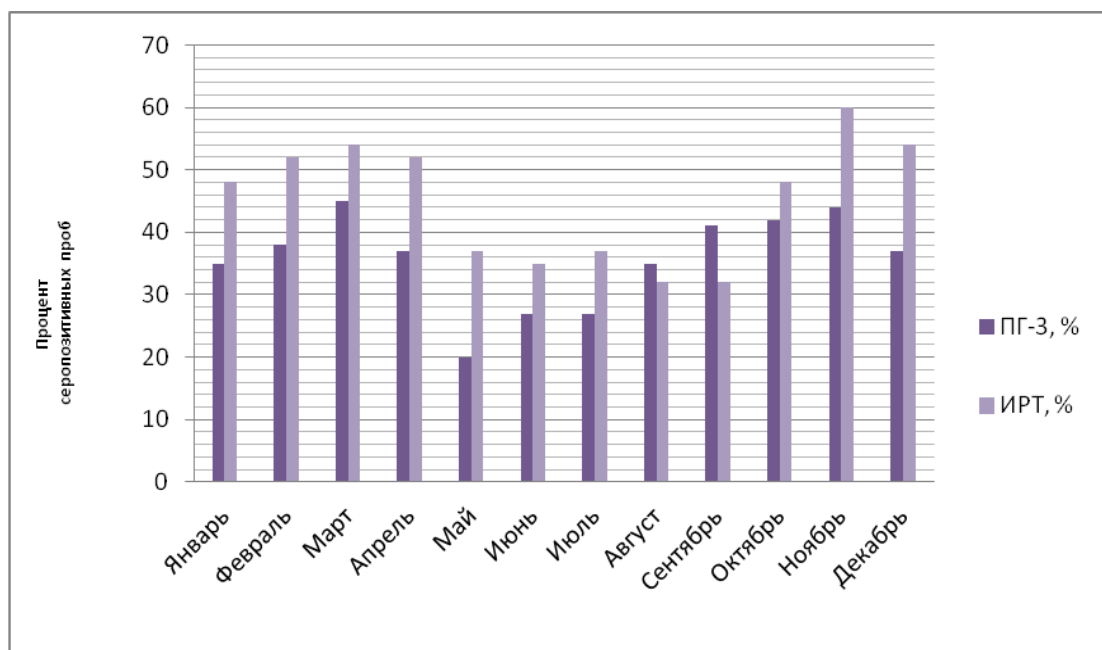


Рисунок 2 – Мониторинг сезонности проявления респираторных инфекций в исследуемом хозяйстве

В исследуемом хозяйстве для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота используется коммерческая вакцина – инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота (КОМБОВАК-Р).

Нами были проведены опыты по определению напряженности иммунитета у телят после применения данного биопрепарата (таблица 1).

С этой целью были отобраны по принципу аналогов 20 телят 30-дневного возраста. Вакцину вводили внутримышечно в дозе 2,0 см³, с последующей ревакцинацией через 20 дней, согласно инструкции по её применению. Серологические исследования проб крови вакцинированных животных проводили на 20, 60, 120 и 180 дни после вакцинации.

На основании результатов серологических исследований, установлен достоверный рост титров антител к вирусным антигенам к 60-дням исследования, (ПГ-3 – 9,30 log₂, ИРТ – 5,30 log₂) с постепенным их снижением к 180-суткам.

Таблица 1 – Напряженность иммунитета у телят при применении коммерческой вакцины (\log_2 , n=20)

Телята в возрасте 30 суток и старше	Сроки наблюдения (дни)			
	20	60	120	180
	Титр антител в РТГА на ПГ-3			
	4,5±0,16	9,30±0,20***	7,80±0,22***	5,50±0,12**
	Титр антител в РН на ИРТ			
	2,90±0,13	5,30±0,17***	4,40±0,12***	2,80±0,12

Примечание: **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$

Таким образом, иммунизированные животные сохраняли напряженный иммунитет против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота до 6 месяцев после вакцинации с последующим снижением титра антител.

Учитывая вышеизложенное, перед нами была поставлена задача усовершенствовать на основании новых технологий ассоциированную вакцину против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота.

2.2.3 Изготовление липосомальных структур

В качестве главного компонента для изготовления липосом были использовали фосфолипиды - (фосфатидилхолин).

На основании литературных источников наибольшее количество лецитина содержится в сырье животного происхождения, а именно в курином яичном желтке. Для получения лецитина, растворяли сухой куриный желток в этиловом спирте, слегка подогревая его над пламенем горелки. Затем, после фильтрации, в полученную суспензию, добавляли несколько капель ацетона (рисунок 3 и 4).

Образовавшийся осадок свидетельствовал об осаждении лецитина (фосфатидилхолина).

Таким образом, нами были получены липосомы с однородной структурой и размерами.

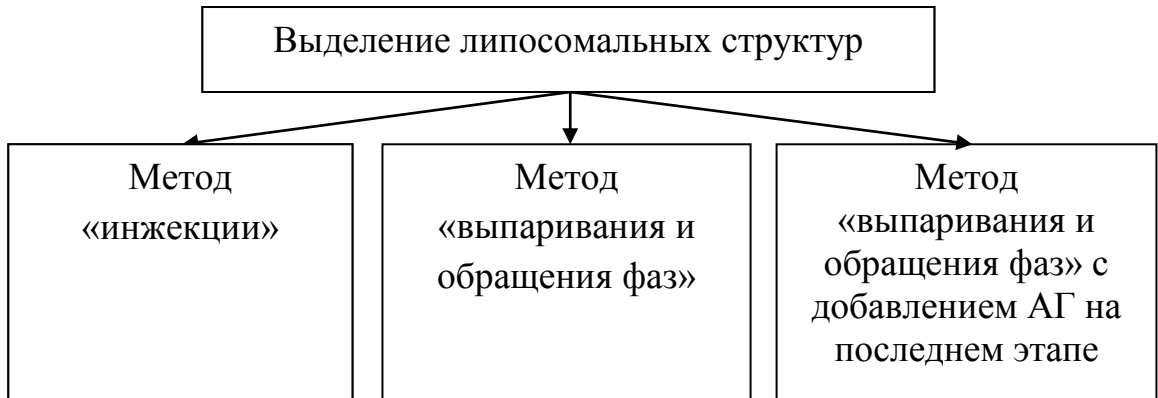


Рисунок 3 – Схема получения липосомальных структур



Рисунок 4 – Схема изготовления липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

2.2.4 Разработка оптимальных соотношений антигена с липосомальными структурами

Для изготовления инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3, использовали антиген вируса ПГ-3 (штамм «ПТК-45/86»). Антиген соединяли с липосомальными структурами в соотношениях: 1:1; 1:5; 1:10 (таблица 2).

Изучение антигенной активности экспериментальных образцов вакцины проводили на 36 белых мышах. Препарат животным вводили подкожно в дозе 0,1 см³/гол. На 14 и 28 день после вакцинации исследовали сыворотку крови подопытных животных на наличие антител к вирусу парагриппа-3 в РТГА.

Таблица 2 – Изучение соотношения антигена с липосомальными структурами (M±m), n=6

№ групп	Соотношение АГ и липосом	Титры антител к вирусу ПГ-3 в РТГА (log ₂)	
		14 дней	28 дней
1	1:1	5,0±0,28	7,67±0,23***
2	1:5	4,17±0,18	6,33±0,23***
3	1:10	3,83±0,34	6,0±0,28***

Примечание: ***= p≤0,001

По данным проведенных исследований инактивированная липосомальная вакцина против ПГ-3 крупного рогатого скота обладает высокой антигенной активностью. Однако динамика антителообразования отличалась в испытуемых группах. Наиболее выраженный антигенный ответ получен при использовании вакцины, где соотношения антигена с липосомами были 1:1. В результате проведенных исследований нами определен оптимальный состав липосомальных структур и вирусного антигена в экспериментальной серии вакцины против ПГ-3 крупного рогатого скота.

2.2.5 Лабораторные испытания антигенной активности инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота

Антигенную активность инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота изучали на 80 мышах - 4 группы по 20 голов в каждой. Животным первой группы вводили подкожно вакцину, изготовленную методом «инъекции». Второй группе – препарат полученный методом «выпаривания и обращения фаз», а третьей - изготовленную по методу «выпаривания и обращения фаз», но с добавлением

антигена после гомогенизации и испарения, в одинаковых дозах по 0,1 см³/гол., двукратно с интервалом 14 дней.

Контрольной группе мышей ввели инактивированную ГОА вакцину против парагриппа-3, в тех же дозах и кратности. Кровь для серологических исследований брали до вакцинации, через 14 дней (ревакцинация), на 28 и 60 день с начала опыта (рисунок 5).

