УДК 636.2.09:615.37:[616.98:578.825.15]

ГУЛЯНИЧ М.М., e-mail: myroslava_hulyanych@ukr.net
Національний університет біоресурсів і природокористування України
НЕДОСЄКОВ В.В., д-р вет. наук, e-mail: nedosekov1@rambler.ru
Інститут ветеринарної медицини НААН
ГОДОВСЬКИЙ О.В., канд. вет. наук, e-mail: a_godovskiy@biotestlab.net
ТОВ «БіоТестЛаб»

ПІДБІР АД'ЮВАНТУ ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Наведено результати досліджень ряду ад'ювантів для конструювання інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Дослідження проводились з використанням вірусвмісного матеріалу вірусу інфекційного ринотрахеїту ВРХ штам «ВМ», в якості ад'ювантів було досліджено гідроксид алюмінію в суміші з гліцерином, кремнієву емульсію та високоочищене мінеральне масло в суміші з аеросилом. Визначено у дослідах на лабораторній моделі, що високоочищене мінеральне масло у суміші з аеросилом, спричиняє вищу імунну відповідь у дослідних тварин. Встановлена відсутність реактогенних властивостей досліджених зразків вакцини на лабораторних тварин.

Ключові слова: *ад'ювант, інфекційний ринотрахеїт ВРХ, інактивована вакцина, імуногенність вакцини*.

Вступ. Для профілактики ІРТ у всьому світі застосовують живі та інактивовані вакцини. Масова вакцинація дозволяє створити популяційний імунітет і знизити виділення та циркуляцію вірусу, аж до елімінації його із імунної популяції [1, 2].

Відповідно вимогам до вакцин проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, ці препарати повинні захищати тварин у випадку виникнення захворювання та помітно зменшити наступне поширення польового вірусу. Вакцини не повинні викликати захворювання, аборти, чи будь-яку місцеву або негативну системну реакцію, а живі вакцини – повинні бути генетично стійкими [3].

У виготовленні якісного вакцинного препарату важливу роль відіграє активність використовуваного вірусного матеріалу. Вірусний матеріал інфекційного ринотрахеїту ВРХ напрацьовують вирощуючи вірус в культурі клітин. Відомо, що чутливість клітин різна, до різних штамів вірусу ІРТ [4, 5].

Для конструювання інактивованої вакцини та її максимальної ефективності важливим етапом поряд з високоімуногенним штамом вірусу є підбір ад'юванту, що володів би максимальною сорбуючою дією та імуностимулюючим ефектом. В якості ад'юванту найбільш часто використовують гель гідроокисі алюмінію (ГАО) в силу своєї дешевизни. Зараз все частіше при розробці вакцинного препарату використовують ад'юванти на основі різних мінеральних масел, із яких отримують стійку водно-масляну

емульсію [6]. Як вважає Медуніцин Н.В., один і той самий ад'ювант здатний стимулювати імунітет, що формується під дією одного антигену, в той же час може виявитись інертним по відношенню до іншого [7]. Тому при розробці будь-якої вакцини необхідним етапом є підбір найбільш ефективного за імуностимулюючою дією ад'юванту.

Мета роботи – провести порівняльну оцінку трьох дослідних зразків ад'ювантів у складі вакцини за їх імуногенним впливом на лабораторній моделі – кролях, та виділити найбільш ефективний для конструювання інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

Матеріали і методи досліджень. Вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби штам «ВМ» культивували в перещеплюваній культурі клітин нирки теляти – MDBK. В якості підтримуючого середовища використовували суміш середовищ DMEM та RPMI у співвідношенні 1:1. Доза вірусу для зараження становила 0,01 $ТЦД_{50}$/кл. Культивування проводили в термостаті за температури 37 ±0,5°С.

Проводили культивування інфікованої культури до прояву цитопатичної дії (ЦПД) вірусу в моношарі клітин на площі не менше 75 %. Після прояву ЦПД культуральні матраси з інфікованою культурою клітин одноразово проморожували за температури мінус 20–24 °С. Після розморожування вміст культуральних матрасів струшували та об'єднували в загальну пробу вірусвмісного матеріалу. Відбирали проби для визначення інфекційної активності, контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою. Інфекційну активність визначали шляхом титрування вірусвмісного матеріалу в культурі клітин MDBK, та вираховували титр вірусу за методом Ріда та Менча [8]. Для інактивації вірусу використовували формальдегід в кінцевій концентрації 0,05 %. Повноту інактивації перевіряли шляхом трьох послідовних пасажів в культурі клітин MDBK.

