

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Н.Э. БАУМАНА»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор Галиуллин А.К.

КАЗАНЬ – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Характеристика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.....	10
1.2 Характеристика парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	16
1.3 Характеристика липосомальных структур.....	19
1.4 Использование липосомальных структур в вакцинных препаратах.....	24
1.5 Адъюванты, применяемые при изготовлении вакцин.....	27
1.6 Заключение по обзору литературы.....	32
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Материалы и методы.....	35
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
2.2.1 Анализ производственной деятельности опытного хозяйства.....	43
2.2.2 Клинико-эпизоотологический и серо-иммунологический мониторинг респираторных заболеваний в хозяйстве.....	44
2.2.3 Мониторинг сезонности респираторных инфекций в хозяйстве.....	46
2.2.4 Изготовление липосомальных структур.....	48

2.2.4.1	Определение размеров и содержимого липосом.....	54
2.2.4.2	Изучение безвредности инактивированной липосомальной вакцины.....	56
2.2.5	Разработка оптимальных соотношений антигена с липосомальными структурами.....	57
2.2.6	Лабораторные испытания антигенной активности инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	58
2.2.6.1	Изучение клинико-биохимических показателей крови у кроликов, вакцинированных ассоциированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	61
2.2.6.2	Комплексная оценка Т- и В-систем иммунитета после вакцинации кроликов инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	65
2.2.6.3	Серологические показатели крови кроликов, вакцинированных инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	68
2.2.7	Производственные испытания инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	70
2.3	Экономическая эффективность применения инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и	

	парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	76
3.0	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	79
4.0	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	84
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	85
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	87
	СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА.....	106
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	108

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика, профилактика и ликвидация респираторных заболеваний крупного рогатого скота на сегодняшний день считается актуальной проблемой ветеринарной медицины. По своему распространению, смертности, вынужденному убою, снижению прироста массы тела они превалируют над всеми остальными инфекциями крупного рогатого скота [9, 19, 46, 47, 106, 127].

Респираторными болезнями заражается до 80 % молодняка крупного рогатого скота в течение 1 года жизни, а 7,2-15,6 % телят переболевают повторно [44].

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 %.

В Бразилии методом полимеразной цепной реакции установлено, что 82,8% крупного рогатого скота являются положительными в отношении герпесвируса типа I, 93,1 % - в отношении герпесвируса типа V и 75,9 % популяции крупного рогатого скота латентно инфицированы обоими типами герпесвируса [1, 107].

Респираторные болезни крупного рогатого скота широко распространены по территории России, в большей степени причиной этому служит массовый завоз племенного скота в 70-е и 80-е годы прошлого столетия [2, 44].

Наиболее значимые из групп респираторных болезней - это инфекционный ринотрахеит (ИРТ), парагрипп-3 (ПГ-3) и вирусная диарея - болезнь слизистых (ВД БС) [16].

В условиях современной промышленной технологии главной причиной заболевания животных респираторными болезнями является снижение резистентности организма [23, 61, 64, 86, 93].

Возбудители респираторных заболеваний крупного рогатого скота угнетают клеточные и гуморальные звенья иммунной системы, особенно если они состоят в ассоциациях. Для сохранности поголовья молодняка чаще применяют препараты, стимулирующие иммунореактивность и естественную резистентность и организма [85].

В современном промышленном скотоводстве наиболее эффективным способом профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота считается вакцинация. Поэтому поиск наиболее иммуногенной вакцины, разработка способов повышения эффективности вакцинации являются одними из главных задач ветеринарии.

Липосомальные структуры используют во многих отраслях медицины как новое, перспективное направление, позволяющее получать лекарственные препараты на их основе [39].

Важным свойством липосомальных структур считается их способность принимать и удерживать вещества, содержащиеся в окружающей их среде, поэтому они широко используются как «контейнеры» лекарственных препаратов, в том числе и антигенов [39, 40].

Именно поэтому одной из актуальных задач ветеринарии является поиск новых иммуностимулирующих препаратов и введение их в состав вакцинных препаратов, что помогает раскрывать новые пути к надежной профилактике многих заболеваний [43].

Исходя из вышеизложенного, **целью наших исследований** явилось 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 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. 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.

Апробация работы. 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.

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота

Семейство Herpesviridae включает более 80 ДНК- содержащих вирусов. Наиболее патогенными из этого семейства являются вирусы: болезни Ауески, ринотрахеита крупного рогатого скота, ринопневмонии лошадей, герпеса лошадей (ЛК-1 и 2), злокачественной катаральной горячки крупного рогатого скота, язвенного маммиллита, ринотрахеита кошек, герпесвируса собак, болезни Марека, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы уток, герпеса птиц и др.

Эти вирусы инфицируют широкий круг хозяев: человека, обезьян, многие виды домашних животных, грызунов, птиц, пресмыкающихся, земноводных и рыб.

Герпесвирусы позвоночных делят на 3 подсемейства: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae.

Вирусы подсемейства Alphaherpesvirinae включает три рода: 1) *симплекс-вирус* (герпес человека типов 1 и 2, герпес лошадей 1-ринопневмонии, 2 и 3 коитальной экзантемы); 2) *пойкиловирус* (вирус болезни Ауески, герпеса кошек, герпеса собак 1, инфекционного ларинготрахеита птиц); 3) *варицелловирус* (вирус ветряной оспы).

Вирусы подсемейства Betaherpesvirinae включает два рода: 1) *цитомегаловирус* – вирус герпеса 5 (цитомегаловирус герпеса свиней); 2) *микромегаловирус* (цитомегаловирус мышей).

Вирусы подсемейства Gammaherpesvirinae включает четыре рода: 1) *лимфокриптовирус* – вирус герпеса человека 4 (вирус Эпштейна - Барра); 2)

металимфокриптовирус (вирус болезни Марека); 3) *радиновирус* (вирусы болезни обезьян) [84, 94].

Инфекционный ринотрахеит (*Infectious bovine rhinotracheitis*; *Rhinotracheitis infectiosa bovim*; ИРТ, «красный нос», инфекционный ринит, инфекционный пустулёзный вульвовагинит, инфекционный вульвовагинит, пузырьковая сыпь, инфекционный некротический ринотрахеит, инфекционный катар верхних дыхательных путей, контагиозная бронхопневмония) – преимущественно остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся общим угнетением и конъюнктивитом, лихорадкой, катарально-некротическим поражением дыхательного тракта, появлением пустулезного вульвовагинита или баланопостита, абортами у стельных коров [8, 32, 42, 47, 130, 134].

Возбудитель инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота - *Herpesvirus bovis 1*, содержит ДНК. Размеры вирионов от 120 до 140 нм., состоящих из сердцевинки с нуклеоидом, содержащим ДНК и структурный белок VP21, капсида, мембраны, покрывающей капсид, и оболочки [83].

Поверхностная структура вируса содержит многочисленные выступы — «шипы» (пепломеры); по сравнению с другими вирусами, имеющими липидную оболочку, у герпесвирусов этих «шипов» больше, но они короче по длине [91].

Геном вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота состоит из единой 2-спиральной линейной молекулы ДНК [84], в которой закодировано 9 структурных белков вируса: VP105 – VP90 (гемагглютинин), VP74, VP64, VP54, VP50, VP47, VP40, VP31. Наибольшей иммуногенностью обладают VP74, VP90. Белок, маркированный как VP8 с мол.м. 96 кД, является одним из главных белков ГВ-1 крупного рогатого скота. Белок VP8 участвует в модуляции экспрессии генов класса А. У телят он стимулирует пролиферацию Т- клеток и образование антител как после заражения инфекционным

ринотрахеитом крупного рогатого скота, так и после иммунизации очищенным белком [133, 143].

Вирус устойчив к низким температурам. При температуре минус 70 °С вирус сохраняется в течение 9 месяцев, а при подогревании до 56 °С инактивируется через 20 мин., при 37 °С – через 5 - 10 суток, при 22 °С - через 50 суток. При воздействии раствора формалина 1:500 вирус инактивируется в течение 24 ч.

Этиловый эфир 20 % -ной концентрации, и хлороформ 5 %-ной концентрации, инактивируют вирус. В замороженных спермах быков и в жидком азоте вирус сохраняется в течение одного года.

Имеются сведения о возможности инактивирования вируса в сперме быков, если обработать их 0,3 % - ным раствором трипсина [15, 62].

Инкубационный период инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота длится 2 - 4 дня, редко больше. Заболеваемость при инфекционном ринотрахеите крупного рогатого скота 30 - 100 %, летальность до 15 % .

Основные пути передачи вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота – воздушно-капельный, контактный, алиментарный и трансмиссивный. Животные, зараженные вирулентными штаммами, становятся латентными переносчиками вируса. Известны несколько форм проявления инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота: вагиниты у коров, а у быков-производителей – орхиты, поражение верхних дыхательных путей, энцефалиты и артриты, конъюнктивиты [8].

Диагноз на герпесвирусную инфекцию устанавливают на основании эпизоотологических, клинических данных, патологоанатомических изменений в органах и тканях и результатов лабораторных исследований.

Лабораторные методы заключаются:

- в обнаружении антигенов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в пробах патологического материала с помощью РИФ (реакция иммунофлюоресценции) и ПЦР (полимеразная цепная реакция);

- в выделении вируса в культуре клеток и его идентификации;
- в обнаружении и выявлении прироста специфических антител в парных пробах сыворотки крови животных в РДП, РВН, РНГА, РТГА и ИФА [11, 17, 41, 48, 76].

С целью экспресс - диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота применяют иммунохимические и молекулярно-генетические методы, такие как РИФ [36], ИФА (иммуноферментный анализ) [49, 68], методы молекулярной гибридизации с помощью радиоактивного ^{32}P - ДНК - зонда [82] и биотинилированного ДНК-зонда [72].

Выделение вируса из патологического материала заключается выявлением цитопатогенного действия (ЦПД) вируса в культуре клеток с его последующей идентификацией. Для выделения вируса используют первичные культуры клеток почки эмбрионов коров (ПЭК), бычьих тестикул (БТ) и легких или их субкультуры. Также можно использовать перевиваемые линии клеток: MDBK, ЛЭК, TR [33, 34, 35, 78, 112, 113].

В связи с многообразием клинических форм и способностью герпесвируса типа I к латентному персистированию в организме клинически здоровых животных герпесвирусная инфекция занимает особое место среди вирусных заболеваний крупного рогатого скота [45].

В России в случае возникновения этой инфекции, согласно нормативным документам, всех животных, находящихся в эпизоотическом очаге, иммунизируют сухой вирус - вакциной «ТК-А-ВИЭВ»; больных изолируют и лечат гипериммунной сывороткой, неспецифическим глобулином или сывороткой реконвалесцентов. В хозяйствах мясного направления, при стационарном неблагополучии, всех животных, находящихся в угрожаемой зоне, прививают инактивированной вакциной [35].

Иммунизация животных в условиях повышенной угрозы заражения герпесвирусом типа - I, позволяет защитить их от ИРТ и снизить интенсивность распространения возбудителя [4, 5, 29, 116, 139].

Для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота применяют живые (аттенуированные), инактивированные, рекомбинантные, субъединичные и маркерные вакцины. Живые вакцины при инфекционном ринотрахеите крупного рогатого скота отличаются большим разнообразием и при интраназально - внутримышечном применении обуславливают хороший локальный иммунитет и защиту животных от клинического проявления инфекции [13].

Только в США применяют 14 вариантов живых вакцин. В Бельгии и Японии применяют ts-мутанты.

Имеется также поливалентная вирус - вакцина из пяти типов аттенуированных вирусов, наиболее широко распространенных в Японии и других странах: вирус ИРТ, ВД-БС, ПГ-3, РС – вирус и бычий аденовирус 7-го типа. Поливалентность препарата усиливает эффективность вакцинации крупного рогатого скота [108].

Рекомбинантная вакцина, сконструированная на основе гена gIII аттенуированного вакцинного штамма ИРТ и эпитопов белка P1 вируса ящура, защищала телят от инфекционного ринотрахеита и ящура. Получена генно-инженерная вакцина из мутанта вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с делециями в генах минорных гликопротеинов. Установлена возможность использования плазмидных векторов с увеличенным содержанием CpG, кодирующих укороченную секретлируемую форму гликопротеина D (tgD) герпесвируса 1 крупного рогатого скота (BHV-1) для индукции усиленного иммунного ответа у телят [141].

Для профилактики инфекционного ринотрахеита в РФ применяют бивалентную вакцину «Бивак», живую вакцину ТК-А (ВИЭВ), содержащую два вакцинных штамма ПГ-3 и ИРТ [77].

Для профилактики герпесвирусной инфекции широко применяют инактивированные вакцины, которые имеют ряд преимуществ перед живыми вакцинами.

В нашей стране успешно применяются моно- и различные варианты ассоциированных вакцин против ИРТ крупного рогатого скота, разработанных ведущими научными учреждениями: ВНИЯИ, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», ВНИИВВиМ, ВИЭВ, ВНИИЗЖ, ОАО «Покровский завод биопрепаратов», ГНУ ВНИТИБП и др., Закутский Н.И. и соавторы [30, 31] предложили лечебно-профилактическую схему, включающую двукратную иммунизацию ассоциированной инактивированной вакциной против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и парагриппа-3 и обработку вновь поступившего молодняка после 1-й иммунизации противовирусными химиопрепаратами.

В ФРГ против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота применяли живую вакцину в сочетании с инактивированной. Первоначально после установления диагноза животных вакцинировали живой вакциной двукратно с интервалом в 6 недель. Через 7 месяцев животных двукратно иммунизировали инактивированной вакциной.

Данная схема считается эффективной для оздоровления поголовья крупного рогатого скота от герпесвирусной инфекции [63, 146].

Аттенуированные и инактивированные маркерные вакцины открывают новые перспективы контроля и искоренения инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, так как привитых ими животных легко отличить от инфицированных. В частности, делеция нативной кодирующей области gE вызывает ослабление вирулентности герпесвируса и служит в качестве генотипического или иммунологического маркера, который позволяет отличить инфекцию gE - делеционного рекомбинантного вируса от инфекции, вызванной вирусом дикого типа [147].

Европа имеет длительную историю борьбы с герпесвирусом типа I крупного рогатого скота, но только некоторым из стран: Дании, Финляндии, Швейцарии и Австрии - удалось достичь искоренения инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Схема ликвидации герпесвирусной инфекции в этих странах включала: применение живых и инактивированных маркерных вакцин с делециями гена гликопротеина Е (gE) в сочетании с диагностическими тестами, включающими gE – антигены, убой и выбраковку серопозитивных животных, являющихся потенциальными носителями возбудителя [96].

1.2 Характеристика парагриппа-3 крупного рогатого скота

Данное семейство включает три рода: Paramyxovirus- вирусы паротита, парагриппа человека типов 1-5, парагриппа обезьян (SV₅), парагриппа крупного рогатого скота (SF4), парагриппа грызунов (Сендай), а также парамиксовирусы птиц – вирус Ньюкаслской болезни, Бангер, Юкейпа и др.

Парамиксовирусы – РНК-содержащие вирусы - отнесены к оболочечным (enveloped) вирусам. Вирионы их состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной мембраны или оболочки, на поверхности которой имеются выступы (spikes) длиной 8-10 нм. Внутренний компонент представлен нуклеокапсидом, имеющим спиральную симметрию. Нуклеокапсид окружен липопротеидной оболочкой, которая покрыта шипиками, образованными двумя гликопротеидами вируса, NH (гемагглютинин и нейраминидаза) и F (белок слияния). Вирионы характеризуются хрупкостью. Молекулярная масса вирионов 500 МД, коэффициент седиментации 1000 S. Вирионы содержат РНК, белки (70%), липиды (20-25 %) и углеводы (6 %). Геном вируса представлен односпиральной минус - нитевой РНК с мол. массой 5-7 МД, поэтому последняя не обладает инфекционной активностью и на рибосомах не транслируется.

Геном имеет шесть генов, расположенных в следующем порядке: 3 – NP-P/C-M-F-HN-L-5. Ген P/C кодирует два уникальных белка: структурный P и неструктурный С.

Белки составляют до 70 % общей массы вириона; РНК тесно связаны с белком NP. Помимо этого белка с РНК полимеразой, представляющий собой L-белок в вирусной частице и P- белок, являющийся субъединицей РНК - полимеразы. Остальные три белка связаны с липопротеидной оболочкой. Два из них являются гликопротеидами, это белок HN, который обладает функциями гемагглютинаина и нейраминидазы, и белок слияния - F-белок. Вирус имеет один или два поверхностных антигена и внутренний антиген, представленный белком нуклеокапсида. В вирионах нет общего антигена, единого для всего семейства и рода.

Парамиксовирусы относятся к наименее устойчивым вирусам. Они чувствительны к эфиру и детергентам, прогреванию, быстро инактивируются при температуре 50 °С, чувствительны к трипсину и фосфолипазам. В замороженном виде при минус 60 °С сохраняют инфекционную активность [84].

Парагрипп-3 (от лат. Paragrippus bovim; англ.- Parainfluenza-3-virus; транспортная лихорадка крупного рогатого скота, параинфлюэнца-3) – остро протекающая контагиозная болезнь, главным образом, телят, характеризующаяся лихорадкой, катаральным воспалением верхних дыхательных путей, а в тяжелых случаях поражением легких [8, 20]. Возбудитель парагриппа-3- РНК - содержащий вирус, содержащий 7 структурных белков вируса: - фосфопротеин (P), ГА-нейраминидазный гликопротеин (HN), главный нуклеокапсидный протеин (NP), гликопротеин (F), матричный белок (M), полимеразный белок (L), клеточный активный белок (A) [82]. Размеры вириона 120 - 150 нм. Имеет рибонуклеопротеидный S-антиген и поверхностный V-антиген. В организме животного вызывает образование

вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих и антигемагглютинирующих антител.

Возбудитель парагриппа-3 не устойчив к воздействию высоких температур и УФ - излучения. Инактивируется при 60 °С в течение 30 мин, при 50 °С - за 120 минут и также при обработке раствором формалина и β - пропиолактона [8].

В основном вирус поражает крупный рогатый скот в возрасте от 10 сут. до 6 мес. Животные могут заразиться перорально, аэрогенно и половым путем. Вирус парагриппа-3 в естественных условиях может вызывать заболевание крупного рогатого скота, поражая до 90 % животных. Для постановки диагноза учитывают патологоанатомические, эпизоотологические данные, результаты серологических и вирусологических исследований. При патологоанатомическом вскрытии наблюдают воспалительную реакцию и характерную эпителизацию легочных альвеол бронхиальных и перибронхиальных тканей. При тяжелой форме заболевания и сопутствующей микрофлоре воспалительный процесс распространяется на целые доли легкого [28]. В сыворотке крови появляются специфические антитела класса Ig A.

Через 24 - 30 ч. после заражения животного клинические признаки проявляются в виде повышения температуры тела, серозными переходящими в гнойные истечениями из носа, у стельных коров возникают аборт или рождаются нежизнеспособные телята [18].

Диагностика включает: обнаружение антигена (АГ) в патологическом материале с помощью РИФ и его выделение в культуре клеток почки или легких эмбриона коровы и его идентификация в РТГА, РИФ и др.

В сыворотке крови больных и переболевших животных антител обнаруживают (ретроспективная диагностика) в РТГА.

Для специфической профилактики ПГ-3 крупного рогатого скота применяют инактивированные и живые вакцины. В РФ применяют живую вакцину «Парвак», изготовленную из авирулентного штамма вируса

парагриппа-3, а также бивалентную вакцину «Бивак» для профилактики парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота [84].

1.3 Характеристика липосомальных структур

Липосомы (от греческого *lipos* – жир и *soma* – тело или частица) – сферические липидные бислойные структуры. Первым в середине 60-х годов английский ученый Алек Бенгхем увидел схожие с мембранными структурами клетки на электронных микрофотографиях. Он изучал структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании фосфолипидов в избытке воды [102, 103].

Учеными было выявлено, что неорганические ионы, имеющиеся в растворе в момент набухания фосфолипидов, включаются внутрь этих частиц и удерживаются там длительное время [59, 117].

Установлено, что фосфолипиды, способны в воде самопроизвольно образовывать замкнутые мембранные оболочки, которые захватывают в себя часть окружающего водного раствора, при этом образующая их фосфолипидная мембрана обладает свойствами полупроницаемого барьера, препятствующего диффузии растворенных в ней веществ [7, 89, 90].

Уже с 1971 г. ученые предложили помещать внутрь этих везикул - липосом лекарственные препараты и изучать в качестве биосовместимых «контейнеров» для доставки лекарственных веществ к органам-мишеням [53, 118].

Работы Бенгхема с соавт. над использованием липосом в качестве модельных систем привлекли внимание многих исследователей в различных областях науки. Именно внедрение в науку липосомальных структур способствовало установлению основных закономерностей транспорта веществ

через мембрану, изучался процесс слияния мембран, в реконструированных системах были охарактеризованы индивидуальные мембранные белки [51, 52, 59]. О масштабности использования липосомальных технологий свидетельствуют фундаментальные исследования из разных отраслей наук. А именно, математиков волнуют проблемы топологического многообразия поверхностей в пространстве в связи с структурными свойствами липидного бислоя. Особенно интересно бислое строение везикул химикам в качестве микрореактора, которое может позволить изучать химические реакции с возможностью пространственного разделения продуктов и реагентов посредством мембранных структур. Физиков бислое строение везикул интересуют как дробные метрические размерности со свойственным им поведением при агрегации и богатством морфологических превращений.

Специалисты в области материаловедения так же прибегают к использованию липосомальных структур с целью создания совершенно новых композитных материалов с высокой биологической совместимостью [87, 131, 132].

На данный момент липосомы не потеряли своей актуальности, и исследования в основном направлены в сферу фармакологии и медицины. Липосомы стали инструментом практического применения в производстве биопрепаратов [117, 123, 142].

Существующий повышенный интерес к липосомальным структурам обусловлен их способностью без ограничений включать и удерживать разные вещества без изменения их свойств внутри везикул.

Их химическая инертность, универсальность биологическая совместимость, способность целенаправленно взаимодействовать с клетками организма дают основание считать, что липосомы открывают новые возможности в лечении и профилактике многих болезней как в медицине, так и в ветеринарии.

Для изготовления липосом чаще всего используют фосфолипиды, а именно, лецитин (фосфатидилхолин). Выбор лецитина не случаен: он обладает высокой степенью стабильности. Клеточная мембрана, обеспечивающая поступление питательных веществ внутрь клетки и удаление отработавших веществ состоит из лецитина так же, как и защитные оболочки головного мозга.

Фосфолипиды входят в состав всех клеточных мембран. Они амфифильны, и из-за этого могут самопроизвольно образовывать в водной фазе мембраны, которые представляют собой двойной слой липидных молекул, обычно называемый липидным бислоем. При ограничении связи неполярных цепей липида и воды происходит замыкание липидного бислоя и образуются полые оболочечные структуры, везикулы или липосомы [87, 88, 89, 90].

Липосомы делят на три основных типа:

1. Однослойные или малые моноламеллярные (образованы одинарным липидным бислоем, диаметр 20-50 нм).
2. Большие однослойные или крупные моноламеллярные (образованы одиночным бислоем, диаметр 50-200 нм).
3. Многослойные или мультиламеллярные (насчитываются до сотен липидных бислоев, диаметр 200-1000 нм (5-10 мкм)) [59, 119].

Сам липидный бислой имеет молекулярную толщину около 4 нм, но при этом обладает прочностью и гибкостью. Именно это дает возможность липосомам менять форму в ответ на изменение осмотической концентрации внешнего водного раствора [7].

Липосомы нашли широкое применение в медицине, так как:

1. Обладают способностью включать в себя самые разные вещества (лекарственные препараты);
2. Способствуют повышению терапевтической эффективности применяемых препаратов (препарат в липосомальных везикулах защищен от действия неблагоприятных факторов);

3. Выполняют роль хранилища, из которого препарат высвобождается постепенно (мембрана не позволяет токсичному препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма);

4. Идеальны как переносчики лекарственных препаратов [39]. Впервые использовать липосомы как транспортеры лекарственных веществ, предложил в 1974 году Грегори Григориadis [73, 111, 119].

В связи с недостаточной стабильностью липосомальных структур в кровяном русле есть предположение, что они выводятся из кровотока макрофагами. Поэтому их не удастся направить в определенные органы и ткани.

Настоящим продвижением в области изучения липосом можно считать изготовление «липосом-невидимок» (stealth liposomes), получивших такое название из-за того что их макрофаги не воспринимают как подлежащие к уничтожению чужеродные частицы. А изготавливаются эти липосомы просто - с помощью добавления ковалентно связанного синтетического полимера полиэтиленгликоля.

5. Липосомальные структуры – нетоксичны. Их получают из природных липидов. По данным некоторых ученых, а именно: Гусевой Н.П. с соавт. (1991) и Ермаковой Г.В (1992) [21] в своих экспериментах удалось снизить токсичность липополисахаридов чумного микроба, включенного в липосомы (отсутствие цитотоксического действия на лимфоциты).

6. С помощью липосомальных структур в организм можно ввести различные белки, ферменты, цитокины для коррекции иммунного статуса организма.

Существуют несколько методик получения липосом заданного размера, структуры, состава и процентного содержания включенных в них препаратов.

Самые распространенные способы получения липосом следующие:

Моноламеллярные липосомы различных размеров чаще всего получают методом впрыскивания заранее растворенных в органических растворителях фосфолипидов в водную фазу [104].

В качестве органических растворителей используют вещества, которые имеют низкую температуру кипения. Поэтому их легко выпарить при незначительном нагревании из реакционной смеси или под вакуумом. К ним относятся метанол, этанол, петролейный, этилметилловый, диэтиловый эфиры, дихлорфторметан и фреоны. Размеры образовавшихся липосомальных структур зависит от соотношения фосфолипида и спирта [138].

Для получения малых одноламеллярных везикул также можно использовать метод инъекции, с использованием роторного испарителя, для упаривания остатков использованного растворителя, с дальнейшей ультразвуковой обработкой или же методом экструзии мультиламеллярных везикул.

Крупные одноламеллярные липосомы можно также получить методом инъекции [123] с использованием диэтилового или петролейного эфиров [109].

Суть получения липосом методом «замораживания-оттаивания» заключается в периодическом цикле замораживания с последующим оттаиванием фосфолипидных дисперсий, в процессе чего образуются липосомальные структуры с высоким процентным включением иммобилизуемых веществ. При этом наблюдается слияние липосомальных структур и увеличение их размеров [140].

Липосомальные структуры можно выделить путем механического встряхивания колбы с водным раствором включаемого вещества, на стенках которой липиды остаются в виде тонкой пленки. В последующем эту суспензию подвергают многократному замораживанию и оттаиванию. В результате этого процесса формируются стабильные липосомальные структуры с иммобилизованным включаемым веществом [38, 119].

Метод «замораживания – оттаивания», благодаря простоте осуществления и способности формировать бислойные липидные везикулы с высокой степенью включаемости в них иммобилизуемых веществ, нашёл широкое применение при получении различных липосомальных препаратов. Также данный метод максимально исключает возможность нарушения стерильности препаратов [24, 25, 26, 27].

1.4 Использование липосомальных структур в вакцинных препаратах

В настоящее время успешно прошли испытания и с успехом применяются в ветеринарной практике липосомальные вакцины против болезни Ньюкасла и реовирусной инфекции птиц [81].

В Швейцарии в «Swiss Serum and Vaccine Institute» впервые разработана лицензированная вакцина на основе липосом против гепатита А - E raxal – Berna и проходят испытание вакцины против столбняка и гепатита А, гепатита А и В, гриппа, дифтерии, столбняка на основе липосомальных структур, используя парентеральный метод иммунизации [88, 99].

Липосомальные вакцины, содержащие различные антигены, активно влияют на клеточные и гуморальные факторы иммунитета [40, 60, 75, 122].

Разработанный в унитарном производственном предприятии «Вектор-Фарм» ГНЦ ВБ «Вектор» г. Новосибирска липосомальный генно-инженерный альфа-2b интерферон (Реаферон ЕС-Липинт) доказал свою эффективность при многих вирусных и ассоциированных с ними заболеваниях человека [6].

В ряде клинических испытаний, проведенных в ведущих медицинских центрах страны, таких как ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ, Гематологический научный центр МЗ РФ, институт

гриппа, были получены положительные результаты у взрослых и детей при лечении острого и хронического гепатита В как свободного, так и ассоциированного с гломерулонефритом, гриппа, атопических заболеваний, таких как риноконъюнктивит и бронхиальная астма.

Применение липосомальных структур нашло свое широкое применение при необходимости направленной транспортировки лекарственного препарата к органам ретикуло-эндотелиальной системы. На сегодняшний день разработаны и эффективно используются система лечения и схема применения липосомальных препаратов с антибактериальными препаратами.

Эффективность применения липосомальных препаратов подтверждена при многих заболеваниях (лейшманиоз, брюшной тиф, сальмонеллез, бруцеллез, малярия и др.), имеются работы по использованию липосомальных противовирусных препаратов при вирусном гепатите, герпесе, лихорадке долины Рифт, ВИЧ-инфекции в эксперименте на животных.

В Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте разрабатываются новые препараты с применением липосом для лечения особо опасных инфекций, таких как туляремия, сибирская язва и бруцеллез [27].

По сравнению с традиционными лекарственными препаратами для наружного применения липосомальные препараты при накожном нанесении, обладают способностью проникать в кожу и волосы, а потому они более доступны для живых клеток-мишеней. Установлено, что липосомальные структуры усиливают процессы взаимодействия активных веществ при лечебной наружной терапии, при этом повышая терапевтическую эффективность иммобилизованных в них лекарственных веществ. Скорее всего, такой эффект связан с взаимодействием липосомальных структур с липидными ламеллами и высвобождением их внутреннего содержимого.

Подвижные липиды липосомальных структур встраиваются в липидные ламеллы, увеличивая «жидкость» барьера и улучшая его проницаемость. Другим важным путем проникновения липосом и их содержимого вглубь кожи

являются волосяные фолликулы. Установлена возможность эффективного трансдермального переноса лекарственных препаратов с липосомальными везикулами при использовании методов фоно- и ионофореза [71].

Многие исследователи считают, что применение липосом в вакцинации способно усилить действие вакцин и при этом позволит сэкономить значительные денежные средства.

По мнению вице-президента «Liposome Company» (США) - Марка Дж. Остро, который занимает значимое положение в мире в области развития липосомной технологии, в ближайшее время найдут свое применение новые препараты на основе липосомной технологии. По мнению американских специалистов, в ближайшее время на мировом рынке на 25 - 30 % повысится продажа липосомальных препаратов в качестве средств доставки.

Технологией производства лекарственных средств на основе липосомальных форм занимаются американские компании: «Liposome Technology Inc.» (LTI), «The Liposome Company» (TLC), «Vestar». Уже сегодня на мировых рынках можно найти противоопухолевые липосомальные препараты — даунорубицин («Vestar»), доксорубицин (TLC — Dox 99), цисплатин (TLC) и амфотерицин В (TLC) для лечения системных микозов.

Большинство лекарственных препаратов на основе липосом проходят завершающие этапы клинических испытаний — это и липосомальные вакцины против гриппа и меланомы, и противодиабетический комплекс инсулин - липосомы, и противовирусные нуклеозиды для лечения СПИДа, и серия липосомальных бронхорасширяющих препаратов и т.д. [10].

Разумеется, перед исследователями липосомальных препаратов предстоят дальнейшие исследования и этапы совершенствования технологии производства данных препаратов, улучшение стабильности готовых лекарственных форм, удешевлять производство. Однако опыт производства отечественного липосомального интерферона свидетельствует о возможности решения данных задач. В производстве липосомальных препаратов используют

только природные материалы, приготовленные на основе природного лецитина (фосфолипид, в состав которого входит холин), с целью исключения риска развития иммуногенности, токсичности и возникновения аллергических реакций. Природный лецитин можно применять в производстве пищевых продуктов, косметических и лекарственных средств, на него отсутствуют ограничения как в Европейском союзе, так и в инструкциях Управления по контролю над качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств [22].

С особой осторожностью нужно применять липосомальные препараты, приготовленные из синтетических липидов. За полимерными липосомами большое будущее, они значительно увеличивают время циркуляции лекарственных препаратов в кровотоке, однако необходимо решить проблему плохой биодegradации и токсичности полимерных носителей.

1.5 Адьюванты, применяемые при изготовлении вакцин

Адьюванты – это вещества различной природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ на специфические антигены [66, 80].

Впервые термин «адьювант», что в переводе с латинского языка означает «помогать», «усиливать», открыл французский ученый Густав Раймон в 1920 году. При сочетании описанной им субстанции со специфическим антигеном получили более выраженный иммунный ответ, чем при введении чистого антигена [148].

В зависимости от их происхождения, физико-химических свойств и механизма действия адьюванты разделяют на три группы:

- вещества, которые повышают иммунный ответ организма на введенный антиген и вступают в роли активных иммуностимуляторов;

- иммуногенные белки, которые служат носителями и при этом вызывают Т - клеточный ответ;

- адъюванты транспортного средства (масла, липосомы), которые являются матрицей для антигенов, они также стимулируют иммунный ответ [98].

В качестве адъювантов активно применяют минеральные соединения (гели фосфата алюминия и гидрата окиси), сложные химические смеси (белково - липополисахаридные комплексы, липополисахариды, мурамилдипептид и его производные и др.), полимерные вещества, бактерии и компоненты бактерий (вытяжки вакцины БЦЖ); липиды и эмульгаторы (арлацел, ланолин) вещества, вызывающие воспалительную реакцию (скипидар, сапонин), и другие [97, 136].

В ветеринарии среди минеральных адъювантов наиболее широкое применение нашли вещества, обладающие сорбционной активностью, такие как фосфат алюминия [14], гидроокись алюминия [24, 79], диоксид кремния [2] и фосфат кальция [92].

Положительными свойствами минеральных адъювантов считается их возможность обеспечения более длительного процесса поступления антигенов (депонирующий эффект) [135].

Масляные адъюванты – представляет собой растворенный или суспендированный в воде антиген, который диспергируют в масле, где заключенный в капельки воды антиген находится в сплошной фазе масла, образуя эмульсию в виде «вода в масле».

Большой вклад в изучение адъювантов и иммуномодуляторов внёс Юлис Фрейнд с соавторами в 1939-1947 годах, и разработал полный и неполный адъювант Фрейнда.

Неполный адъювант Фрейнда представляет собой эмульсию водного адъюванта в минеральном масле с низким удельным весом и вязкостью. Интенсивная выработка антител осуществляется благодаря постепенной резорбции иммуногена в месте инъекции [37]. Полный адъювант включает в

себя эмульгатор, минеральное масло и инактивированные микобактерии [114, 115].

В настоящее время иммуностимулирующее действие адъювантов изучены не до конца. Исследователи по разному объясняют действие адъювантов на иммунный ответ организма, многие считают что адъюванты стимулируют действие факторов как специфического, так и неспецифического иммунитета [14].

Имуностимулирующее действие адъювантов связывают, с одной стороны, с непосредственным воздействием на организм (характеризуется усилением воспалительной и плазмоцитарной реакции, повышением общей иммуногенной реактивности, синтезом белка и нуклеиновых кислот, стрессовыми воздействиями), а с другой стороны – опосредованным через изменение физико-химического состояния антигена (корпускулирование растворенного в воде антигена путем сорбции или эмульгирования). В последнем случае изменяются условия захвата антигена макрофагами, ферментирования его в организме. Таким образом, происходит депонирование антигена в организме, что приводит к его воздействию на иммунную систему по принципу суммации раздражений и, как следствие, формированию более напряженного иммунитета.

Адъювантное действие проявляется образованием низкомолекулярных нуклеиновых кислот на месте их введения, замедлением расщепления антигенных молекул в организме за счет уменьшения числа макрофагов, а также слияния фагосом с лизосомами и лизосомальных ферментов.

За счет этого достигается более продолжительное и эффективное представление антигена иммунокомпетентными клетками. На клеточном уровне действие адъювантов связывают с вовлечением их в иммунный ответ макрофагов и Т-хелперов [67].

Действие адъювантов сводится к двум основным направлениям. В первом случае адъювант может изменять физико-химические параметры антигена: его

молекулярный вес и структуру, полимерность, растворимость и прочее. Во втором случае он стимулирует функции иммунной системы организма.

В зависимости от своих свойств, адъюванты стимулируют гуморальный или клеточный, либо одновременно оба вида иммунитета.

По данным Н.В. Медуницына, действие адъюванта проявляется следующим образом:

- созданием «депо» антигена и замедлением его всасывания;
- появлением воспалительной реакции;
- усилением реакции со стороны лимфатических узлов;
- изменением физико-химического свойства антигена;
- усилением синтеза белков;
- активацией системы комплемента;
- усилением процессинга и презентации антигена Т- клетками;
- усилением функции вспомогательных клеток;
- ускорением транспорта антигена к иммунокомпетентным клеткам;
- стимуляцией пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В- клеток и их взаимодействия;
- стимуляцией образования цитокинов.

Масляные адъюванты являются одними из наиболее надежных адъювантов, при использовании в составе ветеринарных вакцин они позволяют получить универсальные (пригодные для иммунизации животных всех видов и разных возрастных групп) препараты, способствуют формированию продолжительного напряженного иммунитета [48, 50, 105, 121].

Традиционные масляные адъюванты, например, «Адъювант – 65», минеральные масла фирмы «Маркол», «Эссо» эмульгаторы «Arlacel-A» или «Монтанид» обладают высокой кинетической вязкостью [101, 120].

Реактивность эмульсионных вакцин зависит, главным образом, от степени очистки вирусосодержащей суспензии, наличия и концентрации в

составе адъюванта серосодержащих соединений и ароматических углеводов, дозы препарата и типа эмульсии [65, 69, 74].

Масло для изготовления эмульсионных вакцин должно быть легко вводимым, жидким и не содержащим токсических компонентов. Вязкость эмульсионных вакцин снижают путем введения в их состав гидрофильных эмульгаторов, например Твин-80, Твин-81 и других, либо за счет увеличения количества масляного адъюванта в составе препарата. Так, известно, что от свойств эмульгаторов зависит целый ряд физико-химических показателей вакцины [95, 127].

С целью повышения иммуногенности эмульсионных вакцин и понижения реактогенности и вязкости, продолжают совершенствовать масляные адъюванты. Это достигается, прежде всего, за счет использования новых масел и эмульгаторов [65].

В частности, положительную оценку ряда исследователей получили новые адъюванты фирмы «SEPPIC» (Франция), в которых в качестве эмульгаторов используются эфиры ангидроманкина и олеиновой кислоты, такие как Монтанид-103 (Монтанид-70 (ISA) и Монтанид- 888, Монтанид-206 (ISA) и др.). Вирусные и бактериальные вакцины на основе данных адъювантов обладают низкой вязкостью, являются слабо реактогенными, и могут быть использованы для иммунизации различных видов сельскохозяйственных животных и домашней птицы [95, 127].

Среди иммуноадъювантов липосомы занимают особое место. Адъюванты долгое время оставались объектом научных исследований, но на сегодняшний день они постепенно находят своё применение и в ветеринарии. Об этом свидетельствуют сообщения в литературе о применении липосом для производства биологических препаратов.

В качестве транспортных средств доставки антигена и стимуляции иммунной системы исследуется целый ряд наночастиц: липосомы, ниосомы,

виросомы, иммуностимулирующие комплексы, полимерные наносферы и др. [145].

Липосомальные везикулы, благодаря своему близкому строению с цитоплазматической мембраной клеток, позволяют предохранять антиген не только от разрушения в активных средах организма, но и от взаимодействий с компонентами крови. При этом они осуществляют направленный транспорт к клеткам ретикулоэндотелиальной системы [144].

Преимущества использования липосом перед другими иммуноадьювантами следующие:

- при применении липосом не иммуногенные или слабо иммуногенные субстанции становятся иммуногенными;
- в качестве базиса можно использовать небольшие количества антигенов;
- на их основе можно конструировать поливалентные вакцины;
- в липосомальные структуры можно включать адьюванты сочетая их с антигенами;
- при применении препаратов на основе липосомальных структур достигается высокий титр функциональной активности антител у животных.

Таким образом, опубликованные в литературе данные свидетельствуют о целесообразности разработки новых лекарственных форм и способов доставки инактивированных антигенов для профилактики респираторных болезней животных.

1.6 Заключение по обзору литературы

Респираторные заболевания крупного рогатого скота снижают интенсивность роста и развития молодняка, что напрямую влияет на интенсивность и продолжительность, возможную продуктивность скота и наносят экономический ущерб сельскому хозяйству [64].

В этиологии и патологии респираторных болезней немаловажную значимость представляют возбудители парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Наравне с возбудителями парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита в формировании инфекционного процесса существенную значимость представляют выступающие с ним в ассоциации некоторые инфекционные агенты (вирусы, бактерии, микоплазмы), а также неблагоприятные факторы внешней среды.

Именно поэтому диагностировать данные инфекции следует, подтверждая лабораторными исследованиями, потому что их достаточно трудно диагностировать, основываясь только на клинических, патологоанатомических и эпизоотологических признаках.

К методам профилактики респираторных заболеваний включают применение живых и инактивированных вакцин. Вакцинация в условиях современного промышленного скотоводства остается одним из наиболее эффективных способов профилактики респираторных заболеваний крупного рогатого скота. Достоинства вакцинопрофилактики во многом зависят от типа и качества используемых препаратов.

Живые вакцины имеют преимущества над инактивированными вакцинами, такие как: однократное использование, формирование быстрого иммунного ответа, экономичность, но они могут вызвать побочные эффекты (иммуносупрессию, респираторную патологию).

Инактивированные вакцины безопасны, не реактогенны, не сопровождаются вирусносительством и вирусовыделением, поэтому не происходит трансвариального распространения - диких вирусов и микоплазм, как это возможно в случае применения живых эмбриональных вирус - вакцин.

Эти вакцины легко дозировать и комбинировать с другими биопрепаратами.

Однако большинство инфекций вызывают два или более возбудителей, поэтому в последние годы широко применяются ассоциированные вакцины, предназначенные для профилактики нескольких заболеваний [12]. Эффективным считается применение двух-, трехвалентных вакцин двумя – тремя инъекциями.

Все это свидетельствует о необходимости оптимизации схемы получения и производства высококачественных инактивированных вакцин против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, который отличался бы высокой технологичностью.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что проблема усовершенствования технологии изготовления вакцин против инфекционного ринотрахеита и других респираторных заболеваний крупного рогатого скота является предметом исследовательской деятельности ученых всего мира. Однако еще нет однозначного ответа в решении вышепоставленных вопросов.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в хозяйстве ООО «Кутлушкино» Чистопольского района РТ в период 2013 –2016 г.г.

Экспериментальные и производственные опыты проводили в соответствии с установленными требованиями к эксперименту по подбору аналогов, постановке контроля, соблюдению одинаковых условий кормления и содержания животных в период работы и учета результатов.

При постановке опытов были использованы фармакологические, токсикологические, биохимические, клинические, морфологические, физиологические, серо-иммунологические и другие методы исследований.

Исследования проводили в соответствии со схемой основных этапов исследования инактивированной липосомальной вакцины (рисунок 1).

В опытах были использованы экспериментальные инактивированные моно - и ассоциированные инактивированные вакцины на основе липосомальных структур.

Перечень проведенных исследований приведен в таблице 1.

Перед постановкой экспериментов опытные животные находились под наблюдением.

При этом соблюдались существующие зоогигиенические нормы содержания и условия кормления подопытных и контрольных животных. Животных подбирали по принципу аналогов с учётом породы, пола, возраста, живой массы и состояния здоровья.



Рисунок 1 – Схема основных этапов исследования инактивированной липосомальной вакцины

Таблица 1 – Перечень проведенных исследований

№ п/п	Наименование опыта	Объект исследования	Количество животных, голов
1.	Клинико-эпизоотологический и серо-иммунологический мониторинг респираторных заболеваний в хозяйстве	Крупный рогатый скот	135
2.	Напряженность иммунитета у телят при применении коммерческой вакцины	Телята	20
3.	Изучение безвредности инактивированной липосомальной вакцины	Белые мыши	15
4.	Разработка оптимальных соотношений антигена с липосомальными структурами	Белые мыши	36
5.	Лабораторные испытания антигенной активности инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота	Белые мыши	80
6.	Гематологические показатели крови кроликов	Кролики	24
7.	Биохимические исследования сывороток	Кролики	24

8.	Комплексная оценка Т- и В-систем иммунитета после вакцинации кроликов инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота	Кролики	24
9.	Серологические показатели крови кроликов, вакцинированных инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота	Кролики	24
10.	Производственные испытания инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота	Телята	20

Животные были подобраны по принципу аналогов и находились в одинаковых условиях содержания и кормления.

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

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».

Серо-иммунологические исследования:

- антигемагглютинины к вирусу парагриппа-3 определяли в реакции торможения гемагглютинации. Диагностическим титром считали разведение сыворотки 1:40 и выше;

- вируснейтрализующие антитела к вирусу ИРТ выявляли в реакции нейтрализации на перевиваемой линии культуры клеток МДВК с использованием вакцинного штамма «ТК-А (ВИЭВ)-В2 герпесвируса типа I крупного рогатого скота. За диагностический титр принимали активность сыворотки 1:4 и выше.

- реакции нейтрализации (РН) на перевиваемой линии культуры клеток МДВК с использованием вакцинного штамма «ТК-А (ВИЭВ)-В2» герпесвируса-I крупного рогатого скота;

Выделение липосом. Основной компонент для получения липосом – фосфатидилхолин (лецитин) - получали из куриного желтка [3]. В качестве органического растворителя использовали 94 % эфир и ацетон. С целью полноценного образования бислойных везикул при изготовлении липосом раствор фосфолипидов постоянно перемешивали на магнитной мешалке.

Основными приборами для изготовления липосом является ультразвуковая ванна и роторный испаритель.

Для ультразвуковой обработки вакцины использовали аппарат UM-4 фирмы "Unitra" (емкость ванны 4 дм³, частота 25 кГц) с низкой интенсивностью ультразвукового воздействия. Ультразвуковую ванну предварительно заполнили дистиллированной водой (промежуточной средой), в которую и поместили флаконы со смесью. Ультразвуковую обработку вели в течение 10-15 мин при комнатной температуре.

Для выпаривания и получения липидной пленки использовали роторный испаритель (RVO-64, Чехословакия). При эксплуатации его соединяют с водоструйным насосом. Очень важно строго соблюдать последовательность операций при эксплуатации прибора. Далее пускали воду в холодильник и включили водоструйный насос. Присоединили к прибору колбу с эмульсией для удаления органических растворителей и для получения тонкой пленки фосфолипидов на стенке колбы.

Во время испарения колба постоянно находилась в терморегулируемой водяной бане и вращалась (40 °С при 4±2 мм рт.ст.). Важно контролировать процесс, чтобы не происходило вскипания органического растворителя.

При проведении опытов использовали концентрированные антигены вируса парагриппа-3 штамм «ПТК-45/86» и антиген вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота «ТК-А (ВИЭВ) - В2», инактивированные 0,2%-ным раствором формалина с липосомами.

Липосомы изготавливали различными методами.

После изготовления вакцин до проведения опытов все партии исследовали в РТГА с 1% взвесью эритроцитов морской свинки.

Для этого в серологической реакции использовали эритроциты морской свинки. Кровь брали из ушной вены в стерильную пробирку, содержащую 2,5% - ный цитрат натрия и физиологический раствор в разведении 1:2. Далее трижды центрифугировали кровь при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут. Из осадка отмытых эритроцитов готовили 1% - ную суспензию на физиологическом растворе.

О степени адсорбции вирусного антигена к эритроцитам судили по наличию гемагглютинации на дне лунок полистироловой пластинки.

Ультраструктуру липосомальных везикул изучали под электронным микроскопом, используя метод негативного контрастирования. Для этого препараты регидратированной вакцины фиксировали и из них готовили ультратонкие срезы.

К осадку липосомальной суспензии добавили 0,5 мл 1% - ный глутаровый альдегид на 0,1 М фосфатном буфере, выдерживали в течение 30 минут при постоянном помешивании. Каплю препарата (липосомальной суспензии) наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата в течение 1 минуты при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой, просушивали, а затем просматривали на электронном микроскопе JEM 100CX-2 («Jeol» Japan).

Стерильность определяли на питательных средах по ГОСТ 28085 и согласно «Руководству Международного эпизоотического бюро по стандартам для диагностических тестов и вакцин» на бактериальное загрязнение, исключение контаминации грибами и микоплазмами.

Посевы проводили на следующие питательные среды: МПА, МПБ, МППБ и в пробирки со средой Сабуро. О стерильности материалов судили по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах.

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

Определение стерильности каждой серии вакцины проводили с помощью питательных сред: МПА, МПБ, МППБ и в пробирки со средой Сабуро.

О стерильности материалов судили по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах.

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;

D – показатель оптической плотности при длине волны 280 нм;

R – разведение пробы.

Разработка оптимальных соотношений антигена с липосомальными структурами. Опытные серии вакцины были изготовлены из антигенов вирусов инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3, инаktivированных формальдегидом и соединенных с липосомальными структурами. Липосомы смешивали в различных сочетаниях с инаktivированными вирусными антигенами (1:1;1:5; 1:10). Смешивание проводили непосредственно во время выделения липосом. Вакцины вводили белым мышам и через определенные интервалы времени брали кровь для исследования в РТГА с 1%-ной взвесью эритроцитов морской свинки.

Экономическая эффективность применения инаktivированной липосомальной вакцины. По результатам производственных испытаний проводили расчет экономической эффективности применения инаktivированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на телятах.

Расчеты экономической эффективности применения инаktivированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота рассчитали по И.Н. Никитину и др. [70] с учетом действующих цен.

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

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Анализ производственной деятельности опытного хозяйства

Производственное направление ООО «Кутлушкино» (с. Кутлушкино) – зерновое, молочное, мясное. В хозяйстве имеется 2300 голов крупного рогатого скота, в том числе 600 голов коров (таблица 2). Продуктивность одной коровы в среднем составляет 5699 кг молока в год, жирность молока 3,8 %. Содержание животных в стойловый период привязное, в летний период – в летних лагерях.

Таблица 2 – поголовье крупного рогатого скота

Наименование половозрастной группы	МТФ №1	МТФ №2	Молодняк крупного рогатого скота	Всего
Бык- производитель	16	4	-	20
Коровы	403	197	-	600
Нетели	183	68	-	251
Телки -2014	-	-	-	298
Телки -2015	-	-	412	412
Телки -2016	31	39	35	105
Бычки-2015		3	219	222
Бычки-2016	25	40	27	92
Взрослый скот на откорме	206	94	-	300
ИТОГО:	856	445	991	2300

Породный состав стада выглядит следующим образом: коровы имеют породность 3 поколения по Голштинской и Айрширской породам, а их потомство уже принадлежит к 4 поколению, или чистопородное.

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

При респираторных заболеваниях крупного рогатого скота постановка диагноза сложная, основана на комплексном анализе эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, но решающее значение имеют лабораторные исследования: вирусологические, бактериологические, биологические, серологические. При постановке диагноза учитывают возможность одновременного поражения животных различными вирусами, а также возбудителями бактериальных болезней, микоплазмозов, хламидиозов и т.д.

Поэтому при ретроспективном анализе хозяйства использовали различные методы: серологические, клинико-эпизоотологические и вирусологические.

Собранные пробы исследовали двумя серологическими реакциями: РН и РТГА для более точной постановки диагноза. Анализ и учет реакции проводили с помощью диагностического набора для выявления антител к респираторным вирусам.

При обследовании животных в хозяйстве ООО «Кутлушкино» установлены респираторные болезни как у молодняка во всех возрастных группах от новорожденных, так и взрослого поголовья. У новорожденных телят клинические признаки респираторной патологии варьировали от субклинических до ярко выраженной респираторной патологии.

С развитием респираторной патологии у животных отмечали подъем температуры тела до 40,5 - 41 °С, гиперемию слизистых оболочек носовой полости, серозные истечения из глаз, болезненный сухой кашель, который по мере развития пневмонии (10-12 сут.) переходил во влажную форму. К 10 - ти суточному возрасту появлялся ринит, кашель, диарея, конъюнктивит, западание глазных яблок, обезвоживание, фекалии темно-зелёного оттенка, иногда с прожилками крови. При клиническом осмотре телят старше 2-х месячного возраста с разными формами течения инфекционного ринотрахеита регистрировали слизистые, в дальнейшем слизисто-гнойные истечения, отмечали кашель, хрипы, телята проявляли беспокойство.

В период с 2013 по 2016 гг. нами исследовано 135 проб сывороток крови, инфекций крупного рогатого скота: коровы - 50, нетели - 25, телята каждой возрастной группы по 20 проб (рисунок 2).

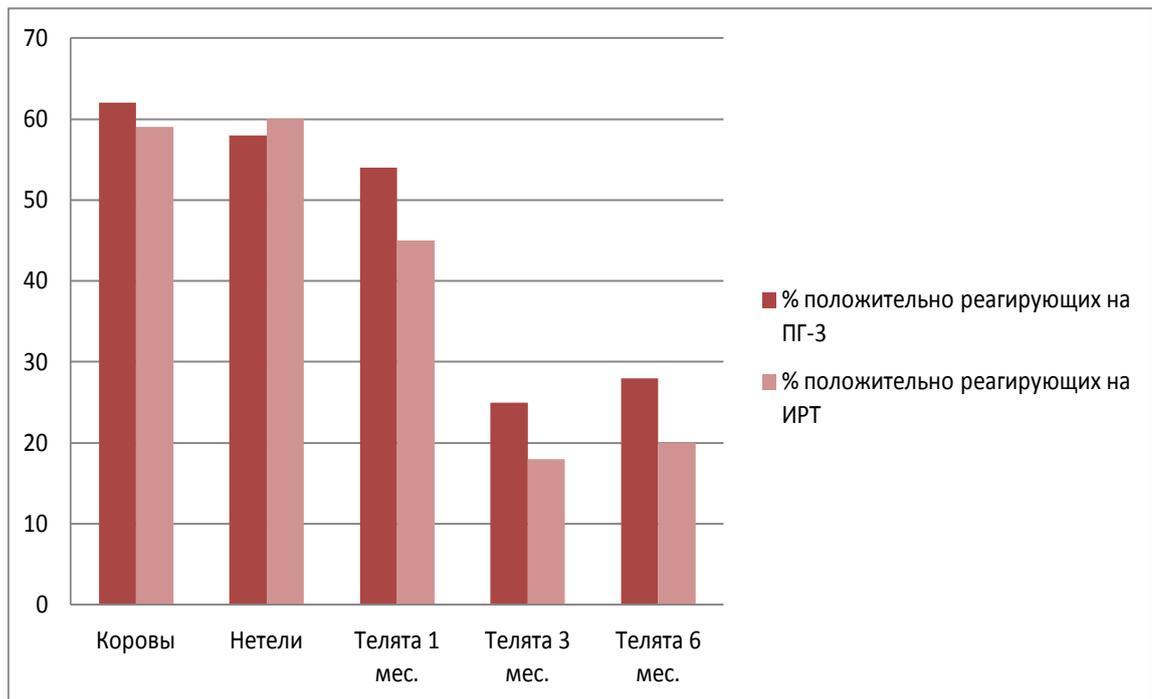


Рисунок 2 – Структура положительно реагирующих проб сывороток крови крупного рогатого скота в отношении герпесвирусной типа I инфекции и парагриппа-3 крупного рогатого скота

По представленным данным видно, что в пробах сывороток крови крупного рогатого скота установлена высокая серопозитивность животных к антигенам вирусов парагриппа-3 (62 %) и герпесвируса типа I (60 %). Значительно высокая серопозитивность наблюдалась в сыворотках коров и нетелей.

Поэтому принято решение по проведению профилактических мероприятий против инфекционного ринотрахита и парагриппа-3 с помощью вакцинопрофилактики.

2.2.3 Мониторинг сезонности респираторных инфекций в хозяйстве

Вспышки вирусных респираторных болезней чаще регистрировали в зимне-весеннее и осенне-зимнее время (рисунок 3). Заболеваемость ИРТ повышалась с начала января и постепенно снижалась к середине апреля, следующая волна роста числа заболеваний начиналась с середины октября и продолжалась до конца ноября.

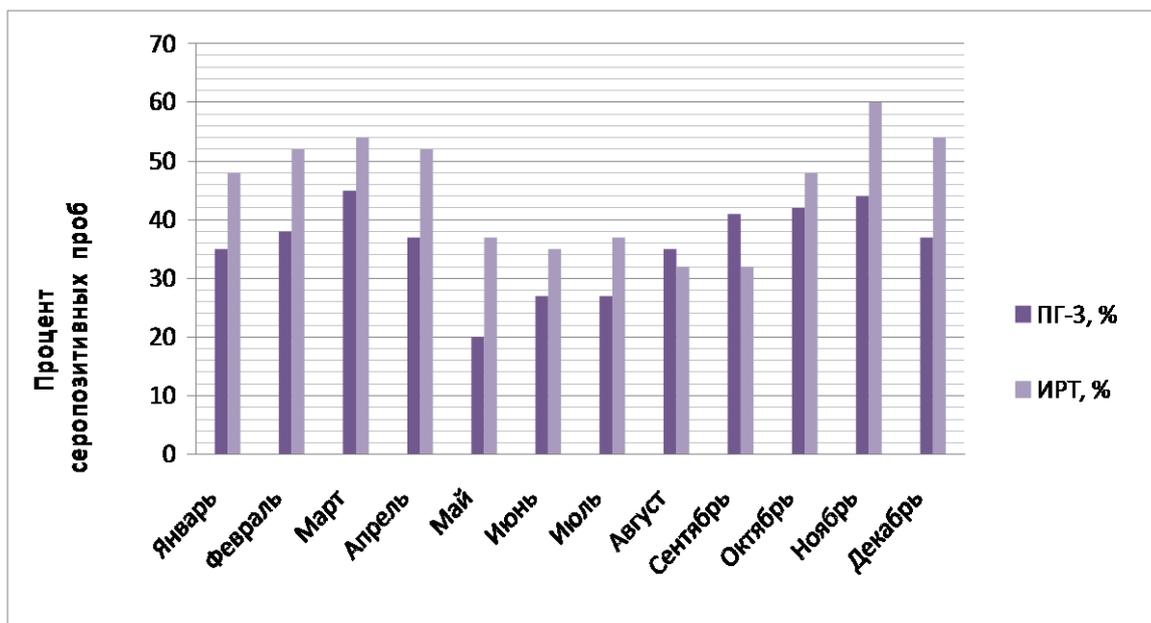


Рисунок 3 – Мониторинг сезонности проявления респираторных инфекций в исследуемом хозяйстве

Рост заболеваемости животных ПГ-3 наблюдали в весенне-осенний период, с начала февраля и до середины марта, с постепенным снижением к концу апреля. Вторая волна роста заболеваемости животных парагриппом-3 приходится на осенний период, а именно: на конец августа - середину ноября.

В исследуемом хозяйстве для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота используют коммерческую вакцину – инактивированную комбинированную против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза крупного рогатого скота (КОМБОВАК-Р).

Нами было решено провести исследование по установлению напряженности иммунитета у телят после применения данной коммерческой вакцины (таблица 3).

Таблица 3 – Напряженность иммунитета у телят при применении коммерческой вакцины ($M \pm m$), $n=20$

Телята в возрасте 30 суток и старше	Срок исследования			
	20 день	60 дней	120 дней	180 дней
	Титр антител в РТГА на ПГ-3, (\log_2)			
	4,5 \pm 0,16	9,30 \pm 0,20***	7,80 \pm 0,22***	5,50 \pm 0,12**
	Титр антител в РН на ИРТ, (\log_2)			
	2,90 \pm 0,13	5,30 \pm 0,17***	4,40 \pm 0,12***	2,80 \pm 0,12

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

С этой целью были отобраны по принципу аналогов 20 телят 30-ти дневного возраста. Вакцину вводили внутримышечно в дозе 2 см³/гол., ревакцинировали через 20 дней согласно инструкции по её применению. Кровь для серологических исследований брали на 20, 60, 120 и 180 день после вакцинации.

Напряженность поствакцинального иммунитета определяли в реакции торможения гемагглютинации (ПГ-3) и в реакции нейтрализации (ИРТ).

По результатам серологических исследований достоверный рост титров антител ко всем вирусным антигенам наблюдался после введения вакцин, которые достигали своих максимальных значений к 60-дням исследований, (ПГ-3 – $9,30 \log_2$, ИРТ – $5,30 \log_2$) с постепенным снижением титра антител к 180-суткам исследований.

Таким образом, животные, иммунизированные данной (коммерческой) вакциной сохраняли напряженный иммунитет до 6 месяцев после вакцинации, с последующим снижением титра антител. При этом титры антител к инфекционному ринотрахеиту и парагриппу-3 выявляли и у невакцинированных животных, что указывало на персистенцию вируса в организме, который при снижении резистентности может создать эпизоотическую ситуацию.

Поэтому нами была поставлена задача усовершенствования ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота на основе новых технологий.

2.2.4 Изготовление липосомальных структур

В качестве главного компонента для изготовления липосом использовали фосфолипиды (фосфатидилхолин). Они входят в структурные клеточные мембраны и синтезируются в организме в наибольшем количестве в нервных тканях и в тканях мозга, сердца, печени, легко образуют комплексы с белками, участвуют в формировании клеточной оболочки и внутриклеточных мембран.

В литературе известны методики экстракции и фракционирования, природного фосфотидилхолина из сырья животного происхождения: органов и

тканей млекопитающих, куриных яиц, рыб, моллюсков [100, 137]; из водорослей, грибов, бактерий [110]. Разработаны технологии выделения фосфатидилхолина из растительного сырья: подсолнечника, сои, рапса и других растений [124, 126, 128, 129].

Мы остановили свой выбор на сырье животного происхождения - на курином яичном желтке. Для получения лецитина растворили сухой куриный желток в этиловом спирте, слегка подогревая его над пламенем горелки для максимального растворения. Отфильтровав полученную суспензию, добавили к нему несколько капель ацетона [3].

Образовавшийся осадок свидетельствовал об осаждении лецитина (фосфатидилхолина).

Далее суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3-4 минут. Надосадочную жидкость слили, а осадок подвергли лиофильному высушиванию на аппарате камерного типа модели «Дельта А» фирмы «Крист». Сначала материал заморозили до минус 40 °С. Затем камеру вакуумировали. Во время высушивания поддерживали рабочее давление в установке 120-130 мм рт. ст.

На сегодняшний день предложено большое количество разнообразных методов приготовления липосом, позволяющих получать везикулы различного размера, состава, структуры и внутреннего объема.

Формирование липосомальных структур происходит с использованием в качестве дисперсной среды водной фазы, оказывающей существенное влияние на образование липидной мембраны.

Целью настоящего раздела работы явилось оценка пригодности различных способов получения стабильных липосом с максимальным внутренним объемом для последующего включения антигена. Липосомы готовили из фосфолипидов животного происхождения, а именно из куриного яичного желтка.

С целью выделения липосом использовали несколько методик его получения (рисунок 4 и 5). Формирование липосом производили с использованием в качестве дисперсионной среды водной фазы, оказывающий существенное влияние на образование липидного бислоя.

Использовали фосфолипиды выделенные из куриного желтка (методика описана выше).



Рисунок 4 – Схема получения липосомальных структур



Рисунок 5 – Схема изготовления липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота

Экспериментальные серии вакцины готовили следующим образом:

- Лецитин растворили в 96% -ном растворе этанола и с помощью шприца ввели в заранее подготовленный раствор, состоящий из антигена и 0,01 М фосфатного буфера рН 7,2-7,5 предварительно подогретого до 38 °С (метод «инъекции»). При этом важно постоянно перемешивать раствор на магнитной мешалке.

- Лецитин растворили в эфире и добавили раствор 0,01 М фосфатного буфера, в котором предварительно растворили антиген рН 7,2-7,5. Раствор обработали ультразвуком (рисунок 6) 20 к Гц мощностью 200 Вт в течение нескольких минут. Эмульсию обработали роторным испарителем (рисунок 7) с целью удаления органических растворителей и для получения тонкой пленки фосфолипидов, постоянно отслеживая, чтобы раствор не вскипел. По окончании выпаривания на стенках колбы образуется тонкая пленка.

В колбу с пленкой добавили 0,01 М фосфатный буфер рН 7,5 и в течение часа выдерживали в термостате.

- Использовался метод идентичный описанному во 2 методе, отличие только в этапе добавления антигена. Лецитин растворили в эфире, добавили фосфатный буфер, но не смешивали его с антигеном. Далее эмульсию подвергли ультразвуковой обработке. С целью удаления органических растворителей и для получения тонкой пленки фосфолипидов на стенке колбы воспользовались роторным испарителем.

В колбу с пленкой добавили фосфатный буфер, в котором и растворили антиген. Раствор также выдерживали в термостате.

В результате получили липосомы с однородной структурой и размерами. Во время хранения образовывался незначительный осадок, который легко разрушался во время встряхивания.



Рисунок 6 – Ультразвуковая ванна UM-4 фирмы "Unitra" (емкость ванны 4 дм³, частота 25 кГц)



Рисунок 7 – Роторный испаритель RVO-64, Чехословакия

С целью обеспечения стерильности липосомальной вакцины во всех этапах изготовления экспериментальных вакцин строго соблюдали асептические условия, так как воздействие высоких температур, дезинфектантов и др. способы стерилизации разрушают структуру липосом.

В качестве антигенов использовали инаktivированные 0,2% -ным раствором формалина антигены вируса парагриппа-3, штамм «ПТК-45/86» и антиген инфекционного ринотрахеита, штамм «ТК-А (ВИЭВ)-В2».

В процессе опытов была изучена безвредность и антигенная активность, что позволило использовать их в качестве иммуностимуляции в составе вакцин.

2.2.4.1 Определение размеров и содержимого липосом

Производили с помощью электронной микроскопии методом негативного контрастирования предварительно фиксированных препаратов регидратированной вакцины. Просмотр препаратов осуществляли на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX-2 («Jeol» Japan) при инструментальном увеличении 10000-50000. Съемку проводили на пленку AGFA ORTHOCHROMATIC. Для получения микрофотографий негативы сканировали на сканере EPSON PERFECTION 4990 PHOTO с разрешением 600 dpi. Конечный результат (рисунки 8 и 9) обрабатывали с помощью программ ACD SeeProv.6. и Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

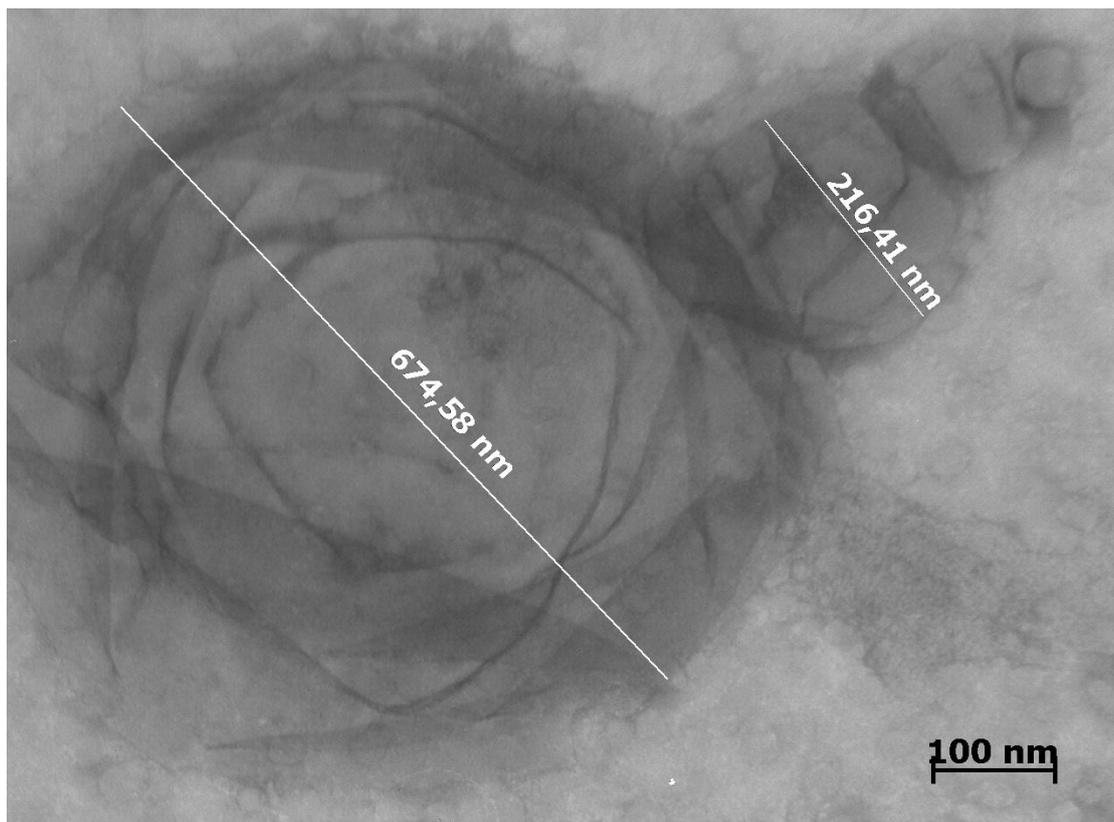


Рисунок 8 – Липосомальная структура

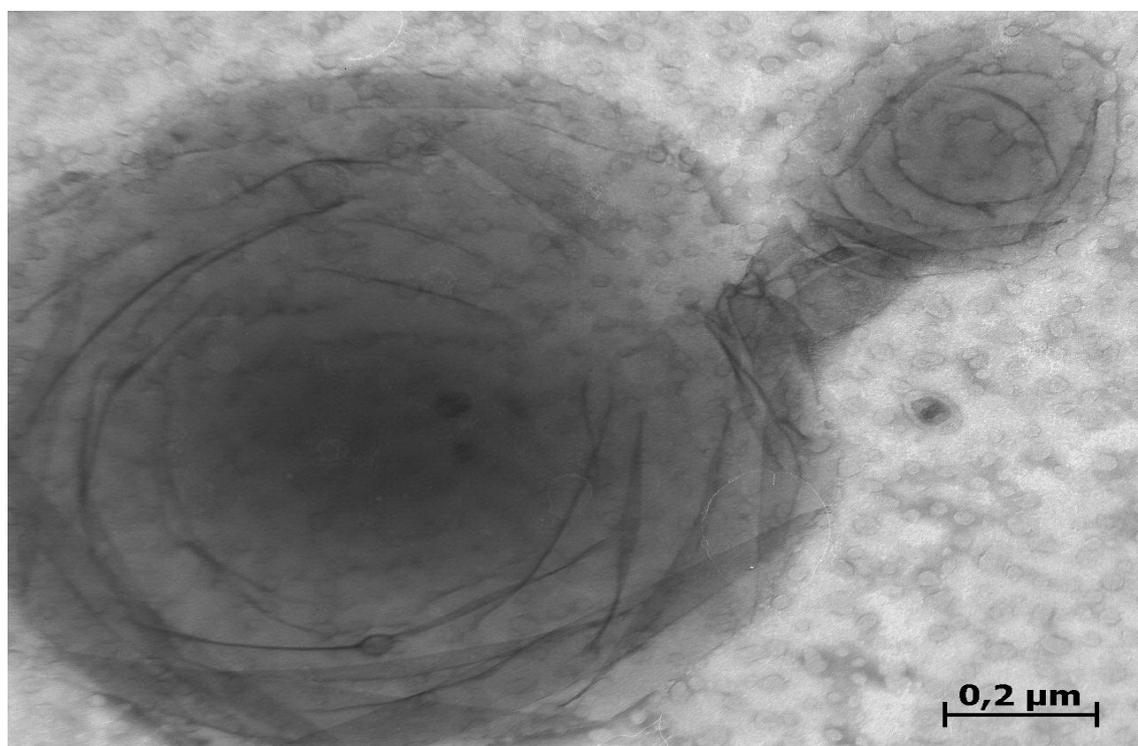


Рисунок 9 – Многослойность липосомальных структур

2.2.4.2 Изучение безвредности инактивированной липосомальной вакцины

Считается что, бислойная структура липосом идентична мембранам клеток микроорганизма и поэтому способна со временем биodeградироваться в организме, не проявляя токсических свойств.

Для исследования токсичности липосом была сформирована группа белых мышей в количестве 15 голов. Мышам вводили липосомальную вакцину подкожно, однократно в различных дозах, а именно: по 0,1; 1,5 и по 2,0 см³/гол.

За животными вели наблюдение в течение 20 дней, следили за клиническим состоянием мышей и проводили оценку тканевых реакций на введение вакцины.

Было изучено проявление местных тканевых реакций на подкожное введение вакцин, приготовленных на основе липосомальных структур.

За все время опытов не наблюдалось каких-либо изменений или отклонений в поведении животных, гранулематозных реакций после введения вакцины. Все мыши были клинически здоровы, павших животных не было.

При патологоанатомическом вскрытии опытных мышей визуально оценивали место инъекции, местные реакции были минимальными и наблюдались в течение 4-5 суток после инъекции (легкое побледнение тканей на месте введения вакцины, 0,4 мм в диаметре, отсутствие воспаления). Результаты эксперимента показали, что вакцина с липосомальными структурами безвредна.

2.2.5 Разработка оптимальных соотношений антигена с липосомальными структурами

В дальнейшем для изучения наиболее оптимального соотношения основных ингредиентов, а именно антигена с липосомальными структурами были изготовлены и испытаны образцы вакцин, различающиеся по соотношению.

Для изготовления инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 использовали инактивированный антиген вируса ПГ-3 (штамм «ПТК-45/86») и выделенные нами липосомальные структуры. Антиген соединяли с липосомальными структурами в соотношениях: 1:1; 1:5; 1:10 (таблица 4).

Испытание полученных образцов вакцины проводили на 36 белых мышах, которым вводили вакцину подкожно в дозе $0,1 \text{ см}^3$ /гол. Кровь для серологических исследований брали на 14 и 28 день после вакцинации и исследовали на наличие антител к вирусу парагриппа-3 в РТГА.

Таблица 4 – Изучение соотношения антигена с липосомальными структурами ($M \pm m$), $n=6$

Группа	Соотношение АГ и липосом	Титр в РТГА к вирусу ПГ-3(\log_2)	
		14 дней	28 дней
1	1:1	$5,0 \pm 0,28$	$7,67 \pm 0,23^{***}$
2	1:5	$4,17 \pm 0,18$	$6,33 \pm 0,23^{***}$
3	1:10	$3,83 \pm 0,34$	$6,0 \pm 0,28^{***}$

Примечание: $*** = p \leq 0,001$

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 эффект получен при использовании вакцин, где соотношения антигена с липосомами были 1:1. В результате проведенных исследований был определен оптимальный состав вакцинного препарата по количеству вирусного антигена.

Поэтому в дальнейших испытаниях использовали липосомы именно такого соотношения.

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

Вакцины изготовили по всем трем методам, описанным выше. С целью изучения антигенной активности инактивированной липосомальной вакцины против парагриппа-3 крупного рогатого скота, сформировали опытную группу из 80 мышей, по 20 голов в каждой группе.

Мышам первой группы подкожно вводили вакцину с липосомальными структурами, изготовленную методом «инъекции».

Второй опытной группе животных вводили инактивированную липосомальную вакцину, полученную методом «выпаривания и обращения фаз, где антиген добавляется до обработки эмульсии УЗ, третьей группе вводили вакцину, изготовленную по методу выпаривания и обращения фаз, но с добавлением антигена после гомогенизации и испарения.

Все вакцины вводили в одинаковых дозах, а именно 0,1 см³/гол., двукратно с интервалом 14 дней.