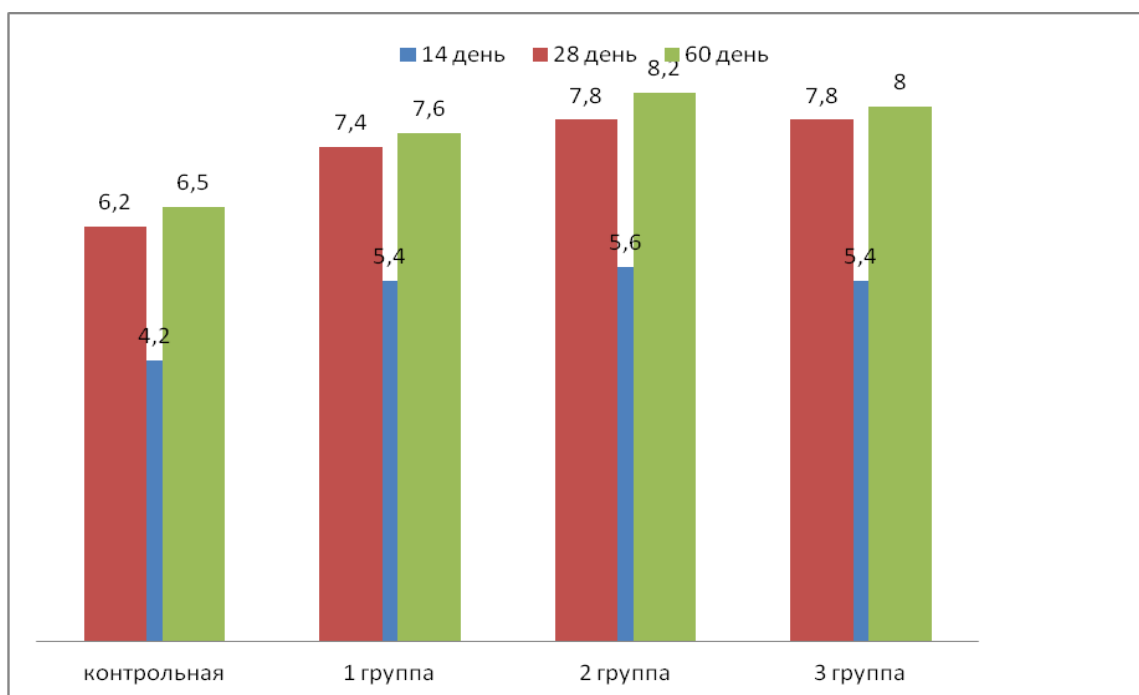


Рисунок 5 – Изучение антигенной активности липосомальной вакцины на белых мышах

Таким образом, вакцина с липосомальными структурами обеспечивала в организме привитых животных выработку специфических антител к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Уровень антител у белых мышей во всех подопытных группах через 14 дней различался незначительно и находился в пределах $5,40 \pm 0,27$ - $5,60 \pm 0,27 \log_2$, а в контрольной группе $4,20 \pm 0,22 \log_2$ соответственно.

Титры антител после введения вакцины на 60-й день исследования были выше во второй и третьей группе, и составили $8,00 \pm 0,23$ - $8,20 \pm 0,42 \log_2$, при этом в контрольной группе этот показатель был ниже и равнялся $6,50 \pm 0,37 \log_2$ соответственно.

2.2.6 Изучение клинико-биохимических показателей крови у кроликов, вакцинированных ассоциированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

Ассоциированную инактивированную липосомальную вакцину против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота готовили с использованием инактивированных 0,2%-ным раствором формалина концентрированных антигенов вирусов ПГ-3 – штамм «ПТК-45/86» и ИРТ – штамм «ТК-А (ВИЭВ) – В2».

С целью изучения клинико-биохимических показателей крови кроликов разделили на две опытные и одну контрольную группы по 8 голов в каждой.

Первой опытной группе животных ввели инактивированную липосомальную вакцину против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота. Вторую группу кроликов привили ассоциированной инактивированной эмульсионной вакциной против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота. Биопрепараты подопытным животным вводили внутримышечно, двукратно с интервалом 14 дней. Кролики третьей группы были интактными (контроль).

Исследование проб крови опытных и контрольных животных проводили до вакцинации (фон), на 30-е и 60-е сутки опыта (таблица 3).

Таблица 3 – Гематологические показатели крови кроликов ($M \pm m$), $n=8$

Показатель	Срок исследования	Группа		
		I опытная	II опытная	III контрольная
Гемоглобин, 105-125 г/л	фон	119,38±0,20	127,00±0,20	102,13±0,24
	на 30 день	122,63±0,45***	133,50±0,29***	101,00±0,35
	на 60 день	139,50±0,40***	136,13±0,45**	103,13±0,45
Эритроциты 4,5-7,5×10 ¹² л	фон	5,10±0,19	5,50±0,20	4,31±0,14
	на 30 день	5,25±0,14***	5,54±0,28***	4,54±0,12
	на 60 день	6,44±0,13***	5,71±0,29***	4,61±0,19
Лейкоциты, 6,5-9,5×10 ⁹ л	фон	7,7±0,30	7,93±0,14	8,25±0,27
	на 30 день	7,23±0,10**	7,46±0,18**	8,05±0,20
	на 60 день	8,29±0,12*	8,63±0,20**	7,8±0,24

Примечание: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Фоновый показатель уровня гемоглобина в крови кроликов контрольной группы составил 102,13±0,24 г/л, в остальных группах (1 и 2) этот показатель колебался от 119±0,20 г/л до 127±0,20 г/л.

За весь период исследования в опытных и контрольной группе животных гематологические показатели находились в пределах допустимых значений.

Уровень гемоглобина и эритроцитов, на 30-й день повысился: в I опытной группе на 3,25 г/л и $0,15 \times 10^{12}$ /л; во II группе на 6,5 г/л и $0,04 \times 10^{12}$ /л соответственно.

Увеличение данных показателей наблюдали и на 60-й день исследований: в I опытной группе на 20,12 г/л и $1,34 \times 10^{12}$ /л; во II группе на 9,13 г/л и $0,17 \times 10^{12}$ /л. соответственно, по сравнению с фоновыми показателями.

Таким образом, наиболее высокий уровень гемоглобина и высокая активизация эритропоеза наблюдали у животных I группы, которые были инъецированы вакциной содержащей липосомы.

Фоновые показатели содержания лейкоцитов в I и II опытных группах находились на уровне $7,7 \pm 0,30 - 7,93 \pm 0,14 \times 10^9$ /л.

У кроликов III группы (контроль) количество лейкоцитов находилось в пределах $7,8 \pm 0,24 - 8,25 \pm 0,27 \times 10^9$ /л.

Количество лейкоцитов на 30-е сутки исследования во всех опытных группах снизилось: в I и II группе на $0,47 \times 10^9$ /л.

Повышение лейкоцитов в I и II опытных группах, по сравнению с фоновыми показателями, наблюдали к 60-му дню исследования: 1 группа – на $0,59 \times 10^9$ /л; 2 группа - на $0,7 \times 10^9$ /л.

При этом, в контрольной группе наблюдалось снижение данного показателя на $0,45 \times 10^9$ /л.

Таким образом, рост числа лейкоцитов, в пределах физиологической нормы, наблюдали в крови всех опытных групп кроликов.

По биохимическим показателям сыворотки крови кроликов (таблица 4) можем судить, что уровень общего белка в сыворотке крови кроликов контрольной группы за период исследования (60 дней) находился в пределах $68,13 \pm 0,47 - 71,88 \pm 0,62$ г/л.

На 30-й день исследования количество общего белка в сыворотке крови кроликов превышало показатели фона в I группе – на 4,37 г/л, во II группе – на 3,0 г/л, а в контрольной группе этот показатель был ниже фонового на 1,25 г/л.

Показатели альбуминовых фракций в сыворотке крови кроликов в контрольной группе за весь опытный период находилось на уровне $57,0 \pm 1,76 - 60,25 \pm 1,40$ %.

Альбуминовые фракции проб сыворотки крови у опытных животных на 30-й день снизились по сравнению с фоновыми показателями: в I группе – на 11,5 %, во II группе – на 10,25 %, с постепенным повышением к 60 дню исследований.

Таблица 4 – Биохимические исследования проб сыворотки крови кроликов ($M \pm m$), $n=8$

Показатель	Срок исследования	Группа		
		I опытная	II опытная	III контроль
Общий белок, 60-82 г/л	фон	73,88±0,65*	72,63±0,65	71,88±0,62
	на 30 день	78,25±0,56***	75,63±0,64***	70,63±0,57
	на 60 день	70,75±0,34***	65,13±0,43***	68,13±0,47
Альбумины, 55 - 65 г/л	фон	62,38±1,28	61,0±1,28	60,25±1,59
	на 30 день	50,88±1,25**	50,75±1,45**	57,0±1,76
	на 60 день	58,75±1,29**	55,50±1,11**	60,50±1,40
α -глобулины, 8-12 %	фон	8,38±0,40	9,63±0,53	9,88±0,43
	на 30 день	12,00±0,61***	12,0±0,57***	9,13±0,47
	на 60 день	9,63±0,53***	9,88±0,32**	8,28±0,42
β -глобулины, 7-13 %	фон	12,20±0,59	11,75±0,39	11,13±0,65
	на 30 день	13,75±0,27**	13,13±0,24*	12,00±0,40
	на 60 день	9,38±0,35***	11,0±0,29**	12,38±0,35
γ -глобулины, 17-23 %	фон	16,63±0,40	17,38±0,35	17,63±0,49
	на 30 день	23,00±0,29***	21,88±0,43***	19,75±0,39
	на 60 день	23,25±0,17***	21,00±0,35***	18,63±0,40

Примечание: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

В сыворотке крови кроликов III контрольной группы α -глобулины находились в пределах 8,28±0,40-9,88 ±0,43%, фоновые показатели опытных групп колебались на уровне 8,38±0,40 - 9,88 ± 0,43%.

При изучении процентного содержания в сыворотке крови глобулиновых фракций белков установлено, что во всех опытных группах отмечалось увеличение показателя α - , β - и γ – глобулинов на 30-е сутки исследования: α - глобулинов – в 1 группе на 3,62 и во 2 группе – на 2,37%, β -глобулинов – на 1,75 и 1,38 % и γ - глобулиновых фракций – на 6,37 и 4,5%, с постепенным снижением данных показателей к 60- м суткам исследований.

Таким образом, во всех опытных группах гематологические и биохимические показатели сыворотки крови находились в пределах физиологической нормы. При иммунизации опытных кроликов инактивированной липосомальной вакциной наблюдалось наибольшее

увеличение количества гемоглобина и эритроцитов в сыворотке крови, а также количество α -, β - и γ – глобулинов.

2.2.7 Комплексная оценка Т- и В- систем иммунитета после вакцинации кроликов инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

С целью комплексной оценки Т- и В- систем иммунитета, при применении инактивированной липосомальной вакцины против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота, по принципу аналогов было сформировано 3 группы по 8 животных в каждой. Животным первой группы вводили двукратно с интервалом 14 дней инактивированную липосомальную вакцину в дозе 2,0 см³ внутримышечно в область шеи. Вторую группу кроликов иммунизировали ассоциированной инактивированной эмульсионной вакциной против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота. Биопрепараты подопытным животным вводили внутримышечно, двукратно с интервалом 14 дней. Кролики третьей группы были интактными (контроль).

Взятие крови у животных для иммунологических исследований проводили до иммунизации, через 45, 60 дней после начала опыта.

Количество Т – и В – лимфоцитов определяли методом Е-розеткообразования.

Результаты экспериментальных исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Изучение клеточного иммунитета у вакцинированных кроликов (M±m), n=8

№ п/п	Группа	Срок исследования		
		до иммунизации	45 дней	60 дней
Т-лимфоциты, %				
1	1 группа	33,38±0,45	41,5±0,45***	41,38±0,40***
2	2 группа	32,13±0,47	39,75±0,63***	38,0±0,29**
3	3 группа (контрольная)	34,00±0,49	35,25±0,27	36,5±0,45

В-лимфоциты, %				
1	1 группа	20,50±0,49	36,18±0,29***	39,5±0,25***
2	2 группа	28,00±0,29	33,09±0,23***	34,54±0,18***
3	3 группа (контрольная)	21,5±0,17	21,06±0,29	22,13±0,32

Примечание: **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$

Как видно из таблицы в I группе кроликов наблюдали постепенное нарастание количества Т-лимфоцитов от 33,38 % до 41,5 %, т.е. на 8,12 %.

Количество Т-лимфоцитов увеличивалось к 45 – дню исследований от 32,13% до 39,75% - на 7,62 %.

Важно отметить, что при использовании ассоциированной вакцины с липосомальными структурами было выявлено увеличение количества В-лимфоцитов 2 раза.

Таким образом, результаты исследований показали, что липосомальная вакцина имеет высокую антигенную активность и усиливает иммунологическую перестройку организма животных, о чем свидетельствует увеличение количества Т- и В- лимфоцитов крови.

2.2.8 Серологические показатели крови кроликов, вакцинированных инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

Наличие поствакцинальных антител в сыворотке крови кроликов к вирусу ПГ-3 определяли в РТГА и к вирусу ИРТ в ИФА. Результаты исследований приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Изучение антигенной активности вакцины на кроликах (M±m), n=8

№ п/п	Группа животных	Срок исследования		
		до иммунизации	45 дней	60 дней
		титр антител в РТГА на ПГ-3, log ₂		
1	1 группа	0	9,13±0,13***	10,88±0,24**
2	2 группа	0	8,25±0,17	10,0±0,29
3	3 группа (интактные)	0	0	0
		титр антител в ИФА на ИРТ, log ₂		
1	1 группа	0	11,88±0,13***	12,50±0,20**
2	2 группа	0	11,1±0,48	12,0±0,35
3	3 группа (интактные)	0	0	0

Примечание: *= p≤0,05; **=p≤0,01; ***= p≤0,001

Анализ результатов исследований показал, что применение экспериментальной вакцины с липосомальными структурами способствует активизации клеточного и гуморального иммунитета у лабораторных животных, что свидетельствует о её высокой антигенной активности.

Титры антител в I группе были на 0,9 log₂ выше, чем во второй группе кроликов. Высокие титры антител в этой группе сохранялись и на 60 день исследования при отсутствии специфических антител в интактных группах.

Таким образом, сочетанное применение вакцины с липосомальными структурами обеспечивает иммунологическую перестройку организма кроликов, что выражается в нарастании титра антител в сыворотке крови.

2.2.9 Производственные испытания инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

Производственные испытания ассоциированной инактивированной липосомальной вакцины против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота проводили в хозяйстве ООО «Кутлушкино» Чистопольского района Республики Татарстан.

В опыте использовали 20 телят 30-ти суточного возраста, которые были разделены на 2 группы по 10 телят в каждой.

Первой группе телят ввели ассоциированную инактивированную липосомальную вакцину против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, второй группе – ассоциированную инактивированную эмульсионную вакцину против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота. Вакцины вводили в дозе $1,0 \text{ см}^3$ внутримышечно, двукратно с интервалом 14 дней.

Взятие крови у животных для серологических исследований проводили до вакцинации, через 14 дней (ревакцинация), а так же через 45, 60, 180 дней после вакцинации. Наличие антител в сыворотке крови подопытных телят к вирусу ПГ-3 определяли в реакции торможения гемагглютинации и к герпесвирусу типа 1 в реакции нейтрализации.

По результатам серологических исследований, представленных на рисунках 6 и 7 максимальный рост титров антител к обоим антигенам наблюдали после введения вакцин, которые достигали максимального уровня к 60 дням.

В опытных группах высокие титры антител к вирусу парагриппа-3 ($9,0-10,0 \log_2$) и к герпесвирусу типа 1 КРС ($4,0-6,0 \log_2$) выявлены на 2 месяц после вакцинации, которые не снижались до 180 дней опыта.

Следует отметить, что средние титры антител к обоим вирусным антигенам на 60-день исследований, были на $0,5-1,1 \log_2$ выше при введении «Вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной липосомальной» по сравнению с коммерческим биопрепаратом.

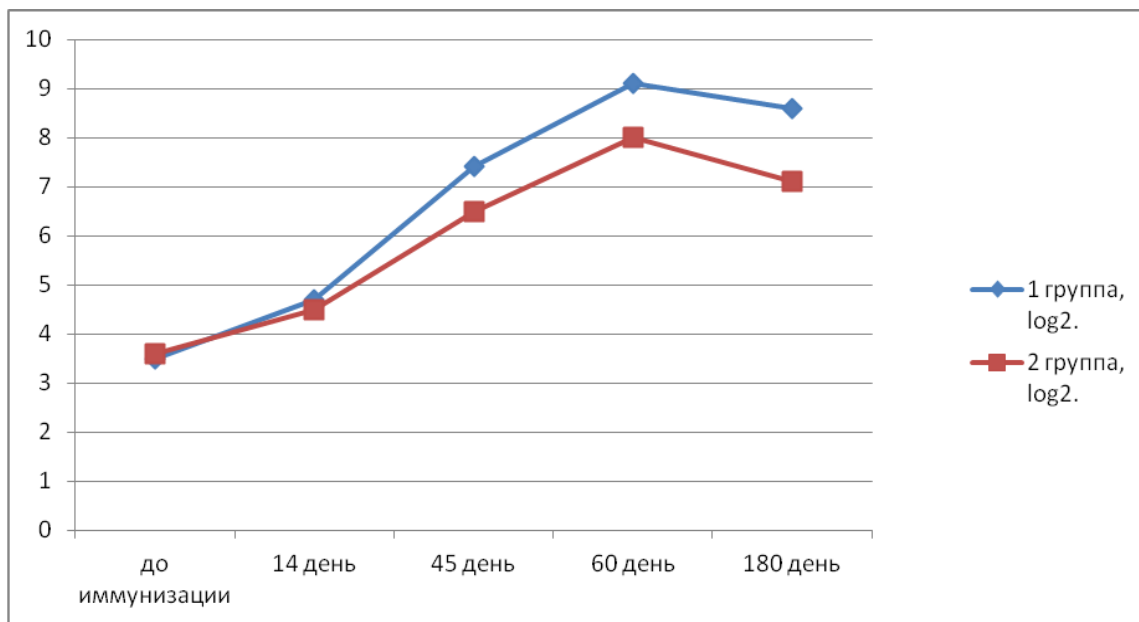


Рисунок 6 – Динамика накопления специфических антител к вирусу парагриппа-3 в РТГА у вакцинированных телят

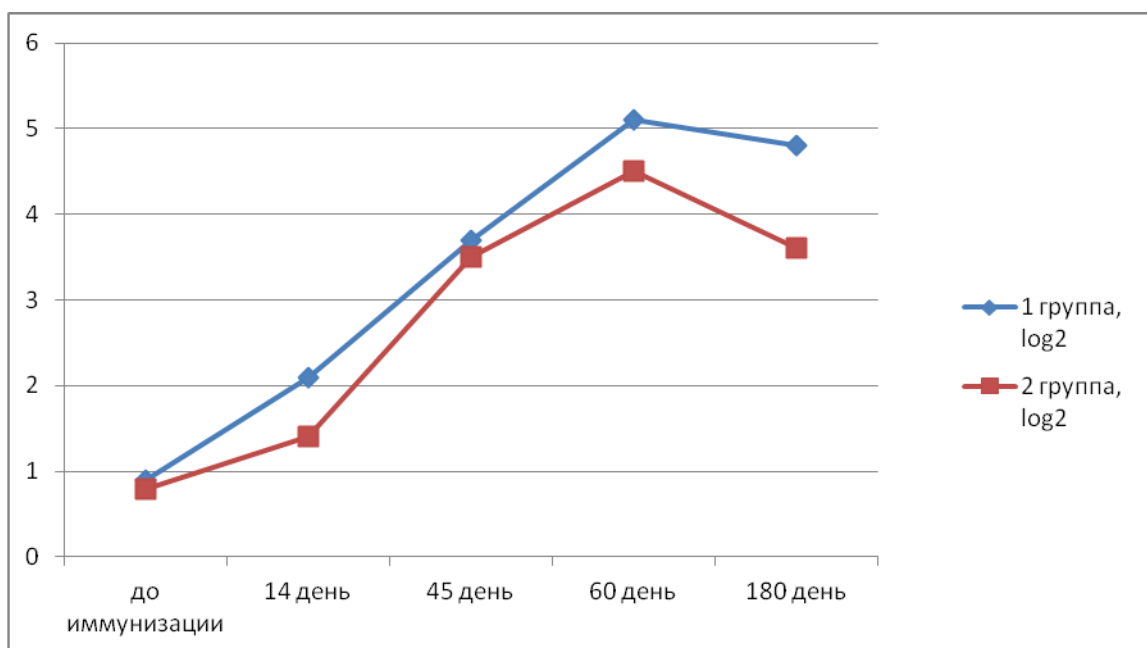


Рисунок 7 - Динамика накопления специфических антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в РН у вакцинированных животных

Таким образом, экспериментальная серия ассоциированной инактивированной липосомальной вакцины против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью и

может быть рекомендована для профилактики вирусных респираторных инфекций крупного рогатого скота.

2.3 Экономическая эффективность применения инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

Проведенные расчеты экономической эффективности применения инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота указывают на обоснованность их применения с экономической точки зрения. Экономический эффект липосомальной вакцины на 1 руб. затрат составил 2,56 руб., а при применении эмульсионной инактивированной вакцины на 1 руб. затрат – 2,00 руб.

Таким образом, результаты исследований подтвердили эффективность применения липосомальных структур в качестве иммуностимулятора при разработке инактивированных вакцин против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и его преимущество относительно других вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых иммуностимуляторов для усиления иммуногенности вакцин является приоритетным направлением. Проведенные исследования являются научным обоснованием к применению вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота. Полученные результаты позволили сделать следующие выводы:

1. Установлено, что в отдельных хозяйствах Республики Татарстан в структуре инфекционных болезней крупного рогатого скота 60-62% составляют вирусные респираторные болезни, преимущественно вирусы ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота. Серологические исследования указывают, что в респираторной патологии крупного рогатого скота участвуют ассоциации ПГ-3+ ИРТ.

2. Впервые изготовлена ассоциированная инактивированная липосомальная вакцина против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота с установлением оптимального соотношения (1:1) вирусного антигена и липосомальных структур.

Отработанная методика получения липосомальных частиц позволила эффективно включать в них антигены вируса ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота.

3. Гематологические и биохимические показатели крови у иммунизированных экспериментальной вакциной кроликов находились в пределах физиологической нормы. Повышение количества эритроцитов, гемоглобина в крови у опытных животных показывает увеличение окислительной способности крови, повышение интенсивности обмена веществ и улучшение гомеостаза организма.

4. Экспериментальная ассоциированная инактивированная липосомальная вакцина вызывает усиление Т- и В- клеточного иммунитета. При этом липосомальная структура способствует активизации клеточного иммунитета в течение 180 дней.

5. Ассоциированная липосомальная вакцина против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота, введенная двукратно в объеме 1,0 см³ телятам, способствует достоверному увеличению у них титра антител к вирусу ПГ-3 в реакции торможения гемагглютинации до 180 суток после вакцинации на 1,5 log₂ и к вирусу ИРТ в реакции нейтрализации на 1,2 log₂ соответственно.

6. Экономическая эффективность при применении инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота при иммунизации телят из расчета на 1 руб. затрат составила 2,56 рубля, что на 0,56 рубля выше чем при использовании эмульсионного варианта вакцины.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. На основании результатов исследования разработаны временные правила применения инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота в неблагополучных по респираторным инфекциям животных. Экспериментальные данные по изучению иммуностимулирующего эффекта инактивированной липосомальной вакцины позволяют рекомендовать их применение для профилактики ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота в неблагополучных хозяйствах (Утвержден ГУВ КМ РТ от 13.01.2016 г.).

2. Результаты эпизоотологических, вирусологических и иммунологических исследований используются в учебном процессе при изучении курса «Вирусология», «Ветеринарная микробиология и микология», «Иммунология», по специальности 36.05.01 «Ветеринария» ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, Башкирский ГАУ, Омский ГАУ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ

1. Магдеева, Э.А. Выделение липосом из яичного лецитина / Э.А. Магдеева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2015. – Т. 221 (1). – С. 135-137.

2. Магдеева, Э.А. Липосомы – транспортеры вакцины парагриппа-3 / Э.А. Магдеева, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2015. – Т. 222 (2). – С. 142-144.

3. Магдеева, Э.А. Липосомы в сочетании с прополисом и ассоциированной вакциной для профилактики парагриппа-3, инфекционного

ринотрахеита и хламидиоза крупного рогатого скота / Э.А. Магдеева, В.Г. Гумеров, А.К. Галиуллин, В.В. Евстифеев // Научная жизнь. – 2016. - № 1. – С. 138-146.

Публикации в других изданиях

4. Магдеева, Э.А. Клинико-биохимические показатели крови кроликов, вакцинированных инактивированной липосомальной вакциной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / Э.А. Магдеева // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития ветеринарной медицины, зоотехнии и аквакультуры», г. Саратов, 22-24 марта 2016. - С.103-106.

5. Магдеева, Э.А. Испытание вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной липосомальной в производственных условиях / Э.А. Магдеева, А.К. Галиуллин, В.Г. Гумеров // Материалы международной научной конференции «Современные проблемы ветеринарной и аграрной науки и образования». Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана. – 2016. – Т. 226 (II). – С. 114-117.