В якості ад'ювантів було використано 3 % гель гідроксиду алюмінію (ГОА) в суміші з гліцерином, кремнієву емульсію (КЕ 10-01) та високоочищене мінеральне масло в суміші з аеросилом. Стерилізацію ад'ювантів проводили шляхом автоклавування при 1,5 атм. протягом 1 години.

Зразки вакцини готували в стерильних умовах шляхом змішування 40 % антигену вірусу інфекційного ринотрахеїту та 60 % ад'юванту. Змішування зразків вакцини проводили за допомогою гомогенізатора. Здійснювали бактеріологічний контроль отриманих зразків вакцини шляхом висіву на тіогліколеве середовище для виявлення бактеріальної контамінації та на середовище Сабуро для виявлення грибної контамінації (згідно ДСТУ 4483:2005 «Методи визначення бактеріальної і грибної контамінації»). Нешкідливість вакцини досліджували шляхом одноразових внутрішньом'язових ін'єкцій білим мишам (згідно СОУ 85.20-37-391:2006 «Препарати ветеринарні. Методи визначення нешкідливості»).

Для дослідження імуногенного впливу зразків вакцини виготовлених з використанням різних ад'ювантів нами було сформовано 4 групи кролів масою 2–2,5 кг та віком 2–3 місяці по 6 голів у кожній:

– перша група – зразок вакцини з ГОА та гліцерином;

– друга група – зразок вакцини з КЕ 10-01;

– третя група – зразок вакцини з легким мінеральним маслом та аеросилом;

– четверта група – контрольна, невакциновані тварини.

Дослідні зразки вакцини вводили кролям відповідних груп внутрішньом'язово в дозі 1 $см^3$ дворазово з інтервалом 14 днів.

У дослідних тварин відбирали проби крові для проведення серологічних досліджень. Відбір крові здійснювали до введення зразків вакцини, через 14 днів після першого введення, та через 7 та 14 днів після другого введення.

Дослідження сироваток крові на наявність вірусспецифічних антитіл проти вірусу інфекційного ринотрахеїту проводили в реакції нейтралізації (РН) з використанням постійної дози вірусу (100 $ТЦД_{50}$) інфекційного ринотрахеїту (відповідно рекомендацій МЕБ) [3].

Результати досліджень та їх обговорення. Інфекційна активність вірусу інфекційного ринотрахеїту у вірусмісткій суспензії, що була використана для виготовлення інактивованої вакцини склала 7,0 lg $ТЦД_{50}/см^3$. За визначення повноти інактивації вірусу дегенеративних змін та ЦПД в культурі клітин впродовж трьох пасажів виявлено не було, що свідчить про повну інактивацію вірусу інфекційного ринотрахеїту.

Всі зразки вакцини були контрольовані за показниками відсутності бактеріальної та грибної контамінації, в результаті виявились вільними від сторонньої мікрофлори.

Дослідження нешкідливості на білих мишах підтвердило нешкідливість виготовлених зразків вакцини. У тварин не відмічали місцевих та системних реакцій на введення вакцини.

Після імунізації кролів зразками вакцини проти інфекційного ринотрахеїту в дослідних тварин усіх груп не відмічали ускладнень чи негативних реакцій на введення препарату. Впродовж усього періоду спостереження тварини були клінічно здоровими.

В таблиці 1 представлені результати визначення титру віруснейтралізуючих антитіл проти вірусу інфекційного ринотрахеїту в РН у сироватках крові дослідних кролів.

Таблиця 1

Результати серологічних досліджень зразків крові вакцинованих кролів за використання різних ад'ювантів, M±m, n=6

Група тварин	Ад'ювант	Середній титр антитіл, log_2			
		До вакцинації	Через 14 діб після 1 введення	Через 7 діб після 2 введення	Через 14 діб після 2 введення
1	ГОА + гліцерин	1,95 ±0,13	3,92 ±0,19	4,89 ±0,16	6,87 ±0,18
2	КЕ 10-01	2,08 ±0,09	3,72 ±0,08	5,39 ±0,10	7,02 ±0,15
3	Мін. масло + аеросил	1,78 ±0,17	6,17 ±0,21	8,05 ±0,11	9,0 ±0,13
4	Контроль	1,89 ±0,13	1,92 ±0,13	1,97 ±0,15	1,83 ±0,13

Відповідно до отриманих результатів у тварин першої групи, яких було вакциновано зразком вакцини з ад'ювантом ГОА в суміші з гліцерином титр антитіл на 14 добу після першої вакцинації склав 3,92 ±0,19 log_2, а через 14 днів після ревакцинації 6,87 ±0,18 log_2. Інтенсивність накопичення антитіл проти інфекційного ринотрахеїту у тварин другої групи, які були вакциновані зразком вакцини з ад'ювантом КЕ 10-01 була практично однаковою, титр антитіл на 14 добу після першої вакцинації склав 3,72 ±0,08 log_2, а через 14 днів після ревакцинації 7,02 ±0,15 log_2. У тварин третьої групи, що були вакциновані зразком вакцини, де в якості ад'юванту використали суміш високоочищеного мінерального масла та аеросилу, приріст антитіл був найбільш високим. Так, на 14 добу після першої вакцинації титр антитіл склав 6,17 ±0,21 log_2, а через 14 днів після ревакцинації вже 9,0 ±0,13 log_2. Ймовірно таке значне підвищення титру антитіл у тварин третьої групи пов'язано з використанням у складі ад'юванту аеросилу, що має сорбуючі властивості та подразнюючу дію.

Таким чином, із досліджених нами речовин найбільш активну імунну відповідь на введення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту спостерігали у тварин третьої групи, де в якості ад'юванта було використано суміш високоочищеного мінерального масла та аеросилу.

Висновки та перспективи подальших досліджень. При застосуванні на лабораторній моделі – кролях інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ, що виготовлена зі штаму «ВМ», з титром інфекційної активності до інактивації 7,0 lg $ТЦД_{50}/см^3$, напрацьованого на культурі клітин MDBK та інактивованого формальдегідом показала найкращу імуногенну активність з використанням у якості ад'юванту високоочищеного мінерального масла в суміші з аеросилом. Встановлена відсутність реактогенних властивостей досліджених зразків вакцини на лабораторних тварин.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні імуногенного впливу досліджених зразків вакцини на продуктивних тваринах, телятах та тільних коровах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Машеро В.А. Инфекционные болезни телят / В.А. Машеро. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 263 с.

2. Straub O.C. Bovine Rhinotracheitis Virus. Virus Infection of Ruminants / O.C. Straub // Amsterdam ets. Elsevier. sci. Publ. – 1990. – №9. – P. 71–108.

3. OIE Terrestrial Manual 2016 / Chapter 2.4.12. – Infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

4. Hulyanych M.M. Cultural Properties of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus / M.M. Hulyanych, V.V. Nedosekov, Y.A. Sobko // Abstract book 2nd International Scientific Conference of Veterinary Medicine Students «Non sibi, sed omnibus – not for themselves, but for everybody», 15 of May 2016, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – P. 76.

5. Гуляніч М.М. Порівняння чутливості перещеплюваних культур клітин до вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби / М.М. Гуляніч, В.В. Недосєков // Науковий журнал «Молодий вчений». –2016. – №7 (34). – С.296–298.

6. Гуляніч М.М. Технологічні аспекти виготовлення інактивованих вакцин проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби / М.М. Гуляніч, В.В.Недосєков, І.С. Клейманов // Науково-технічний бюлетень Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т.3, №3. – С.58–63.

7. Медуницын Н.В. Вакцинология: учеб. пособие / Н.В. Медуницын. – 2-е изд. – М.: Триада-Х, 2004. – 448 с.

8. Reed L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // Am. J. Hygiene. 1938. – № 27. – P. 493–497.

ПОДБОР АДЪЮВАНТА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА / Гуляніч М.М., Недосєков В.В., Годовский А.В.

Приведены результаты исследований ряда адъювантов для конструирования инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Исследования проводились используя вируссодержимый материал вируса инфекционного ринотрахеита КРС штамм «ВМ», в качестве адъювантов было исследовано гидроксид алюминия в смеси с глицерином, кремниевую эмульсию и высокоочищенное минеральное масло в смеси с аэросилом. Определено в опытах на лабораторной модели, что высокоочищенное минеральное масло в смеси с аэросилом, вызывает более высокий иммунный ответ у опытных животных. Установлено отсутствие реактогенных свойств исследованных образцов вакцины на лабораторных животных.

Ключевые слова: *адъювант, инфекционный ринотрахеит КРС, инактивированная вакцина, иммуногенность вакцины.*

SELECTION OF ADJUVANTS FOR THE CONSTRUCTION OF INACTIVATED VACCINE AGAINST INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS / Hulyanych M.M., Nedosekov V.V., Godowsky A.V.

Introduction. *An important step to create an inactivated vaccine and make it effective along with the virus highly immunogenic strain is the selection of adjuvant that characterized with high sorbing abilities and potency. Therefore, during development of any vaccine the selection of the most effective immunostimulatory adjuvant is a necessary step.*

The goal of the work. *To test three samples of adjuvants for the vaccine composition to increase their potency. To conduct a comparative assessment and identify the most effective design of inactivated vaccines against infectious bovine rhinotracheitis.*

Materials and methods. *«BM» virus strain of infectious bovine rhinotracheitis was cultivated in continuous bovine kidney cells culture MDBK. Infectious activity of infectious bovine rhinotracheitis virus was 7.0 lg $TCID_{50}/cm^3$. For virus inactivation we used formaldehyde in final concentration 0.05 %. As adjuvants were used 3% aluminum hydroxide gel with glycerin, silicon emulsion and highly purified mineral oil mixed with aerosil. Samples of the vaccine were prepared mixing 40 % virus antigen and 60 % adjuvant. All vaccine samples undergone bacterial and fungal contamination control. Safety of produced vaccine samples was tested on white mice.*

To study vaccine samples we formed 3 test and 1 control groups of 2–3 months old rabbits (m=2–2.5 kg). Vaccine samples were injected intramuscularly at a dose of 1 cm^3 twice with 14 days interval. Blood sampling was performed before the vaccine administration, in 14 days after the first injection, and in 7 and 14 days after the second injection. Presence of virus specific antibodies was detected in the virus neutralization test (VN).

Results of research and discussion. *After immunization there were not registered any complications or negative reactions in rabbits of all groups.*

The level of antibodies in animals of the first group, where aluminum hydroxide with glycerin adjuvant was used and second group, where a silicon emulsion adjuvant was used, were almost equal, and by 14 days after revaccination were 6.87 ±0.18 log_2 and 7.02 ±0.15 log_2 respectively. The highest level of antibodies was in animals of the third group vaccinated with vaccine included mixture of highly purified mineral oil and aerosol. In 14 days after revaccination it was 9.0 ±0.13 log_2.

Conclusions and prospects for further research. *Inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis designed using strain «BM» with infectious activity 7.0 lg $TCID_{50}/cm^3$ before inactivation, produced on MDBK cell culture and inactivated with formaldehyde included highly purified mineral oil mixed with aerosil has shown the best potency index.*

Perspectives for further research are to study the immunogenic response of vaccine samples on farm animals, calves and pregnant cows.

Keywords: *adjuvant, infectious bovine rhinotracheitis, inactivated vaccine, immunogenicity of vaccine.*

REFERENCES

1. Mashero, V.A. (2006). Infekcionnye bolezni teljat [Infectious diseases of calves]. Vitebsk: UO VGAVM [in Russian].

2. Straub, O.C. (1990). Bovine Rhinotracheitis Virus. Virus Infection of Ruminants. Amsterdam ets. *Elsevier. sci. publ*., 9, 71-108.

3. OIE Terrestrial Manual (2016). Chapter 2.4.12. Infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis. *oie.int.* Retrieved from http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/.

4. Hulyanych, M.M., Nedosekov, V.V., & Sobko, Y.A. (2016). Cultural Properties of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. Proceedings from The Conference «Non sibi, sed omnibus – not for themselves, but for everybody»: *2nd International Scientific Conference of Veterinary Medicine Students (15 May 2016). (p. 76).* Warsaw: Warsaw University of Life Sciences.

5. