

УДК 619:578.821.4/.579.843.95:636.92

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-1-9-17>

Згиrowsкая А.А., кандидат биологических наук
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ткалич Е.С., научный сотрудник
Дадашко С.В., младший научный сотрудник
Герасименко В.И., ведущий технолог

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ МИКСОМАТОЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРОЛИКОВ

Резюме

В процессе работы был выделен эпизоотический штамм вируса миксомы кроликов, проведена его адаптация к перевиваемым культурам клеток. При оценке возможности использования эпизоотического штамма миксомы кроликов для изготовления вакцины установлено, что выделенный штамм обладает низкой иммуногенностью.

*Для изготовления вакцины для профилактики пастереллеза, бордетеллиоза и миксоматоза кроликов использовали вирус миксомы кроликов (штамм КМИЭВ-V141), бактерии *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-B166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-B212), отработаны параметры культивирования штаммов миксомы кроликов, пастерелл и бордетелл, подобраны инактиванты и адъюванты и отработаны методы инактивации пастерелл и бордетелл кроликов. Изготовлен образец вакцины для профилактики пастереллеза, бордетеллиоза и миксоматоза кроликов.*

Ключевые слова: вакцина, вирус, бактерии, кролики, профилактика.

Summary

In the course of the work, an epizootic strain of the rabbit myxoma virus was isolated, and its adaptation to continuous cell cultures was carried out. When assessing the possibility of using an epizootic strain of myxoma of rabbits for the manufacture of a vaccine, it was found that the isolated strain has low immunogenicity.

*For the manufacture of a vaccine for the prevention of pasteurellosis, bordetellosis and myxomatosis in rabbits, the rabbit myxoma virus (strain KMIEV-V141), bacteria *Pasteurella multocida* (strain KMIEV-B166), and *Bordetella bronchiseptica* (strain KMIEV-B212) were used; parameters of cultivation of strains of myxoma of rabbits, pasteurella and bordetella were worked out, inactivants and adjuvants were selected, methods of inactivation of pasteurella and bordetella of rabbits were worked out. A vaccine sample for the prevention of pasteurellosis, bordetellosis and myxomatosis in rabbits has been prepared.*

Keywords: vaccine, virus, bacteria, rabbits, prevention.

Поступила в редакцию 13.04.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные заболевания наносят значительный экономический ущерб отрасли кролиководства. Миксоматоз – одно из самых опасных вирусных заболеваний для кроликов, при котором погибает до 90 % инфицированных животных [1, 4, 6]. Вирус чрезвычайно устойчив во внешней среде, заболевание у животных практически не лечится. Миксоматоз может

протекать как в виде моноинфекции, так и в ассоциации с другими вирусными и бактериальными инфекциями. При этом из бактериальных патогенов чаще всего выделяют возбудителей пастереллеза. Как известно, вакцинация кроликов является надежным способом профилактики инфекционных заболеваний [2, 3, 5]. В настоящее время в мировой ветеринарной практике отсутствуют коммерческие ассоции-

рованные поливалентные вакцины для профилактики вирусно-бактериальных инфекций у кроликов. В связи с этим создание ассоциированной вакцины для профилактики миксоматоза и пастереллеза является актуальным направлением биотехнологической отрасли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение эпизоотического штамма миксомы кроликов проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур и развиваемых линиях клеток почки зеленой мартышки CV-1 и Vero. В качестве исходного биологического материала для выделения штамма миксомы у больного кролика из неблагополучного фермерского хозяйства были отобраны узелки, образовавшиеся в области головы, спины, ануса, наружных половых органов.

Из узелков готовили 20%-ную суспензию из предварительно измельченной ткани с использованием среды Игла ДМЕМ с антибиотиком. Стабилизацию тканевой суспензии проводили в течение 2 ч при температуре плюс 2–8 °С, после чего тканевую суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин. Надосадок отбирали и использовали для заражения клеток, осадок утилизировали. Надосадочную жидкость исследовали в полимеразной цепной реакции на наличие антигена вируса миксомы кроликов.