Контрольной группе 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 день и 60 день опытов (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты серологических исследований на белых мышах ($M \pm m$), $n=5$

№ группа	Вакцина Липосомальная вакцина	Срок исследования			
		До вакцинации	14 день	28 день	60 день
		Титр антител в РТГА на ПГ-3, \log_2 .			
1	1 группа	0	$5,40 \pm 0,27^*$	$7,40 \pm 0,27^*$	$7,60 \pm 0,27^*$
2	2 группа	0	$5,60 \pm 0,27^{**}$	$7,80 \pm 0,42$	$8,20 \pm 0,42^{**}$
3	3 группа	0	$5,40 \pm 0,45^*$	$7,80 \pm 0,22^{**}$	$8,00 \pm 0,23^*$
4	Контрольная группа	0	$4,20 \pm 0,22$	$6,20 \pm 0,42$	$6,50 \pm 0,37$

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

Иммунный ответ к вирусу парагриппа-3 у мышей проявился уже на 14 день исследований. Уровень антител у белых мышей во всех подопытных группах через 14 дней незначительно различался 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 исследований были выше во второй и третьей опытной группе и составили $8,00 \pm 0,23$ - $8,20 \pm 0,42 \log_2$, при этом в контрольной группе этот показатель был на уровне $6,50 \pm 0,37 \log_2$ соответственно (рисунок 10).

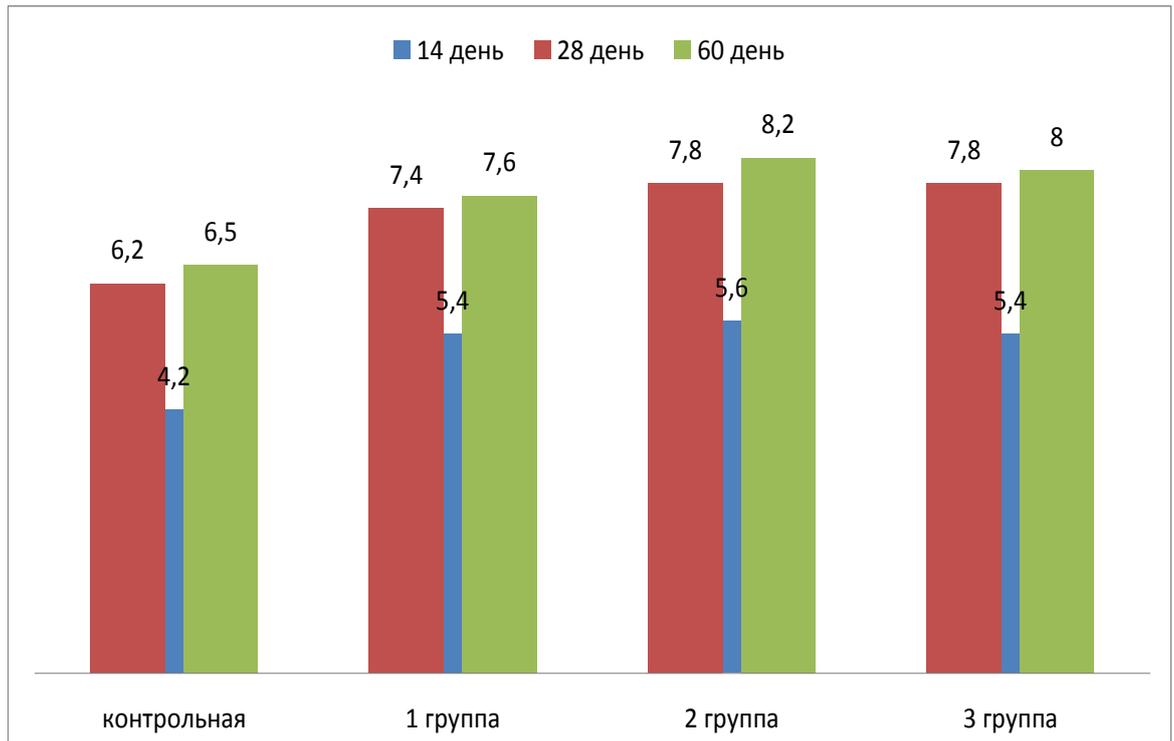


Рисунок 10 – Изучение антигенной активности липосомальной вакцины на белых мышах

Вакцины, изготовленные с липосомальными структурами, индуцировали в организме привитых животных, вырабатывали специфические антитела к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота, что указывало на специфическую активность препарата. Титры антител сыворотки крови к опытной вакцине были достаточно высокими и превосходили аналог на 2 порядка. Таким образом, лабораторные испытания антигенной активности липосомальной вакцины против ПГ-3 крупного рогатого скота показали достаточно высокую специфическую активность, что позволило продолжить дальнейшие испытания по разработке ассоциированной вакцины.

2.2.6.1 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 инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота готовили с использованием инактивированных 0,2%-ным раствором формалина концентрированных антигенов вирусов ПГ-3 – штамм «ПТК-45/86» и ИРТ - «ТК-А (ВИЭВ) – В2» на основе иммуностимулятора – липосомальных структур.

Основной задачей было создание вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота оптимальный по составу и сконструировать 2-х валентную вакцину, чтобы иммунный ответ был аналогичен по применению с моновалентной вакциной и был стабильным по составу.

Ранее проведенные опыты уже подтвердили стерильность, безвредность и антигенную активность липосомальных вакцин. Найден оптимальный режим 1:1 при соотношении антигена с липосомальными структурами.

С целью изучения клинико-биохимических показателей крови кроликов при введении инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота были сформированы 2 опытные и одна контрольная группы кроликов по 8 голов в каждой группе, живой массой тела 2,0 - 2,5 кг.

Животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания.

Кроликам первой и второй групп вводили вакцины в дозе 1,0 см³/гол., внутримышечно, в область нижней трети шеи, двукратно, с интервалом 14 дней.

Первую опытную группу кроликов вакцинировали инактивированной липосомальной вакциной против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, вторая группа животных была вакцинирована ассоциированной инактивированной эмульсионной вакциной против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота. Кролики третьей группы были интактными (контроль).

Исследование крови опытных и контрольных животных проводили до вакцинации (фон), затем на 30-е и 60-е сутки опыта (таблица 6).

Фоновый показатель уровня гемоглобина в крови кроликов контрольной группы составил $102,13 \pm 0,24$ г/л, в остальных группах (1 и 2) этот показатель колебался от $119,38 \pm 0,20$ г/л до $127,00 \pm 0,20$ г/л.

За весь период исследований в опытных и контрольной группах животных гематологические показатели находились в пределах допустимых значений.

Таблица 6 – Гематологические показатели крови кроликов ($M \pm m$), $n=8$

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

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

Результаты исследования показали, что в течение всего периода исследований наблюдали тенденцию в сторону закономерного повышения уровня гемоглобина и эритроцитов, что на 30-й день от начала опыта составило: 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.

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. по сравнению с фоновыми показателями.

Таким образом, наиболее высокий уровень гемоглобина и высокая активизация эритропоэза наблюдалась 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 - $0,59 \times 10^9$ /л; 2 группа - $0,7 \times 10^9$ /л.

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

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

По биохимическим показателям сывороток крови кроликов (таблица 7) 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.

Таблица 7 – Биохимические исследования сывороток крови кроликов (M±m), n=8

Показатель	Срок исследования	Группа		
		I опытная	II опытная	III группа (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: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

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

Количество альбуминов 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.

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

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 I группе - на 3,62 и во II 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.

2.2.6.2 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 ИРТ и ПГ-3 крупного

рогатого скота по принципу аналогов было сформировано 3 группы, по 8 животных в каждой. Животным первой группы вводили инактивированную липосомальную вакцину в дозе $2,0 \text{ см}^3$ внутримышечно, двукратно, с интервалом 14 дней в область шеи. Вторую группу кроликов иммунизировали ассоциированной инактивированной эмульсионной вакциной против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота в аналогичной дозе и кратности введения.

Третья группа кроликов – контрольная (интактная).

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

Количество Т- и В-лимфоцитов определяли методом Е-розеткообразования. Данный метод основан на индикации поверхностных рецепторов, специфичных для различных субпопуляций лимфоцитов, которые путем связывания эритроцитов образуют фигуру розетки. За розетку принимают лимфоцит, присоединивший 3-5 эритроцитов.

Результаты экспериментальных исследований показали, что испытуемые вакцины были безвредны для кроликов и обладали выраженной антигенной активностью (таблица 8).

Таблица 8 – Изучение клеточного иммунитета у вакцинированных кроликов ($M \pm m$), $n=8$

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

Продолжение таблицы 8

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

Нами установлено, что при применении инактивированной липосомальной вакцины отмечалось постепенное нарастание количества Т-лимфоцитов от 33,38 % до 41,5%, т.е. на 8,12 %.

Максимальное количество Т-лимфоцитов было выявлено через 45 дней после введения опытным животным экспериментальной липосомальной вакцины с последующим его снижением к 60-ому дню.

Введение ассоциированной инактивированной эмульсионной вакцины против ИРТ и ПГ-3 способствовало нарастанию количества Т-лимфоцитов к 45-ому дню исследований от 32,13% до 39,75%, т.е. - на 7,62 %.

Согласно результатам исследований в группах, где вводили экспериментальную липосомальную вакцину, наблюдали значительный рост количества Т-лимфоцитов.

Важно отметить, что при использовании ассоциированной вакцины с липосомальными структурами было выявлено увеличение количества В-лимфоцитов в 2 раза через два месяца после первых введений препаратов. При исследовании проб крови на 45-й и 60-й день после введения ассоциированной инактивированной вакцины наблюдали увеличение числа В-лимфоцитов в 1,2 раза соответственно.

Введение экспериментальной вакцины кроликам вызвало усиление Т- и В-клеточного иммунитета в течение первого месяца после первой инъекции с постепенным его снижением к четырем месяцам. Как показывают

исследования, сочетанное применение вакцин с липосомальными структурами в значительно большей степени повышает напряженность клеточного иммунитета.

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.

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

Изучение антигенной активности препаратов основывалось на выявлении специфических антител к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Титры антител после введения вакцины изучали в РТГА и ИФА (таблица 9).

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.

Таблица 9 – Изучение антигенной активности вакцины на кроликах (M±m), n=8

№ п/п	Группа животных	Срок исследования		
		до	45 дней	60 дней
		иммунизации		
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

Титры антигемагглютининов к вирусу парагриппа-3 в группе животных, которым ввели инактивированную липосомальную вакцину (группа № 1), были на 0,88 log₂ выше, чем во второй группе кроликов. Высокие титры антител в этой группе сохранялись и на 60-ый день исследования при отсутствии специфических антител в интактных группах.

При исследовании сывороток крови в ИФА на ИРТ была выявлена незначительная разница титров антител (0,5 -0,78 log₂) у животных во всех опытных группах.

Поствакцинальных реакций общего характера не наблюдали ни в одной из опытных групп. Все кролики были клинически здоровыми.

По результатам серологических исследований максимальный прирост титров антител к обоим антигенам наблюдали к 60-ому дню с начала иммунизации.

Таким образом, применение вакцин с липосомальными структурами в значительной степени повышает напряженность поствакцинального иммунитета. В целом, полученные результаты открывают широкие возможности для дальнейшего теоретического и экспериментального изучения липосомальных форм вакцин в плане их использования для специфической профилактики вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота.

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

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

В опыте использовали 20 телят 30-ти суточного возраста, которых разделили на 2 группы, по 10 телят в каждой. Животных обеих групп прививали вакцинами в дозе 1,0 см³ внутримышечно, двукратно, с интервалом 14 дней. Лабораторный контроль испытуемых вакцин показал, что они стерильны, безвредны и обладают высокой антигенной активностью в отношении лабораторных животных.

Первой группе вводили ассоциированную инактивированную липосомальную вакцину против парагриппа-3(ПГ-3) и инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота, второй группе –

ассоциированную инактивированную эмульсионную вакцину против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота (таблица 10).

На 14 день в обеих группах проводили ревакцинацию. Серологические исследования проб крови экспериментальных животных проводили в реакциях торможения гемагглютинации на ПГ-3 и реакции нейтрализации на ИРТ.

Таблица 10 - Специфические антитела к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота у вакцинированных телят ($M \pm m$), $n=20$

№ п/п	Виды вакцин	Срок исследования				
		до иммуниза ции	14 дней	45 дней	60 дней	180 дней
		титры антител в РТГА на ПГ-3, \log_2				
1	1 группа	4,0	5,0	8,0	10,0	10,0
		4,0	5,0	9,0	10,0	9,0
		3,0	4,0	7,0	9,0	9,0
		4,0	6,0	9,0	10,0	9,0
		3,0	4,0	6,0	8,0	8,0
		3,0	3,0	6,0	8,0	8,0
		4,0	6,0	7,0	9,0	8,0
		3,0	5,0	7,0	9,0	8,0
		3,0	4,0	7,0	8,0	8,0
		4,0	5,0	8,0	10,0	9,0
Средний титр по группе (n=10)		3,5±0,18	4,7±0,32	7,4±0,36*	9,1±0,29***	8,6±0,21***

Продолжение таблицы 10

2	2 группа	3,0	4,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	9,0	8,0
		4,0	5,0	6,0	8,0	8,0
		3,0	4,0	5,0	7,0	6,0
		3,0	4,0	6,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	9,0	7,0
		3,0	4,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	4,0	6,0	7,0	7,0
Средний титр по группе (n=10)		3,6±0,17	4,5±0,18	6,5±0,24	8,0±0,22	7,10±0,19
титры антител в РН на ИРТ, log ₂						
1	1 группа	0	1,0	3,0	5,0	5,0
		1,0	2,0	4,0	5,0	5,0
		1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
		0	2,0	3,0	5,0	5,0
		1,0	3,0	4,0	5,0	5,0
		2,0	3,0	5,0	6,0	5,0
		0	1,0	3,0	5,0	4,0
		1,0	2,0	4,0	5,0	4,0
		2,0	3,0	4,0	6,0	6,0
		1,0	2,0	4,0	5,0	5,0
Средний титр по группе (n=10)		0,9±0,25	2,1±0,25 **	3,7±0,22	5,1±0,19 **	4,80±0,21 ***

Продолжение таблицы 10

2	2 группа (n=10)	1,0	1,0	3,0	4,0	3,0
		0	1,0	3,0	4,0	4,0
		1,0	1,0	3,0	4,0	4,0
		1,0	2,0	3,0	5,0	4,0
		1,0	2,0	4,0	4,0	3,0
		1,0	2,0	5,0	5,0	3,0
		0	1,0	3,0	5,0	4,0
		0	1,0	4,0	5,0	3,0
		1,0	1,0	3,0	4,0	4,0
		2,0	2,0	4,0	5,0	4,0
Средний титр по группе		0,8±0,21	1,4±0,17	3,5±0,24	4,5±0,18	3,60±0,17

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

Изучение антигенной активности вакцин основывалось на выявлении антител к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Взятие крови у животных для серологических исследований проводили до вакцинации, через 14 дней (ревакцинация), а так же через 45, 60, 180 дней после вакцинации.

Антигемагглютинины к вирусу ПГ-3 в сыворотке крови телят определяли в реакции торможения гемагглютинации с использованием диагностического набора ФГУ «Курской биофабрики – фирмы «БИОК».

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

По результатам серологических исследований, представленных в таблице 10, достоверный рост титров антител ко всем вирусным антигенам наблюдался

после введения вакцин и достигал максимального уровня к 60-ому дню с начала иммунизации.

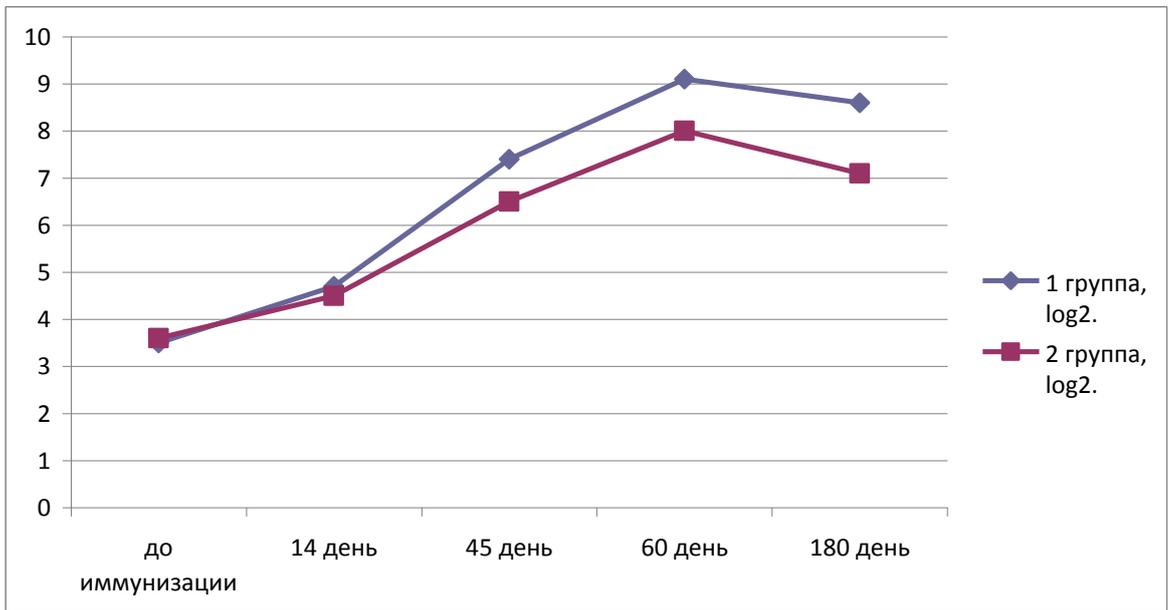


Рисунок 11 – Динамика накопления специфических антител к вирусу парагриппа-3 в РТГА у вакцинированных телят

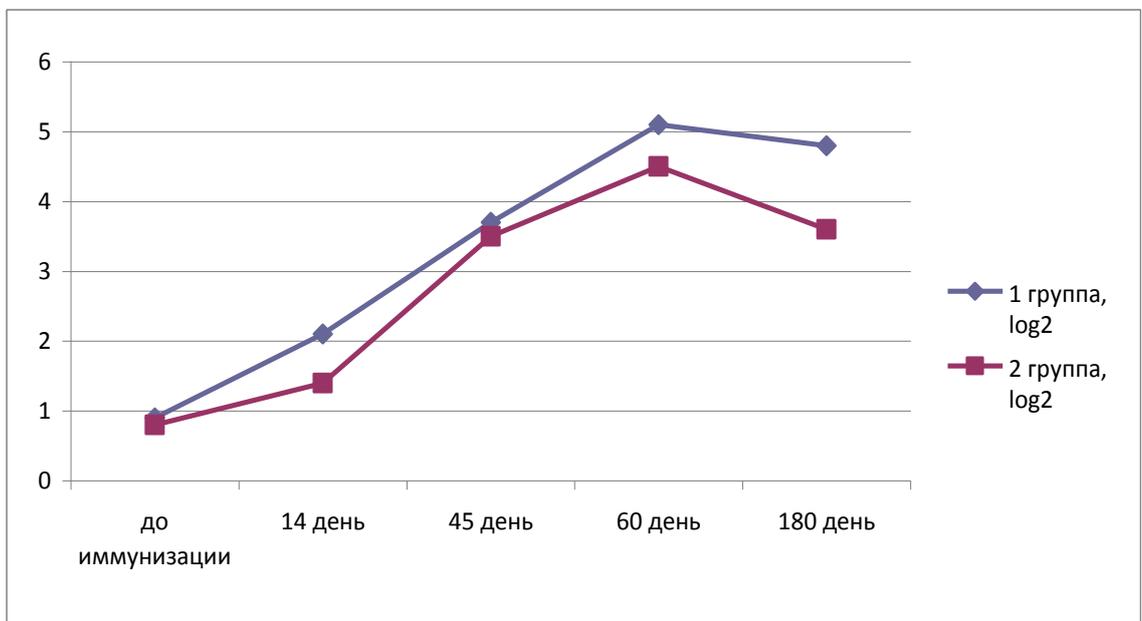


Рисунок 12 - Динамика накопления специфических антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в РН у вакцинированных животных

Результаты серологических исследований показали, что после введения вакцин наблюдается прирост титров антител в сыворотке крови телят к вирусам инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота в обеих опытных группах.

При исследовании сывороток крови опытных телят самые высокие титры антител к вирусу парагриппа-3 ($9,0-10,0 \log_2$) и к герпесвирусу типа I КРС ($4,0-6,0 \log_2$) выявлены через два месяца после вакцинации. К 180-ому дню с начала опыта, они незначительно снижаются.

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

Ассоциированная липосомальная вакцина против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота, введенная двукратно в объеме $1,0 \text{ см}^3$ телятам, способствует достоверному увеличению у них титра антител к вирусу ПГ-3 в реакции торможения гемагглютинации до 180 суток после вакцинации на $1,5 \log_2$ и к вирусу ИРТ в реакции нейтрализации на $1,2 \log_2$ соответственно.

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

Экономический эффект, получаемый в результате проведения профилактических, оздоровительных и лечебных мероприятий ($\mathcal{E}_в$), определяют по формуле:

$$\mathcal{E}_в = \Pi_y + \mathcal{D}_с + \mathcal{E}_з - \mathcal{Z}_в, \text{ где}$$

Π_y – экономический ущерб, предотвращенный в результате проведения ветеринарных мероприятий, руб.;

$\mathcal{D}_с$ – стоимость, полученная дополнительно за счет увеличения прироста живой массы телят и повышения качества продукции, руб.;

$\mathcal{E}_з$ – экономия трудовых и материальных затрат в результате применения более совершенных средств при проведении ветеринарных мероприятий.

$\mathcal{Z}_в$ – затраты на проведение ветеринарных мероприятий, руб.

Экономический эффект при вакцинации инактивированной липосомальной вакциной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, определяли по формуле:

$$\mathcal{E}_в = \Pi_y - \mathcal{Z}_в;$$

Предотвращенный ущерб определяли с учетом коэффициента заболеваемости ($K_з = 0,32$), удельной величины потери продукции ($K_п = 12,85$ кг), цены 1 кг прироста живой массы -200 руб.;

Экономический ущерб, предотвращенный в результате проведения ветеринарных мероприятий (Π_y), находим по формуле:

$$\Pi_y = M_0 \times K_з \times K_п \times Ц - У, \text{ где}$$

M_0 – общее поголовье восприимчивых или наличных животных в хозяйстве;

$K_з$ – коэффициент возможной заболеваемости животных;

$K_{\text{п}}$ – удельная величина потерь основной продукции в расчете на одно заболевшее животное, кг/т;

Ц – средняя цена единицы продукции, руб;

У – фактический экономический ущерб, руб.

$$\text{П}_y = 10 \times 0,32 \times 12,85 \times 200 = 8224 \text{ руб.}$$

Затраты на проведение ветеринарных мероприятий (З_v) рассчитали по формуле:

$$\text{З}_v = \text{М}_3 + \text{О}_t, \text{ где}$$

М_3 – материальные затраты, руб;

О_t – оплата труда, руб.

$$\text{М}_3 = \text{М}_0 \times \text{Ц}, \text{ где}$$

М_0 – число обработанных животных, голов;

Ц – цена одной дозы вакцины, руб.

$$\text{М}_3 \text{ (вакцина инактивированная липосомальная)} = 10 \times 29 \text{ руб.} = 290 \text{ руб.}$$

$$\text{М}_3 \text{ (вакцина ассоциированная эмульсионная)} = 10 \times 30 \text{ руб.} = 300 \text{ руб.}$$

Затраты на оплату труда (О_t) устанавливали исходя из среднемесячной зарплаты ветеринарного врача (18000 руб.) и затрат оперативного рабочего времени на инъекцию препарата одному теленку – 5,0 мин.

Часовая ставка ветеринарного врача составляет:

$$18000 \text{ руб.} : 25,6 \text{ дней} : 8 \text{ часов} = 87,89 \text{ руб./час. или } 1,46 \text{ руб./мин}$$

О_t = количество человеко-часов \times часовая тарифная ставка \times страховые взносы в Пенсионный фонд

$$\text{Количество человеко-часов} = 10 \times 5 : 60 = 0,8 \text{ часов}$$

$$\text{З}_п = 5,0 \text{ мин.} \times 1,46 \text{ руб./мин.} = 7,3 \text{ руб./гол.}$$

$$\text{Часовая тарифная ставка} = 60 : 3,0 \times 6,104 = 122,08 \text{ руб.}$$

$$\text{О}_t = 0,8 \times 87,89 \times 1,30 = 91,41 \text{ руб.}$$

Теперь можем рассчитать затраты на проведение ветеринарных мероприятий:

$$Z_v (\text{вакц.липосомальная}) = 290 + 91,41 = 381,41 \text{ руб.}$$

$$Z_v (\text{вакц. эмульсионная}) = 300 + 91,41 = 391,41 \text{ руб.}$$

Экономический эффект, получаемый в результате проведения профилактических, оздоровительных и лечебных мероприятий (\mathcal{E}_v) определяют по формуле:

$$\mathcal{E}_v (\text{вакц.липосомальная}) = 8224 - 381,41 = 7842,59 \text{ руб.}$$

$$\mathcal{E}_v (\text{вакц.эмульсионная}) = 8224 - 391,41 = 7832,59 \text{ руб.}$$

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат (\mathcal{E}_p) определяется по формуле:

$$\mathcal{E}_p = \mathcal{E}_v : Z_v, \text{ где}$$

\mathcal{E}_v – экономический эффект, руб.;

Z_v – затраты на проведение ветеринарных мероприятий.

\mathcal{E}_p (вакц.липосомальная) = $7842,59 : 381,41 = 20,56$ руб., в том числе в расчете на одно животное – 2,56 руб.

\mathcal{E}_p (вакц.эмульсионная) = $7832,59 : 391,41 = 20,00$ руб., в том числе в расчете на одно животное – 2,00 руб.

3.0 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инфекционные болезни крупного рогатого скота по-прежнему наносят отрасли огромный урон. Потери от падежа поголовья и снижения продуктивности исчисляются большими суммами. На сегодняшний день основной профилактикой инфекционных болезней считается вакцинопрофилактика.

Респираторные заболевания наносят огромный экономический ущерб, в некоторых регионах гибель телят в совокупности с вынужденным убоем достигает 40-50%, а иногда и до 70%.

Известно, что основную роль пускового механизма в возникновении респираторных болезней с ассоциативным течением принадлежит вирусам, прежде всего инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД) и т.д.

Основываясь на собственных экспериментальных исследованиях и литературных источниках, можно сделать заключение, что в системе мер борьбы и профилактики ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота наравне с совершенствованием мер, направленных в улучшение условий содержания и кормления очень большое значение имеет специфическая вакцинопрофилактика поголовья. Важным моментом в разработке средств специфической профилактики, является изготовление вакцин с иммуностимулирующим эффектом. Исходя из этого, целью наших исследований было разработать новые средства специфической профилактики для наиболее распространенных вирусных болезней крупного рогатого скота с использованием иммуностимулирующих компонентов. Для осуществления поставленных целей мы разработали инактивированные липосомальные вакцины, включая их в качестве иммуностимулятора.

Решая поставленную цель, мы приступили к изготовлению липосомальной формы вакцины против ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота. В настоящее время на мировых рынках уже появились липосомальные препараты, и их биологические и физико-химические свойства все еще активно изучаются.

На сегодняшний день известно более десяти методов получения липосомальных структур. В нашей работе отработано несколько методов: метод «инъекции» и метод «выпаривания и обращения фаз». Однако сначала нашей целью было получение фосфолипида – лецитина для изготовления липосом. Для этого мы выбрали желток куриных яиц. Следующим этапом мы обработали методы включения АГ в липосомы и контроль данного процесса. Зная, что важнейшее свойство липосом - это включать и удерживать те вещества, которые содержатся в водном растворе. Заключенные в липосомы вещества, оказываются защищенными от действия факторов внешней среды, до сохранения целостности липосомальных структур.

Работали в стерильных условиях для предотвращения контаминации. Делали контрольные посеы в питательные среды. До настоящего времени фармакодинамика липосом изучена недостаточно. Неизвестно, с какими структурами на поверхности клетки взаимодействуют липосомы. Это в значительной степени тормозит прогресс создания липосомальных препаратов. Нами были разработаны моновалентная липосомальная вакцина против парагриппа-3 и ассоциированная липосомальная вакцина против ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота. Вакцины обладали выраженным иммуностимулирующим эффектом, сочетаемостью антигенов и липосомальных структур обеспечивали высокую иммуногенность и безвредность. Компоненты доступны и экономически приемлемы.

Полученные образцы вакцин были испытаны на безвредность, стерильность, антигенную и иммуногенную активность. Вакцины были

безвредны, не вызывали клинических состояний и патологоанатомических изменений в органах и тканях вакцинированных белых лабораторных мышей.

Вакцины обладали выраженной антигенной активностью, индуцировали образование специфических антител. Титры антител стабильно увеличивались до 180 - дней исследований. Установлено, что липосомальная вакцина не вызывала у опытных животных поствакцинальных реакций местного или общего характера даже при введении ее в 15-ти кратной иммунизирующей дозе. При сравнении с ГОА вакциной, где отмечена поствакцинальная реакция в месте введения вакцины (отечность, припухлость мышечной ткани), при введении липосомальной вакцины местные реакции были минимальными и наблюдались в течение 4-5 суток после инъекции (легкое побледнение тканей на месте введения вакцины, 0,4 мм в диаметре, отсутствие воспаления). Результаты эксперимента показали, что вакцина с липосомальными структурами безвредна.

Антигенную активность вакцины мы изучали на белых лабораторных мышцах, кроликах и на телятах. Безвредность вакцины определяли на мышцах, иммуногенную активность изучили на кроликах. В результате установлено, что вакцина обладала выраженными антигенными и иммуногенными свойствами.

4.0 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АГ - антиген
- АТ - антитело
- ВД - БС - вирусная диарея - болезнь слизистых
- ВИЭВ - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко
- ВНИИВВиМ - Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии
- ВНИИЗЖ - Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных
- ВНИТИБП - Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
- ВНИЯИ - Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт
- ГОА - гидрат окиси алюминия
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИРТ - инфекционный ринотрахеит
- ИФА - иммуноферментный анализ
- КГ - перевиваемая клеточная культура гонад козы
- ЛЭК - культура перевиваемых клеток легкого эмбриона коровы
- МПА - мясопептонный агар
- МПБ - мясопептонный бульон
- МППБ - мясопептонный печеночный бульон
- ПГ-3 - парагрипп-3
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РВН - реакция вируснейтрализации
- РДП - реакция диффузной преципитации

- РИФ - реакция иммунофлуоресценции
- РН - реакция нейтрализации
- РНГА - реакция непрямой гемагглютинации
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- РС - респираторно-синцитиальный
- РТГА - реакция торможения гемагглютинации
- РФ - Российская Федерация
- РЭС - ретикуло-эндотелиальная система
- УЗ - ультразвук
- ФВК - фосфовольфрамовая кислота
- ФЦТРБ- - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
- ЦНИИ - центральный научно-исследовательский институт
- ЦПД - цитопатогенное действие
- МДВК - перевиваемая клеточная культура почки теленка
- TLC - The Liposome Company
- TR - культура перевиваемых клеток трахеи эмбриона коровы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, С.С. Лечение и профилактика бронхопневмонии молодняка (рекомендации) / С.С. Абрамов. – Минск.: Ураджай, 1983. – 20 с.
2. Аликаев, В.А. Болезни дыхательной системы / В.А. Аликаев, И.Г. Шарабрин, Л.Г. Замарин [и др.] // Внутренние незаразные болезни с.-х. животных. – М., 1986. – С. 441-447.
3. Алимов, А.М. Практикум по биохимии с основами физколлоидной химии: учебное пособие / А.М. Алимов, Н.З. Хазипов, Т.Р. Якупов, Г.П. Логинов // Препаративное выделение лецитина из яичного желтка. – Казань. – 2012. – С. 170-171.
4. Атамась, В.А. Изучение гуморальных поствакцинальных антител у крупного рогатого скота, иммунизированного живой и инактивированной вакцинами против инфекционного ринотрахеита/ В.А. Атамась, И.Г. Лаврова// Инф. и инвазион. болезни с.-х. животных. – Одесса, 1982. – С. 21-25.
5. Атамась, В.А. Респираторные болезни с.-х. животных/ В.А. Атамась, Е.В. Андреев, Н.П.Чечеткина и [и др.]// Библ. Вет. врача. – Киев, 1986. – 184 с.
6. Бажутин, Н.Б. Перспективы применения липосомальных препаратов в медицинской практике [Электронный ресурс] / Н.Б. Бажутин, В.В. Золин, А.А. Колокольцов, С.Н. Таронский// Новости медицины и фармации. – 2007. – 2 (206). – Режим доступа:
<http://www.mif-ua.com/archive/article/3441>
7. Барсуков, А.И. Липосомы /А.И. Барсуков// Соросовский образовательный журнал.- 1998.- №10.- С. 2-9.

8. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных/ Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др.; под ред. А.А. Сидорчука. – М: КолосС, 2007. – 671 с.
9. Бобрович, В.Р. Клинико-эпизоотологическая характеристика заболеваний телят с поражением органов дыхания/ В.Р. Бобрович // Ветеринарная наука – производству. Межвед. тематический сб. – Минск, 1982. – С. 71-73.
10. Борисов, А.В. Специфическая профилактика вирусных болезней птицы / А.В. Борисов // Птицеводство. - 2008.- № 1. - С. 15
11. Варпаховская, И. Липосомальные формы лекарственных средств // Ремедиум.- 1999. - № 5. - С. 68—70.
12. Васильев, А.В. Обнаружение антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом РДП / А.В. Васильев // Проблемы молекулярной биологии и патологии с.-х. животных: Сб. науч. тр. МВА. – М., 1980.– Т. 113. – С. 71-75.
13. Гаффаров, Х.З. Инфекционные болезни рогатого скота хламидийной, микоплазменной и вирусной этиологии: разработка диагностических и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / Гаффаров Харрис Заринович. – Казань, 1986. – 39 с.
14. Глотов, А.Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярного зондирования с использованием гибридной тест-системы / А.Г. Глотов // Методология по профилактике и ликвидации болезней с.-х. животных. – Новосибирск, 1995. – С. 168-171.
15. Глотов, А.Г. Инфекционный ринотрахеит у быков производителей / А.Г. Глотов, А.В. Нефедченко // Аграрная Россия. - 2001.- № 3. - С. 30 - 33.

16. Готов, А.Г. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота/ А.Г. Готов, О.Г. Петрова, Т.И. Глотова и [др.]// Ветеринария. – 2002. - №3.- С. 17-21.
17. Гончарова, Л.В. Технологические основы изготовления эритроцитарного антительного диагностикума для индикации вируса герпеса-1 крупного рогатого скота / Л.В. Гончарова, П.П. Фукс, В.М. Апатенко, Ю.С. Голуб // IV межгос. конф. по научн. и прикладным пробл. паразитологии 21-23 окт. 1993: Тез. докл. – Киев и др., 1993. – 35 с.
18. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник/Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова. - 3-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Издательство «Лань», 2010.-480 с.: ил. С. 184-186.
19. Грибко, С.М. Иммуностимуляторы в профилактике и терапии респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01 и 16.00.03/ Грибко Станислав Михайлович. – Воронеж., 1998. – 28 с.
20. Гумеров, В.Г. Диагностика и специфическая профилактика респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота: дис. ... д-ра вет. наук: 06.02.02 / Гумеров Вали Галиевич. – Казань., 2016. – 278 с.
21. Гусева, Н.П. Снижение токсического действия липополисахарида чумного микроба, модифицированного липосомой/ Н.П. Гусева, Г.В. Ермакова, А.В. Наумов, А.Л. Кравцов// Материалы Российской научной конференции «Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций».- Волгоград, -1992. - с.92.
22. Даниельс, Р. Галенические формы современных средств по уходу за кожей/Р. Даниельс// Сырье и упаковка. - 2003. - № 4.- С. 21-22.

23. Данилов, С.Ю. Респираторные заболевания телят в промышленном животноводстве/ С.Ю. Данилов// Ветеринария. - 2011.-№3.-С.12.
24. Ефанова, Л.И. Диагностика и профилактика наиболее распространенных инфекционных болезней телят и поросят: учебное пособие / Л.И. Ефанова – Воронеж: ВГАУ, 1991. – 128 с.
25. Ефременко, В.И. Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине): монография / В.И. Ефременко - Ставрополь, 1999. - 236 с.
26. Ефременко, В. И. Иммобилизация в липосомы веществ различной химической природы. Стерилизация и стабилизация липосом/ В. И. Ефременко, Т. В.Таран, Л. М. Кузякова. – Ставрополь, 2000.- 46 с.
27. Ефременко, В.И. Открытия ученых дорого стоят/ В.И. Ефременко // Фармацевтический вестник. - 2003. - № 27. - С. 22.
28. Жаров, А.В. Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных / А.В. Жаров, В.П. Шишков, М.С. Жаков [и др.]; под. ред. В.П. Шишкова, А.В. Жарова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 1999. – 568 с.
29. Закстельская, Л.Я. Коронавирусы человека и животных / Л.Я. Закстельская, А.В. Шеболдов. – М.: Медицина, 1977. – 216 с.
30. Закутский, Н.И. Схема иммунизации крупного рогатого скота инактивированной вакциной против ИРТ КРС / Н.И. Закутский, В.И. Жестеров, И.Ф. Вишныков, А.А. Шевченко, Л.Д. Конакова // Пробл. инфекц. патологии с.х. животных, Владимир, 1997. – С. 85.
31. Закутский, Н.И. Опыт профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом (ИРТ) и парагриппом-3 (ПГ-3) крупного рогатого скота /Н.И. Закутский, В.И. Жестеров, Л.Д. Конакова и др. // Диагн., профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотич. и зооантропоноз. болезнями ж-х. – Сб. статей Междунар. науч.-практ.

- конф., Покров, 2000. – С. 60-62.
32. Закутский, Н.И. Герпесвирусные инфекции крупного рогатого скота / Н.И. Закутский, В.И. Жестеров, И.Ю. Хухоров, А.Г. Кушнир, Н.А. Лагуткин. – Владимир - Покров: Фолиант, - 2003. - С. -37-85.
33. Иванов, И.И. Липосомы и их взаимодействие с клетками и тканями /И.И. Иванов, Р.А. Гуськова и [др.] // Материалы Всесоюзного симпозиума. – Москва.- 1981. – С. 123-129.
34. Иванов, В.С. Изучение условий хранения вируса ИРТ, репродуцированного в монослое перевиваемых клеток ПТ-80 на микроносителях /В.С. Иванов, О.В. Майджи // Тр. ВИЭВ Всерос. НИИ эксперим. ветеринарии. - Москва, 2003. - Т. 73. – С. 173-175.
35. Иванов, А.В. Этиопатогенез респираторно-генитальных инфекций крупного рогатого скота, проблемы и перспективы их диагностики, профилактики и борьбы с ними / А.В. Иванов, Х.З. Гаффаров // Ветеринарный врач. - 2008. - № 4. - С. 2-7.
36. Игнатъев, А. М. Использование метода иммунофлюоресценции при диагностике ИРТ КРС / А.М. Игнатъев // Сб. науч. трудов: Важнейшие исследования по изучению заболеваний с.-х. животных, М.- 1973. - № 70. - С. 118-119.
37. Исаенко, Е.Ю. Адъюванты в современной вакцинологии /Е.Ю. Исаенко, Бабич Е.М., Елисеева И.В. [и др.] // Annals of Mechnikov Institute. - 2013. - № 4. - С. 5-15.
38. Каледин, В. И. Противоопухолевая эффективность свободного и заключенного в липосомы плаксанта у мышей линии А/Не с метастазами опухолей ГА-1 в печени/ В. И. Каледин, Н. А.Попова, А. И.Стеценко// Эксперим. онкология.- 1993.- №5.- С. 75-77.
39. Каплун, А.П. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ/А.П. Каплун, Шон Ле Банг, Ю.М.

- Краснопольский, В.И. Швец // Вопросы медицинской химии.- 1999.- Т.45. - №1.
40. Кобринский, Г.Д. Липосомы - транспортеры лекарств/ Г.Д. Кобринский.- М.: Знание, 1989.- 49 с.
41. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И.П. Кондрахин. – М.: Колос, 2004. – 520 с.
42. Коромыслов, Г.Ф. Инфекционные аборт крупного рогатого скота / Г.Ф. Коромыслов // Итоги науки и техники. Животноводство и ветеринария. – Москва, 1980. – Т.13. – С. 163-167.
43. Коромыслов, Г.Ф. Иммуностимуляция: средства, методы, перспектива /Г.Ф. Коромыслов, П.Е. Игнатов // Сельскохозяйственная биология. - 1983.-№ 7. – С.99-107.
44. Костыркин, Ю. А. Эффективность инактивированной вакцины при факторных респираторных болезнях телят / Ю. А. Костыркин, В.А. Мищенко, В.В. Думова, В.В. Лисицын, Т.Б. Никешина, О.В. Кухаркина, А.В. Кононов // Ветеринарная патология. – 2005. -№3.- С 72-75.
45. Костыркин, Ю.А. Меры профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом- инфекционным пустулезным вульвовагинитом КРС в условиях молочного скотоводства / Ю.А. Костыркин, В.А. Мищенко, И.В.Нестеренко [и др.] // Труды ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир – 2007, - С.171-183.
46. Красочко, П.А. Моно- и ассоциированные вирусные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия): автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03/ Красочко Петр Альбинович. - Минск, 1997. - 32с.
47. Крюков, Н.Н. Инфекционный ринотрахеит - пустулезный вульвовагинит крупного рогатого скота / Н.Н. Крюков// Итоги науки и техники, ВИНТИ – М. - 1980. – Т. 13. – С. 32-113.

48. Кузнецов, Д.П. Иммуногенные свойства гликопротеинов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / Д.П. Кузнецов, А.Я. Самуйленко, В.И. Белоусов // Вестн. РАСХН – 2002 - №5– С. 69-71.
49. Кузнецов, Д.П. Исследование уровня антител против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом ИФА / Д.П. Кузнецов, А.Я. Самуйленко, С.В. Кузнецова [и др.]// Современные пробл. иммунологии, биотехнологии, биотехнологии, генной и клеточной инженерии в вет. медицине: тез. докл. Всесоюз. науч.-техн. конф. – М., 1990. – С. 75-76.
50. Кузнецов, Д.П. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: диагностика на основе современных методов биотехнологии: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.02 / Кузнецов Дмитрий Павлович. - Щелково, 2002. – 49 с.
51. Кузякова Л.М. Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом / Л.М. Кузякова, В.И. Ефременко.// Фармация на современном этапе - проблемы и достижения: Сб. науч. трудов / НИИФ. - 2000. - Т. 39. - С. 70-77.
52. Кузякова, Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами / Л.М. Кузякова // Вестник Московского Университета. – 2005. – Т. 46. - № 1.- С. 74-79.
53. Ладыгина, Г.А. Использование липосом для направленной доставки лекарственных веществ к органам и тканям / Г.А. Ладыгина, А.И. Тенцова, О.С. Зимина // Фармация.-1978. - № 27. - С.52-57
54. 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.

55. 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.
56. 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.
57. 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» 22-24 марта 2016, Издательство «Научная книга» г. Саратов, 2016, С.103-106.
58. 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.
59. Марголис, Л.Б. Липосомы и их взаимодействие с клетками / Л.Б. Марголис, Л.Д. Бергельсон. - Москва: Наука,1986. – 240 с.
60. Мигунов, А.И. Использование липосом для конструирования

- вакцин/ А.И. Мигунов, О.К. Кузнецов, О.И. Киселев // Вопросы вирусологии. - 2001. - № 2.- С.4-7.
61. Мищенко, В.А. Особенности респираторных инфекций телят/ В.А.Мищенко, А.А.Гусев, Н.А. Яременко [и др.]// Ветеринария.-2000.- №9.-С.5.
62. Мищенко, В.А. Особенности вакцинопрофилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, В.В. Лисицын, Ю.А. Костыркин, Ю.Е. Костыркин, Ю.Е. Ручнов, О.И. Гетманский // Матер. медународ. науч. конф., посвящен. 45-летию «ВНИИНЗЖ» (30-31 октября 2003г.) «Актуальные проблемы инфнекционной патологии животных», Влаимир, 2003. – 82-84.
63. Мищенко, В.А. Смешанное течение респираторных инфекций у молодняка КРС / В.А. Мищенко, А.М. Рахманов // Акт. проблемы патологии сельскохозяйственных животных. – Минск – 2003, - 186-188.
64. Мищенко, В.А. Анализ заболеваемости молодняка крупного рогатого скота молочных пород респираторными инфекциями/В.А. Мищенко., В.В. Думова [и др.] //Ветеринария Кубани.-2008.- №6.- С.2.
65. Мищенко, В.А. Особенности заболеваний КРС мясных пород / В.А. Мищенко, В.В. Думова, А.В. Мищекно [и др.] // Ветеринария Кубани – 2011. - №2. –С. 6-7.
66. Мищенко, В.А. Проблема вирусных инфекций у диких жвачных животных / В.А. Мищенко, В.В. Думова, А.В. Мищенко. [и др.] // Ветеринария и кормление – 2011. - №5. – С. 8-9.
67. Мищенко, В.А. Проблема респираторных болезней новорожденных телят/ В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, О.Ю. Черных // Ветеринария Кубани - 2013. - №6 – С.19-20.
68. Непоклонова, И.В. Выявление антигена вируса ИРТ и антител к нему методом ИФА: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 /

- Непоклонова Ирина Владимировна. - М., 1985. – 19 с
69. Нестеров, А.А. Определение вируснейтрализующих антител против вируса инфекционного ринотрахеита в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации микрометодов / А.А. Нестеров, В.А. Мищенко, В.В. Думова [и др.] // Материалы международной науч.-практ. конференции «Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности РФ». Покров – 2011. - С. 115-120.
70. Никитин, И.Н. Организация и экономика ветеринарного дела: учебник / И.Н. Никитин. - 6-е изд., перераб. и доп. - СПб.: Лань, 2014. - 368 с.
71. Оксинайд, О.Э. Косметологические транспортные системы / О.Э. Оксинайд, С.Н. Копыт, Е.И. Маевский // Сырье и упаковка. - 2003. - № 4. - С. 26—27.
72. Орешкова, С.Ф. Выявление вируса ИРТ гибридизацией с нерадиоактивными ДНК-зондами / С.Ф. Орешкова, А.Г. Глотов, В.И. Семенихин и др. // Вопросы вирусологии. – 1995. - № 6. - С. 278-282.
73. Осто Марк Дж. Липосомы / Марк Дж. Осто // В мире науки. -1987. - №3. - С. 71-77.
74. Панкова, Г.Е. Респираторные болезни крупного рогатого скота / Г.Е. Панкова – М., 1986. – 44 с.
75. Саатов, Т.С. Аутологичные липосомы / Т.С. Саатов., Э.И. Исаев, С.А. Бурханов // Вестн. акад. мед. наук СССР. -1990. - № 8. - С. 47—50.
76. Сайдуллин, Т.С. Статистическая обработка результатов серологических исследований / Т.С. Сайдуллин // Ветеринария. - 1981. - № 7. - С. 62-64.
77. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных: В 2т.

- /Самуйленко А.Я., Соловьева Б.В., Непоклонова Е.А., Воронина Е.С. – М.: Академкнига, 2006. – 1911 с.
78. Сергеев, В.А. Репродукция и выращивание вирусов животных / В.А. Сергеев. - М.: Колос, 1976. - 303 с.
79. Симецкий, О.А. Влияние современной терапии больных маститом сухостойных коров на сохранение их продуктивности после отела / О.А. Симецкий // Вопр. вет. фармации и фармакотерапии: тез. докл. Всесоюз.науч.-практ. конф. – Рига, 1982. – С. 38-39.
80. Смирнов, С.И. Пути профилактики важнейших незаразных болезней молодняка / С.И. Смирнов // Меры борьбы с болезнями с.-х. животных: сб. науч. тр. ХЗВИ. – Харьков, 1980. – Т. 26. – С. 3-6.
81. Сухинин, А. А. Липосомальные вакцины в промышленном птицеводстве : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.03 / Сухинин Александр Александрович. – СПб., 2004. – 288 с.
82. Сюрин, В.Н. Закономерности и особенности противовирусного иммунитета / В.Н. Сюрин, А.В. Васильева, В.Н. Карелин // Пробл. вет. иммунологии – М., 1985. – С. 28-31.
83. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
84. Сюрин, В.Н. Ветеринарная вирусология/ В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина.-2-е изд.,перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1991. – С.362-365.
85. Топурия, Г.М. Основные принципы иммунокоррекции в ветеринарной медицине /Г.М.Топурия, Л.Ю.Топурия //Ветеринария Кубани.-2010.-№4.-С.20.
86. Тулева, Н.П. Терапия коров с третьей стадией генерализованного воспалительного процесса инфекционного генеза/ Н.П. Тулева, Ю.В.

- Тулеев // Ветеринария.-2010.-№11.-С.3.
87. Умнов, А. В. Разработка и совершенствование биотехнологических процессов в производстве липосомальных косметических препаратов лечебно-профилактического назначения: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.23 / Умнов Александр Вениаминович. – Ставрополь., 2002.- 19 с.
88. Учайкин, В.Ф. Липосомальные вакцины / В.Ф. Учайкин, О.В. Шамшева // Руководство по клинической вакцинологии. ГЭОТАР – Медицина, 2006 – С. 55-56.
89. Чазов, Е.И. Липосомы как средства направленного транспорта лекарств / Е.И. Чазов, В.Н. Смирнов, В.П. Торчилин// Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И.Менделеева, - 1987, - Т. 32. - № 5. – С. 502 – 513
90. Чубатова, С.А. Возможности оригинальной технологии микрокапсулирования биологически активных веществ/ С.А. Чубатова, В.С. Тульский, С.К. Панюшин и [др.] //International Jornal on Immunorehabilitation. - 1999. - №12. - с.12.
91. Штрауб, О.Х. Инфекции крупного рогатого скота, вызываемые вирусами герпеса: монография / О.Х. Штрауб. - пер. с нем. под ред. и с предисл. Д.Ф. Осидзе. – М.: Колос, 1981. – 207 с.
92. Юров, К.П. Профилактика инфекционных болезней телят / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк // Материалы науч.-практ. конференции «Болезни с.-х. животных вирусной и др. этиологии и меры борьбы с ними» – Новосибирск, - 2001. – С. 9.
93. Юров, К.П. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в различных регионах России / К.П.Юров, А.Ф. Шуляк, О.Г.Петрова, О.В. Майджи// Тр.ВИЭВ.-Т.73.-2003. - С.22.

94. Юсупов, Р.Х. Совершенствование средств иммунодиагностики герпетической инфекции / Р.Х. Юсупов, Г.Х. Ильясова, Ш.М. Насыров, Д.Н. Латфуллин, Г.Ф. Ильясова; А.П. Цибульский // Научн. конф. с международным участием. С.-Петербург. 2004. - С.216-217.
95. Abinanti, F.R. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from cattle affected with conjunctivitis-observations on the experimental infection / F.R. Abinanti, G.J. Plummer G.J. // Amer. J. Vet. Res. – 1961. – Vol. 22. – P. 13-17.
96. Ackermann, M. Pro and contra IBR-eradication / M. Ackermann, M. Engels //Veterinary Microbiology. – 2006. - Vol. 113. – P. 293-302.
97. Aguilar, J.C. Vaccine adjuvants revisited/ J.C. Aguilar. E.G. Rodriguez// Vaccine.-2007.- №25. – P. 3752-3762.
98. Allison, A.C. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects/ A.C. Allison. N.E. Byars // Mol. Immunol. - 1991. - № 28 – P. 279-284.
99. Amorij, Jean-Pierre. Towards tailored vaccine delivery: Needs, challenges and perspectives [Text]/Jean-Pierre Amorij, Gideon F.A. Kersten, Vinay Saluja [et al.] //Journal of controlled Release. – 2012. – Vol.161, №2. –P.363-376.
100. Bachhawat, B.K. Biresch Chandra Guha Memorial Lecture 1984. Liposome technology //Proc. Indian Nat. Sci. Acad. - 1985. - V.51, N 4. - P.639-648.
101. Bamford, A.I. Primary cytotoxic response of bovine peripheral blood leukocytes to parainfluenza type 3 virus infection / A.I. Bamford, B.M. Adair, J.C. Foster // Vet. Immunol. – 1995. – Vol. 45, №12. – P. 85-95.
102. Bangham, A.D. Negative Staining of Phospholipids and their Structured Modification by Surface Agents as Observed in the Electron Microscope/

- A.D. Bangham, R.W. Horne // *J. Mol. Biol.* – 1964. - № 8. - P. 660-668.
103. Bangham, A.D. Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids / A.D. Bangham, M.M., Standish, J.C. Watkins // *Ibid.* 1965. - Vol.13. - P.238-252.
104. Berclaz, T. Phase equilibria in binary mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and cardiolipin / T. Berclaz, H.M. McConnell // *Biochemistry.* 1981. - Vol. 20. - P. 6635-6640.
105. Berlin, B.S. Chemical and biological properties of Arlacel A / B.S. Berlin // *Ann. Allg.* - 1963. – Vol. 21. – P. 82-90.
106. Bryson, D.G. Infectious bovine respiratory disease-emerging issues and progress towards control// *Proc. 19 World Buiatrics Congr.* – Edinburgh, 1996.V.1.P.1-8.
107. Campos, F.S. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil / F.S. Campos, A.C. Franco, S.O. Hubner, M.T. Oliveira, A.D. Silva, P.A. Esteves, P.M. Roehe, F.A.M. Rijsewijk // *Veterinary Microbiology.* - 2009. - Vol. 139. - N 1/2. - P. 67-73.
108. Castrucci, G. Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: Assessment of the protective value of eight vaccines / G. Castrucci, F. Frigeri, D. Salvatori, M. Ferrari, Q. Sardonini, E. Cassai, E. Dico Lo. A. Rotola, R. Angelini // *Compar. Immunol., Microbiol. and Infect. Diseases.* - 2002. - 25. - P. 1.29.
109. Cullis, G.A. Infectious bursal disease (Gumboro disease) / G.A. Cullis // *Corp. Rep. Techn. Items present. Intern. Commit. Regional Commis.* — 1994. p. 19-29.
110. Choquet, C.G. Formation of unilamellar liposomes from total polar lipid extracts of methanogens / C.G. Choquet, G.B. Patel, T.J. // *Appl. and Environ. Microbiol.*- 1992. - V. 58. - № 9.- P.2894-2900.
111. Dapergolas, G. Penetration of target areas in the rat by liposome —

- associated bleomycin, glucose oxidase and insulin/ G. Dapergolas, E.D. Neerunjun, G. Gregoriadis // FEBS Lett. - 1976. - V.63. - P. 235-239.
112. Durham, P.J.K. Exacerbation of experimental parvoviral enteritis in calves by coccidia and weaning stress / P.J.K. Durham, R.H. Johnson, R.J. Parker // J. Res. Vet. Sci. - 1985. - V.39. - № 1. - P. 16-23.
113. Erickson, J.S. Synthesis of proteins in cell infected with herpesvirus / J.S. Erickson, A.S.Kaplan // IX. Sulfated proteins, Virology. – 1973. – 55. – P. 94-102.
114. French, E.L. Relationships between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and isolated from calves with encephalitis / E.L. French // Austral. Vet. J. – 1962. – Vol.6. - № 38. – P. 477-478.
115. Frenker, N. Herpes simpix virus: studies of the genome size and redundancy by renaturation kinetics / N. Frenker, B. Roizman // J. Virol. – 1971. – Vol.8 – P. 591-593.
116. Frerichs, G.N. Safety and efficacy of live and inactivated IBR vaccines / G.N. Frerichs, S.B. Woods, M.M. Lucas, V.V. Sands // Virology. - 1982. - Vol. 111.- № 6. - P. 116-122.
117. Gregoriadis, G. Engineering Liposomes for drug delivery progress and problems. Trends. Biotechnol, 1995, 13:12, 527-37.
118. Gregoriadis, G. Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered parenterally and intragastrically into rats / G. Gregoriadis, G. Dapergolas // Lancet. - 1976. - V. 2. - P. 824 - 827.
119. Gregoriadis, G. Liposom Technology/ G. Gregoriadis.-New York,1986.- Vol.1.- P. 268.
120. Greig, A.S. Continuous cultivation and suscepility to bovine viruses of cell line – derived from bovine embryonic tissues / A.S. Greig // Canad. J. Microbiol. – 1958. – Vol.4. – P. 487-492.
121. Heckert, H.P. Current viral infections of the respiratory tract in cattle

- from the clinical point of view / H.P. Heckert, W. Hofmann, G. Appel, P. Steinhagen // *Dtsch. tierarztl. Wschr.* – 1990. – Bd. 97, №10. – P. 414-418.
122. Iinuma, H. Characteristics of cytotoxic T lymphocytes directed to influenza virus haemagglutinin elicited by immunization with muramyldipeptide-innuenza liposome vaccine / H. Iinuma, K. Nerome, Y. Yoshioka // *Scand. J. Immunol.* - 1995.- Vol. 41. - P. 1-10.
123. Janiak, M.J. Interactions of cholesterol esters with Phospholipids: Cholesteryl, myristate and dimyristoyl lecithin / M.J. Janiak, D.M. Small, G.G. Shipley // *J. Lipid Res.* 1979. - Vol. 20. - pp. 183-199.
124. Johnston, D.S. Phospholipid Polymers - synthesis and spectral characteristics / D.S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman // *Biochim. et biophys. acta.* -1980.-V. 602.-P.57-69.
125. Juliano, B.L. The effect of particle size and change on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs / B.L. Juliano, D. Stamp // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1975. - V. 63. - P. 651- 658.
126. Kato, K. Liposome - entrapped human interferon-b. Inst pharmacokinetics and antitumor activity against human Brain tumor cells / K. Kato, J. Yoshida // *J. Clin. Biochem. and Nutr.* 1988. - V.4. - № 2. - P. 139 - 147.
127. Keling, C.L. Infections bovine rhinotracheitis (IBR) abortion observation on incidence in vaccinated and no vaccinated and exposed cattle / C.L. Keling, I.A. Schipper, G.E. Stum // *Cornell. Vet.* – 1973. – Vol. 63. - №3. – P. 383-389.
128. Lichtenberg, D. Structural characteristics of phospholipids multilamellar liposomes / D. Lichtenberg, T. Markello // *J. Pharm. Sci.* - 1984. - V.73, N 1. - P. 122-125.
129. Love, W.G. High performance liquid chromatographic analysis of liposome stability / W.G. Love, N. Amos, B.D. Williams, I.W. Rellaway // *J.*

- Microencapsul. -1990.-V.7. - № 1.-P.105-112.
130. Ludwig, H. Infectious bovine rhinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis: BHV-1 infection / H. Ludwig, J. P. Gregersen // Rev. Sci. et Techn. Off. Int. Epizoot.- 1986. - Vol.5. - № 4. - P. 869 - 878.
 131. Manosroi, A. The entrapment of a human insulin-DEAE dextran complex in different compound liposomes / A. Manosroi, K.H., Bauer // Drug Dev. and Ind. Pharm.- 1989. - V.15, № 14-16. - P.2531-2546.
 132. Manosroi, A. Thermodynamic characteristics of human insulin deae-dextran complex entrapped in liposomes / A. Manosroi, A. Blume et al. // Drug. Dev. and Ind. Pharm. - 1990. - V. 16. - № 5. - P. 837-854.
 133. Marshall, R.L. Characterisation of Envelope Proteins of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, Bovine Herpesvirus I by Biochemical and Immunological Methods / R.L. Marshall, L.L. Rodrigues, G.J. Letchworth // J. Virol. - 1986. - 57. - P. 745-753.
 134. McKecher, D.G. Comparative studies of the etiological agents of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis / D.G. McKecher, O.C. Straub, J.K. Saito, E.M. Wada // Canad. J. Comp. Med. – 1959. – Vol.23. – P.320-328.
 135. Medunitsyn, N.V. Basics of immunization and immunotherapy of infection diseases/ N.V. Medunitsyn. V.I. Pokrovsky. – M:GEOTAR – Media, 2005.- P. – 512.
 136. Meshkova, R.Y. Guide to Immunization for doctors [Electronic resours]/ R.Y. Meshkova. - Access mode:
[http:// www.antibiotic.ru/boocs/immun/imm16.shtml](http://www.antibiotic.ru/boocs/immun/imm16.shtml)
 137. Meyer, H.W. Periodically curved bilayer structures observed in hyphal cells or stable L-form cells of a Streptomyces strain and in liposomes formed by the extracted lipids / H.W. Meyer, W. Richter, J. Gumpert // Biochem. et Biophys.acta Biomembranes. - 1990. - V. 1026, № 2. - P. 171-178.

138. Nordilung, I. R. Transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in large and small unilamellar vesicles/ I. R. Nordilung, C. F. Schmidt, S. N.Dicken// *Biochemistry*.- 1981.-Vol. 20.- P. 3237-3241.
139. Perino, L.J. A review of bovine respiratory disease vaccine field efficacy / L.J. Perino, B.D. Hunsaker // *Bovine Practitioner* - 1997. - Vol. 31 - P. 59 - 66.].[Sibbel, et. al. // – *Veter. Med. (Edwardsville)*. – 1988. - V. 83. - № 1. - P. 90-93.
140. Pick, V. Liposomes with a large trapping capability prepared by freezing/V. Pick// *Arch, Biochem. and Biophys.*- 1981.-Vol. 212.- P. 186-194.
141. Pontarollo, R.A. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors /R.A. Pontarollo, L.A. Babiuk, R. Hecker, Van Drunen Little-van den S. Hurk // *J.Gen. Virol.* - 2002. - 83. - 12. - P. 2973.
142. Raschke, T. Colloidal Tragersysteme fur die dermal Application, *Kosmetische Medizin*. - 2004. - №1. - P. 34.
143. Roizman, B. Identification of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lackinf a known type 1 counterpart / B. Roizman, B. Norrild, C. Chan, L. Pereira // *Virology*. –1984. – 133. – P. 242-247.
144. Scherlie, R. Delivery of antigens used for vaccination: resent advances and challenges [Text] /Regina Scherlie // *Terapeutic Delivery*. – 2012.-Vol.2, №10.-P.1351-1368.
145. Sebastian, K. Grimm Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism [Electronic resource] Sebastian K .Grimm, Margaret E. Ackerman // *Current Opinion in Biotechnology*. – Access mode :
[http:// dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.015)
146. Trapp, S. Conventional and marked BHV-1 vaccines in Germany: a brief review / S. Trapp, P. Konig, M. Beer // *Berl Munch Tierarztl*

- Wochenschr. – 2003. –116 (5-6). – P. - 208-15.
147. Van, Drunen Littel-van den Hurk, Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle / S. van Drunen Littel-van den Hurk, R. P. Braun, P. J. Lewis [et al.] //Journal of General Virology. – 1998. - № 79. P. - 831–839.
148. Vogel, F.R. Adjuvants in perspective / F.R. Vogel // Dev. Biol. Stand. – 1998. – Vol.92. - P. 241-248.

СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА

Рисунки:

1. Схема основных этапов исследования инактивированной липосомальной вакцины (с. 36)
2. Структура положительно реагирующих проб сывороток крови крупного рогатого скота в отношении герпесвирусной типа I инфекции и парагриппа-3 крупного рогатого скота (с. 45)
3. Мониторинг сезонности проявления респираторных инфекций в исследуемом хозяйстве (с. 46)
4. Схема получения липосомальных структур (с. 50)
5. Схема изготовления липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота (с. 51)
6. Ультразвуковая ванна УМ-4 фирмы "Unitra" (емкость ванны 4 дм³, частота 25 кГц) (с. 53)
7. Роторный испаритель RVO-64, Чехословакия (с. 53)
8. Липосомальная структура (с. 55)
9. Многослойность липосомальных структур (с. 55)
10. Изучение антигенной активности липосомальной вакцины на белых мышцах (с.60)
11. Динамика накопления специфических антител к вирусу парагриппа-3 в РТГА у вакцинированных телят (с. 74)
12. Динамика накопления специфических антител к вирусу ИРТ крупного рогатого скота в РН у вакцинированных животных (с. 74)

Таблицы:

1. Перечень проведенных исследований (с. 37 – 38)
2. Поголовье крупного рогатого скота (с. 43)
3. Напряженность иммунитета у телят при применении коммерческой вакцины (с. 47)
4. Изучение соотношения антигена с липосомальными структурами (с. 57)
5. Результаты серологических исследований на белых мышах (с. 59)
6. Гематологические показатели крови кроликов (с. 62)
7. Биохимические исследования сывороток крови кроликов (с. 64)
8. Изучение клеточного иммунитета у вакцинированных кроликов (с.66-67)
9. Изучение антигенной активности вакцины на кроликах (с. 69)
10. Специфические антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота у вакцинированных телят (с. 71-73)

ПРИЛОЖЕНИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Главного
управления ветеринарии
Кабинета Министров
Республики Татарстан

 А.Г. Хисамутдинов



«СОГЛАСОВАНО»

Врио ректора ФГБОУ ВО
Казанская государственная
академия ветеринарной
медицины
профессор  Р.Х. Равилов



ВРЕМЕННЫЕ ПРАВИЛА

по применению вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной липосомальной

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование: Вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированная липосомальная.

Международное непатентованное наименование: Вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированная липосомальная.

2. Лекарственная форма: суспензия для инъекции. Вакцина изготовлена из инактивированных 0,2%-ным раствором формалина концентрированных антигенов вирусов парагриппа-3 штамм «ПТК-45/86», инфекционного ринотрахеита «ТК-А (ВИЭВ)-В2» с добавлением в качестве адьюванта липосом.

По внешнему виду вакцина представляет собой суспензию сероватого цвета с коричневым осадком, легко разбивающимся при взбалтывании.

Вакцина расфасована по 10,0 или 50,0 см³ (10-50 доз) в стеклянные флаконы, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

3. Флаконы с вакциной упакованы в картонные коробки, обеспечивающие их целостность. В каждую пробирку вложена инструкция по ее применению.

Срок годности вакцины 12 месяцев с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортировки. По истечении срока годности вакцина к применению не пригодна.

4. Вакцину хранят и транспортируют в сухом темном месте при температуре от 2 до 8 °С.

5. Вакцину следует хранить в местах, не доступных для детей.

6. Вакцину во флаконах без этикеток, с истекшим сроком годности, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным цветом и/или консистенции содержимого, с наличием посторонних примесей, а также остатки вакцины, не использованные в течении 6 часов после вскрытия флаконов, бракуют, обеззараживают путем кипячения в течение 30 минут или обработки 2% раствором щелочи или 5% раствором хлорамина (1:1) в течение 30 минут с дальнейшей утилизацией.

Утилизация обеззараженной вакцины не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

II БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у крупного рогатого скота к парагриппу-3 и инфекционному ринотрахеиту через 14 дней после двукратной иммунизации продолжительностью 12 месяцев.

В 1,0 см³ вакцины содержится не менее 6,0 lg ТЦД₅₀ производственных штаммов «ПТК-45/86» вируса парагриппа-3 и «ТК-А (ВИЭВ) – В2» вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Вакцина предназначена для профилактики парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в угрожаемых и в стационарно неблагополучных хозяйствах.

9. Запрещено вакцинировать клинически больных и/или ослабленных животных.

10. Вакцинации подлежит крупный рогатый скот с 3-5 дневного возраста и старше.

Вакцину вводят внутримышечно в среднюю треть шеи двукратно с интервалом 14 дней, в дозах: телятам в возрасте от 3 дней до 6 месяцев – 1,0 см³; молодняку в возрасте старше 6 месяцев и взрослым животным – 2,0 см³.

Ревакцинацию телят проводят через 6 месяцев однократно в дозе 2,0 см³.

Стельных коров и нетелей вакцинируют за 1,5-2 месяца до отела.

В стационарно неблагополучных по инфекционному ринотрахеиту хозяйствах коров и телок случного возраста вакцинируют однократно за 1,5-2 месяца до осеменения.

Вакцину вводят с соблюдением правил асептики и антисептики, для введения используют стерильные материалы и инструменты. Место инъекции обрабатывают 70% спиртом.

11. Симптомов проявления парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота или других патологических признаков при передозировке вакцины не установлено.

12. Особенности поствакцинальной реакции при первичном и последующих введениях вакцины не установлено.

13. Следует избегать нарушения схемы проведения вакцинации, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. В случае пропуска очередного введения вакцины необходимо провести иммунизацию как можно скорее.

14. При применении вакцины в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается.

У отдельных животных через сутки после вакцинации возможно незначительное повышение температуры и формирование припухлости в месте инъекции, исчезающей через 5-10 суток.

15. Запрещается применение вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота совместно с другими иммунобиологическими препаратами, а также ангельминтиками и инсектоакарицидами в течение 14 суток до и после очередной иммунизации.

16. Молоко и продукты убоя от вакцинированных животных в любые сроки иммунизации реализуются без ограничения.

IV МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

17. При работе с вакциной следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

18. Все лица, участвующие в проведении вакцинации должны быть одеты в спецодежду (резиновые сапоги, халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены очками закрытого типа. В местах работы должна быть аптечка доврачебной помощи.

19. В случае попадания вакцины на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется немедленно промыть большим количеством водопроводной воды с мылом. В случае разлива вакцины, зараженный участок пола или почвы заливают 5% раствором хлорамина.

20. Организация – производитель: кафедра микробиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

Временные правила разработаны сотрудниками ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ и ФГБУ ФЦТРБ: профессором Галиуллиным А.К., ведущим научным сотрудником Гумеровым В.Г., аспиранткой кафедры микробиологии Магдеевой Э.А. Предназначена для практического руководства ветеринарным специалистам, работникам сельскохозяйственного производства, всех форм собственности.

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник ГБУ
«Чистопольское РГВО»3.З. Шарипов
«22» июня 2016 г.

АКТ

производственного испытания «Вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированная липосомальная»

Комиссия в составе главного ветеринарного врача ООО «Кутлушкино» Фасхетдинова Ф.; ведущего научного сотрудника лаборатории вирусологии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.в.н., Гумерова В.Г.; зав.кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, д.в.н., профессора, Галиуллина А.К. и аспиранта кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ Магдеевой Э.А., составили настоящий акт об оценке профилактической эффективности вакцины против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированная липосомальная в ООО «Кутлушкино» Чистопольского района РТ.

Задачей испытаний являлось подтверждение безопасности, иммуногенности и эффективности липосомальной вакцины в производственных условиях.

Испытания проводили на 20-ти телятах, месячного возраста, по следующей схеме:

- 1 группа, в количестве 10 голов, прививали вакциной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной липосомальной;

- 2 группа, в количестве 10 голов, вакцинировали ассоциированной вакциной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной.

Вакцины вводили в объеме 1,0 см³ внутримышечно, 2-хкратно с интервалом 14 дней.

В процессе опыта наблюдали за физиологическим состоянием телят, кровь для исследований брали на 14, 30 и 60 день после вакцинации. Напряженность поствакцинального иммунитета определяли в реакции торможения гемагглютинации (ПГ-3) и в реакции нейтрализации (ИРТ).

Продолжение приложения В

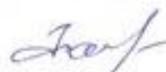
№ п/п	Виды вакцин	Срок исследования				
		до иммунизации	14 дней	45 дней	60 дней	180 дней
1	1 группа (n=10)	титры антител в РТГА на ПГ-3, log ₂				
		4,0	5,0	8,0	10,0	10,0
		4,0	5,0	9,0	10,0	9,0
		3,0	4,0	7,0	9,0	9,0
		4,0	6,0	9,0	10,0	9,0
		3,0	4,0	6,0	8,0	8,0
		3,0	3,0	6,0	8,0	8,0
		4,0	6,0	7,0	9,0	8,0
		3,0	5,0	7,0	9,0	8,0
		4,0	5,0	8,0	10,0	9,0
Средний титр по группе		3,5±0,18	4,7±0,32	7,4±0,36*	9,1±0,29***	8,6±0,21***
2	2 группа (n=10)	3,0	4,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	9,0	8,0
		4,0	5,0	6,0	8,0	8,0
		3,0	4,0	5,0	7,0	6,0
		3,0	4,0	6,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	5,0	7,0	9,0	7,0
		3,0	4,0	7,0	8,0	7,0
		4,0	4,0	6,0	7,0	7,0
Средний титр по группе		3,6±0,17	4,5±0,18	6,5±0,24	8,0±0,22	7,10±0,19
1	1 группа (n=10)	титры антител в РИ на ИРТ, log ₂				
		0	1,0	3,0	5,0	5,0
		1,0	2,0	4,0	5,0	5,0
		1,0	2,0	3,0	4,0	4,0
		0	2,0	3,0	5,0	5,0
		1,0	3,0	4,0	5,0	5,0
		2,0	3,0	5,0	6,0	5,0
		0	1,0	3,0	5,0	4,0
		1,0	2,0	4,0	5,0	4,0
		2,0	3,0	4,0	6,0	6,0
1,0	2,0	4,0	5,0	5,0		
Средний титр по группе		0,9±0,25	2,1±0,25**	3,7±0,22	5,1±0,19**	4,80±0,21***
2	2 группа (n=10)	1,0	1,0	3,0	4,0	3,0
		0	1,0	3,0	4,0	4,0
		1,0	1,0	3,0	4,0	4,0
		1,0	2,0	3,0	5,0	4,0
		1,0	2,0	4,0	4,0	3,0
		1,0	2,0	5,0	5,0	3,0
		0	1,0	3,0	5,0	4,0
		0	1,0	4,0	5,0	3,0
		1,0	1,0	3,0	4,0	4,0
		2,0	2,0	4,0	5,0	4,0
Средний титр по группе		0,8±0,21	1,4±0,17	3,5±0,24	4,5±0,18	3,60±0,17

Продолжение приложения В

Результаты серологических исследований показали, что антитела к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, у телят в опытных группах были на достаточно высоком уровне. При этом в 1 группе после применения липосомальной вакцины напряженность иммунитета выше чем во 2 группе, где применяли ассоциированную вакцину против ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота инактивированную эмульсионную.

Таким образом, вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота инактивированная липосомальная обладает высокой иммуногенной и антигенной активностью, и может быть рекомендован для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота.

Главный ветеринарный врач
ООО «Кутлушкино»



Ф. Фасхетдинов

Ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «ФЦТРС-ВНИВИ», к.в.н.



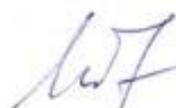
В.Г. Гумеров

Профессор ФГБОУ ВО
Казанская ГАВМ, д.в.н.



А.К. Галиуллин

Аспирант кафедры микробиологии
ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ



Э.А. Магдеева

СПРАВКА

Выдана для предоставления в Диссертационный Совет Д-220.034.01 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Э.Н. Баумана» о том, что материалы, изложенные в кандидатской диссертации Магдеевой Эльвиры Адиповны на тему: «Биологические свойства инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа - 3 крупного рогатого скота» используются в учебном процессе (при чтении лекции и проведении лабораторно-практических занятий) и научно – исследовательской работе кафедры микробиологии Казанской ГАВМ.

Проректор по учебной и
воспитательной работе
ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, д.вет.н.,
профессор



А.Х. Волков

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Омский ГАУ
Доктор наук



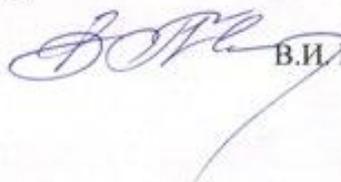
Алещенко В.В.

2016 г.

КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Материалы, изложенные в информационном письме о работе Магдеевой Эльвиры Адиповны на тему: «Биологические свойства инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа - 3 крупного рогатого скота» рассмотрены на заседании кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО Омский ГАУ (протокол № 3 от 19.10.2016 г.) и приняты к использованию в учебном процессе и НИР в нашем ВУЗе.

Доктор ветеринарных наук, профессор,
заведующая кафедрой ветеринарной
микробиологии, инфекционных и
инвазионных болезней


В.И. Плешакова

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор-проректор
по учебной работе
ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ,
д-р техн. наук, профессор



М.Н.Фархшатов

» _____ 2016 г.

КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Данные информационного письма о работе Магдеевой Эльвиры Адиповны на тему: «Биологические свойства инактивированной липосомальной вакцины против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота» рассмотрены на заседании кафедры инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ (протокол № 2 от 27 сентября 2016 г.) и приняты к использованию в учебном процессе в ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет».

Заведующая кафедрой инфекционных
болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы,
д-р биол. наук, профессор

А.В. Андреева А.В. Андреева



Подпись *Магдеева Е.В.*
ЗАВЕРЯЕТ
Заведующий филиалом
Магдеева Е.В.
20 ____ г.
ИНН 0278011005