Для получения первично-трипсинизированных фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) использовали 10–11-суточные развивающиеся эмбрионы кур. Трипсинизацию эмбрионов проводили по стандартной методике. Выход клеток от одного куриного эмбриона составлял 70–100 млн. Далее производили рассев клеток в матрасы вместимостью 50 и 250 см³ из расчета 800 тыс. клеток в 1 мл ростовой среды. В качестве ростовой среды использовали среды 199 и Игла, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина, взятые в равных соотношениях с обогащением сывороткой крови эмбрионов крупного рогатого скота. Инкубирование клеток проводили в термостате при темпе-

ратуре плюс 37 °С. Монослой, пригодный для заражения, образовывался через 36–48 ч.

Культуру клеток почки зеленой мартышки CV-1 и Vero культивировали в пластиковых культуральных матрасах вместимостью 50 и 250 см³ с использованием ростовой среды ДМЕМ-Н (Hepes – 12,5 ммоль) с добавлением 100 ЕД/см³ бензилпенициллина, 100 мкг/см³ стрептомицина сульфата, 10 % эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота. Выращивание культуры проводили в термостате при температуре плюс 37 °С, культивирование – при температуре плюс 33 °С в течение 72–96 ч до появления выраженного цитопатогенного действия вируса.

В работе использовали штамм *Pasteurella multocida* (КМИЭВ-В166) тип А рода *Pasteurella* семейства *Pasteurellaceae* и *Bordetella bronchiseptica* (КМИЭВ-В212) рода *Bordetella* семейства *Alcaligenaceae*, выделенные от больного кролика. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Штаммы бактерий выращивали в сердечно-мозговом бульоне или бульоне Хоттингера с содержанием 200 мг азота с добавлением 5 % сыворотки крови крупного рогатого скота и 0,5 % дрожжевого экстракта (рН 7,4–7,6).

В 50 см³ среды вносили 10 % расплодки бактерий от объема. Штамм культивировали на шуттель-аппарате Termo scientific при постоянном перемешивании при 150 об/мин и температуре плюс 37 °С. Через 6 ч процесс останавливали, отбирали пробы, в которых подсчитывали количество микробных клеток (по МакФарланду). Осаждали микробные клетки путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 15 мин, к осадку добавляли необходимое количество физиологического раствора.

При подборе оптимальной дозы заражения культуру клеток CV-1 заражали в дозах 0,1; 0,3; 0,5 ТЦД₅₀ на клетку. По истечении 72–96 ч матрасы с зараженными

клетками замораживали. Для более полного выхода вируса из клеток процедуру замораживания-оттаивания повторяли дважды. Полученный таким образом вирусосодержащий материал титровали в выбранной культуре клеток на 96-луночных планшетах.

Адсорбцию вируса на клетках CV-1 и Vero проводили в течение следующих интервалов времени: 30 мин; 1 ч; 1,5 ч; 2 ч; 2,5 ч; 3 ч, после чего добавляли поддерживающую среду и инкубировали зараженную культуру при температуре 33 °С до полного развития цитопатогенного действия вируса. Вирусосодержащий материал замораживали при минус 40–70 °С, затем размораживали, отбирали пробы для определения инфекционной активности.

Титрование вируса на культуре клеток CV-1 проводили микрометодом на 96-луночном планшете. Для этого в лунки планшета вносили по 150 мкл клеточной суспензии в концентрации 300 тыс. клеток в мл. Готовили разведения вируса с 10^{-1} до 10^{-8} . Вносили по 50 мкл разведений вируса в лунки. На каждое разведение брали по 4 лунки. Планшет инкубировали при плюс 33 °С с 5 % CO₂ в течение 5–7 суток. Учитывали лунки, в которых монослой был поврежден на 50 % и более. Титр вируса высчитывали по методу Рида и Менча или Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

В качестве инактиванта использовали формальдегид. Инактивацию бактерий проводили при температуре плюс 37 °С в течение 48 ч, формалин использовали в концентрации 0,3 %. Непосредственно перед изготовлением образца вакцины бактериальные клетки освобождали от остаточных количеств формалина путем центрифугирования при 1200 g в течение 10 мин с последующим декантированием надосадочной жидкости и добавлением к осадку забуференного физиологического раствора (ЗФР). Процедуру отмывания от формалина осуществляли не менее 3 раз, после чего проверяли стерильность препарата. Для определения стерильности бактериальной части вакцины ее высевали на СМА, среду

Сабуро, СМБ, среду Китт-Тароцци. В испытании использовали не менее двух пробирок с каждой питательной средой.

Для изучения оптимального соотношения компонентов вакцины – вирусной части и бактериальной – было сформировано 2 группы кроликов по 3 головы в каждой. Первой группе животных препарат вводили внутримышечно при соотношении компонентов 1:1, второй группе – лабораторный образец в соотношении 2 части вирусного компонента и 1 часть бактериального. У кроликов отбирали кровь для получения сыворотки до введения препарата, через 14 суток после введения лабораторного образца. Сыворотку крови проверяли в РА и ИФА для выявления антител к пастереллам, бордетеллам и вирусу миксомы кроликов.

Для создания длительного иммунитета у кроликов нами был использован адъювант нового поколения фирмы Serpic, Франция, – Montanide GEL 01 PR, разработанный фирмой-изготовителем специально для кроликов. Параллельно для сравнения нами был использован адъювант, наименее реактогенный для данного вида животных, – Montanide ISA 15.

Сконструированный образец вакцины проверяли на стерильность, безвредность, иммуногенность.

Стерильность лабораторного образца проверяли согласно ГФ РБ II, т. 1, п. 2.6.1 методом прямой инокуляции вакцины в тиогликолевую среду и среду Сабуро.

Безвредность лабораторного образца вакцины проверяли на белых мышках и кроликах. Мышам препарат вводили подкожно в объеме 1,0 см³. За животными наблюдали в течение 10 дней. Дополнительно проверяли безвредность препарата на кроликах, вводили препарат внутримышечно в объеме 1,0 см³.

С целью изучения иммуногенной активности полученной вакцины и влияния бактериального (№ 1) и вирусного (№ 2) компонентов на иммуногенные свойства друг друга при сочетанном введении осуществляли иммунизацию кроликов массой 2,4±0,2 кг. По принципу ана-

логов сформировали 4 группы кроликов: 1-я группа – иммунизация компонентом № 1; 2-я группа – иммунизация компонентом № 2; 3-я группа – иммунизация комплексным образцом вакцины (№ 1+№ 2); 4-я группа – контроль (без иммунизации). Перед процедурой иммунизации и в дальнейшем через 14 и 21 сутки после иммунизации у кроликов отбирали кровь и осуществляли постановку ИФА и РА с сывороткой крови. Постановку РА осуществляли общепринятым методом.

Для отработки дозы введения вакцины для специфической профилактики пастереллеза и миксоматоза кроликов было изготовлено 3 образца вакцины, содержащих различные дозы компонентов:

1 образец – титр вируса миксомы кролика $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и $1,0 \times 10^9$ микробных клеток в мл пастерелл;

2 образец – титр вируса миксомы кролика $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и $1,0 \times 10^8$ микробных клеток в мл пастерелл;

3 образец – титр вируса миксомы кролика $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и $1,0 \times 10^{10}$ микробных клеток в мл пастерелл.

Было сформировано 3 группы кроликов по 3 особи. Животным вводили образцы вакцины однократно в объеме 1,0 мл внутримышечно в область бедра. При отработке

кратности введения вакцины образец вакцины вводили трем кроликам внутримышечно дважды с интервалом 14 суток.

За животными наблюдали в течение 21 суток после иммунизации. У всех кроликов перед вакцинацией, через 14 и 21 сутки после вакцинации была отобрана кровь для проверки сыворотки в ИФА на наличие антител к миксому кроликов и в реакции агглютинации (РА) для проверки наличия антител к *Pasteurella multocida*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для создания средств специфической профилактики пастереллеза и миксоматоза кроликов нами было проведено выделение эпизоотического штамма миксомы кроликов на первично трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур и перевиваемых линиях клеток почки зеленой мартышки CV-1 и Vero. Предварительно в ПЦР провели проверку биологического материала, отобранного от больного кролика, на наличие генома вируса миксомы. Было проведено 7 последовательных пассажей биологического материала от больного кролика на перечисленных культурах клеток. Результаты титрования вирусосодержащей жидкости представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Титрование изолята вируса миксомы кроликов в культуре клеток ФЭК, CV-1 и Vero

Пассаж	Титр вируса в культурах клеток, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		
	ФЭК	CV-1	Vero
2	2,0	1,25	0,5
5	2,0	1,75	0,75
7	2,0	1,5	0,75

Как видно из таблицы 1, титр вируса составляет от $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в культуре клеток Vero до $2,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в ФЭК. Для создания вакцины необходимо, чтобы вирус накапливался в высоких титрах. Учитывая полученные результаты, было решено для создания вакцины использовать вакцинный штамм вируса миксомы кроликов «КМИЭВ-V141», депонированный в институте.

Согласно литературным данным, для максимального накопления вируса миксомы кроликов в культуре клеток большое значение имеет время адсорбции вируса на клеточном монослое, доза заражения клеток [5]. Результаты отработки оптимальной дозы заражения культуры клеток вирусом миксомы кроликов, оптимальное время адсорбции вируса представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. – Зависимость титра вируса миксомы кролика от времени его адсорбции на клетках CV-1 и Vero

Время адсорбции вируса, мин	Титр вируса, lg ТЦД _{50/см} ³	
	культура клеток CV-1	культура клеток Vero
30	1,25	0,75
60	5,5	5,0
90	5,8	5,3
120	5,2	5,3
180	5,25	4,25
240	3,5	1,75

Как видно из таблицы 2, наиболее оптимальное время адсорбции вируса в культуре клеток CV-1 – 60 и 90 мин, титр вируса при этом составлял 5,5–5,8 lg ТЦД_{50/см}³, а в культуре клеток Vero – 90 и 120 мин, титр достигал величины 5,3 lg ТЦД_{50/см}³.

Следующий этап заключался в определении заражающей дозы вируса, при которой наблюдается максимальное его накопление в клетках почки зеленой мартышки CV-1 и Vero.

Таблица 3. – Изучение влияния заражающей дозы вируса на его накопление в клетках CV-1 и Vero

Доза вируса, ТЦД _{50/клетка}	Титр вируса, lg ТЦД _{50/см} ³	
	культура клеток CV-1	культура клеток Vero
0,1	1,25	0,75
0,2	1,5	1,0
0,3	4,8	3,3
0,4	5,3	5,5
0,5	6,1	6,0

Как видно из таблицы 3, наиболее оптимальной дозой заражения является 0,4–0,5 ТЦД_{50/клетка}. При таких дозах заражения вирус накапливается в максимальных титрах от 5,3 до 6,1 lg ТЦД_{50/см}³.

Установлено, что при длительном пассировании вируса миксомы кроликов на перевиваемых клетках (10–12 пассажей) титр начинает падать. Чтобы предотвратить снижение биологической активности вируса, мы использовали перемежающие пассажи вируса на первичных фибробластах эмбрионов кур (2 последовательных

пассажа). После этого титр вируса на культурах клеток CV-1 и Vero значительно возрастал и достигал величины 6,0–6,5 lg ТЦД_{50/см}³. Однако следует заметить, что накопление вируса в культуре клеток Vero происходило слабее по сравнению с культурой клеток CV-1. Инфекционная активность вируса миксомы кроликов составляла 5,8–6,0 lg ТЦД_{50/см}³ при культивировании его в культуре клеток Vero.

В таблице 4 представлены результаты инактивации бактериальной части вакцины формалином.

Таблица 4. – Подбор оптимальной концентрации формалина для инактивации бактериальных штаммов *P. multocida*

Компоненты вакцины	Концентрация формалина, %			
	0,1	0,2	0,3	0,4
<i>P. multocida</i> (концентрация микробных тел – 10×10 ⁹ /мл)	-	-	+	+

Полную инактивацию бактерий (утрата жизнеспособных свойств) отмечали с минимальной концентрацией формалина – 0,3 %, которую в дальнейшем использовали в качестве рабочей.

Серодиагностика миксоматоза не разработана. Для изучения уровня антител в сыворотке крови подопытных кроликов нами разработан метод непрямого ИФА,

где в качестве антигена для сенсibilизации планшета использовали инактивированный 0,1%-ным фенолом вирус миксомы с концентрацией белка 1,0 мкг/лунка.

В дальнейшем необходимо было определить оптимальное соотношение компонентов вакцины – бактериальной части и вирусной. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Изучение оптимального соотношения бактериального и вирусного компонентов вакцины для профилактики пастереллеза и миксоматоза кроликов

Группа кроликов	Показатели оптической плотности			Результаты реакции агглютинации, log ₂		
	до введения препарата	14-е сутки	21-е сутки	до введения препарата	14-е сутки	21-е сутки
Группа № 1 (соотношение вирусной и бактериальной части 1:1)	0,08±0,01	0,635±0,21	0,721±0,21	4,5±2,1	6,0±0,4	6,5±0,4
Группа № 2 (соотношение вирусной и бактериальной части 2:1)	0,13±0,02	0,624±0,21	0,689±0,21	4,5±2,1	6,0±0,4	6,5±0,4

Как видно из таблицы 5, наиболее оптимальным соотношением вирусной и бактериальной частей вакцины является соотношение 1:1, так как увеличение объема вводимой животным вирусной части не приводило к увеличению напряженности иммунного ответа у кроликов. Так, на 21-е сутки после вакцинации значение оптической плотности (ОП) при исследовании в ИФА сыворотки крови кроликов 1-й группы составляло 0,721±0,21, а 2-й – 0,689±0,21, а титр антител к *P. multocida* в реакции агглютинации составил 6,5±0,4.

Для отработки дозы введения вакцины для профилактики пастереллеза и миксоматоза кроликов было изготовлено 3

образца вакцины, содержащих различные дозы компонентов:

1-й образец – титр вируса миксомы кролика 4,5 lg ТЦД₅₀/мл и 1,0×10⁹ микробных клеток в мл пастерелл и бордетелл;

2-й образец – титр вируса миксомы кролика 3,5 lg ТЦД₅₀/мл и 1,0×10⁸ микробных клеток в мл пастерелл и бордетелл;

3-й образец – титр вируса миксомы кролика 5,5 lg ТЦД₅₀/мл и 1,0×10¹⁰ микробных клеток в мл пастерелл и бордетелл.

В таблицах 6, 7 представлены результаты проверки уровня антител после вакцинации кроликов образцами вакцины с разными дозами вируса и бактерий.

Таблица 6. – Уровень антител в сыворотках крови кроликов, вакцинированных образцами с разными дозами вируса и бактерий

Образец вакцины	Показатели оптической плотности		
	фон (до введения образца)	14-е сутки	21-е сутки
№ 1	0,142±0,02	1,17±0,07	1,15±0,07
№ 2	0,148±0,02	0,645±0,04	0,698±0,06
№ 3	0,145±0,02	1,07±0,07	1,0±0,07

Как видно из таблицы 6, наиболее оптимальной дозой вируса является вирус с титром $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, при этом показа-

тель оптической плотности на 14-е сутки составил 1,17, а на 21-е – 1,15.

Таблица 7. – Титр антител в сыворотке крови кроликов к бактериальным антигенам *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212)

Образец вакцины	<i>Pasteurella multocida</i> (штамм КМИЭВ-В166), титр, \log_2			<i>Bordetella bronchiseptica</i> (штамм КМИЭВ-В212), титр, \log		
	фон	14-е сутки	21-е сутки	фон	14-е сутки	21-е сутки
№ 1	1,6±0,4	5,0±0	6,0±0	1,4 ±0,3	5,2±0,3	5,5±0,3
№ 2	1,6±0,4	4,1±0,3	4,3±0,3	1,6 ±0,3	4,8±0,3	4,8±0,3
№ 3	1,8 ±0,3	5,0±0,3	5,2±0,3	1,6 ±0,3	5,0±0,3	5,0±0,3

Как видно из таблицы 7, наиболее оптимальной концентрацией бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212) является $1,0 \times 10^9$ микробных клеток в мл.

В процессе проведения исследований установлено, что однократная иммунизация кроликов вакциной, содержащей вирус миксомы кроликов с титром $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212) в концентрации $1,0 \times 10^9$ микробных клеток в мл, приводит к формированию напряженного иммунного ответа у животных.

Разработанная вакцина «Респимикс» – это двухкомпонентный биопрепарат, состоящий из сухого компонента – лиофилизированного вируса миксомы кроликов (штамм КМИЭВ-В141) и жидкого компонента – инактивированных формальдегидом и эмульгированных в масляном адьюванте штаммов бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212), который служит растворителем для сухого компонента.

Сухой компонент представляет со-

бой однородную сухую пористую массу в виде таблетки желтовато-белого цвета без посторонних примесей.

Жидкий компонент представляет собой жидкость (гомогенную эмульсию) от бело-серого до серого цвета без посторонних примесей, при хранении которой допускается образование на поверхности прозрачного маслянистого слоя и выпадение осадка от бело-серого до серого цвета, которые при встряхивании вакцины разбиваются в равномерную эмульсию.

Одна иммунизирующая доза вакцины ($1,0 \text{ см}^3$) содержит:

- антиген вируса миксомы кроликов (КМИЭВ-В141) с титром не менее $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{доза}$;
- антиген бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) – не менее 1×10^9 микробных тел;
- антиген бактерий *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212) – не менее 1×10^9 микробных тел;
- инактивант – формальдегид;
- масляный адьювант.

Результаты иммуногенной активности вакцины для профилактики пастереллеза, бордетеллеза и миксоматоза кроликов представлены в таблицах 8, 9.

Таблица 8. – Определение в сыворотке крови кроликов уровня антител к вирусу миксомы в ИФА ($M \pm m$)

Группа животных	До введения образца (фон)	Показатели оптической плотности при 450 нм		
		14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки
Контроль без иммунизации	0,148±0,02	0,153±0,02	0,159±0,02	0,145±0,02
Контроль иммунизации, вирус миксомы (разбавитель – физиологический раствор)	0,173±0,02	0,624±0,04	0,647±0,06	0,620±0,05
Вакцина «Респимикс»	0,187±0,04	1,19±0,07*	0,855±0,07*	0,870±0,08*

Примечание – *достоверное различие по сравнению с контролем иммунизации

Значение ОП отрицательного контроля набора составило 0,136±0,02, значение ОП положительного контроля набора – 0,620±0,03.

Как видно из данных, приведенных в таблице 8, значение С/П (показатель зна-

чения опытного образца к положительному контролю) на всех сроках наблюдения составило >50 %.

Уровень антител к бактериальным антигенам вакцины определяли в сыворотке крови кроликов в РА.

Таблица 9. – Определение в сыворотке крови кроликов титра антител к бактериальным антигенам *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212) ($M \pm m$)

Группа животных	<i>Pasteurella multocida</i> (штамм КМИЭВ-В166), титр, \log_2			<i>Bordetella bronchiseptica</i> (штамм КМИЭВ-В212), титр, \log		
	14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки
Контроль	1,6±0,4	1,6±0,4	1,8±0,3	1,4±0,3	1,6±0,3	1,6±0,3
Вакцина «Респимикс»	5,0±0	6,0±0	5,4±0,3	5,2±0,3	4,0±0	4,2±0,3

Вакцину считали иммуногенной, если в сыворотках крови вакцинированных клинически здоровых кроликов в реакции агглютинации среднеарифметический титр специфических антител к штаммам *Pasteurella multocida* (КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (КМИЭВ-В212) увеличивается не менее чем на 2,0 \log_2 по сравнению с соответствующим значением фоновых антител при отсутствии динамики увеличения титра антител в сыворотках крови кроликов контрольной группы.

Как видно из данных таблицы 9, иммунизация кроликов вакциной «Респимикс» вызывала повышение титра специ-

фических антител к бактериальным антигенам более чем на 2,0 \log_2 , что свидетельствовало о высокой иммуногенной активности вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана вакцина для профилактики пастереллеза, бордетеллеза и миксоматоза кроликов «Респимикс». Вакцина представляет собой двухкомпонентный биопрепарат, состоящий из сухого компонента – лиофилизированного вируса миксомы кроликов (штамм КМИЭВ-В141) и жидкого компонента – инактивированных формальдегидом и эмульгирован-

ных в масляном адьюванте штаммов бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212), который служит растворителем для сухого компонента.

Сухой компонент представляет собой однородную сухую пористую массу в виде таблетки желтовато-белого цвета без посторонних примесей.

Жидкий компонент представляет собой жидкость (гомогенную эмульсию) от бело-серого до серого цвета без посторонних примесей, при хранении которой допускается образование на поверхности прозрачного маслянистого слоя и выпадение осадка от бело-серого до серого цвета, которые при встряхивании вакцины разбиваются в равномерную эмульсию.

Вакцину изготавливают из штамма миксомы кроликов (КМИЭВ-В141), выращенного на перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и инактивированных формальдегидом

штаммов бактерий *Pasteurella multocida* (КМИЭВ-В166) и *Bordetella bronchiseptica* (КМИЭВ-В212), выращенных отдельно на сердечно-мозговом агаре.

Одна иммунизирующая доза вакцины (1,0 см³) содержит:

- антиген вируса миксомы кроликов (КМИЭВ-В141) с титром не менее 4,5 lg ТЦД₅₀/доза;

- антиген бактерий *Pasteurella multocida* (штамм КМИЭВ-В166) – не менее 1×10⁹ микробных тел;

- антиген бактерий *Bordetella bronchiseptica* (штамм КМИЭВ-В212) – не менее 1×10⁹ микробных тел;

- инактивант – формальдегид;

- масляный адьювант.

Иммунизация кроликов вакциной «Респимикс» вызывает повышение титра специфических антител к бактериальным антигенам более чем на 2,0 log₂, что свидетельствует о высокой иммуногенной активности вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дятлова, А. И. Миксоматоз кролика / А. И. Дятлова, Л. А. Литвина // Проблемы биологии, зоотехнии и битехнологии: сб. тр. науч.-практ. конф. научного общества студентов и аспирантов биолого-технологического факультета, Новосибирск, 18 декабря 2017 г.–18 декабря 2018 г. – НГАУ : Золотой колос. – С. 139–141.
2. Казаков, А. А. Дифференциальная диагностика миксоматоза от пастереллеза, стафилококкоза и спирохетоза кроликов / А. А. Казаков, И. Ю. Домницкий // Вестник СГАУ им. Н. И. Вавилова. – 2011. – № 7. – С. 7–9.
3. Кондакова, И. А. Миксоматоз / И. А. Кондакова, Ю. В. Ломава, М. И. Плющик // Принципы и технологии экологизации производства в сельском, лесном и рыбном хозяйстве : материалы 68-й междунар. науч.-практ. конф., 26-27 апреля 2017 г. – Рязань : Изд-во Рязанского государственного агротехнологического университета, 2017. – Ч. 3. – С. 82–87.
4. Наташкина, М. Ю. Профилактика миксоматоза кроликов / М. Ю. Наташкина // Кролиководство и звероводство. – 2003. – № 3. – С. 28.
5. Bertagnoli, S. Muxomatosis / S. Bertagnoli, S. Marchandean. – Rev. Sci. Tech. 2015. – 34, 549–556.
6. Pasteurellosis in rabbits / P. Coudert [et al.] // Recent advances in rabbit science. – In: Maertens L., Coudert P., editors. Melle: ILVO. – 2006. – P. 147–162.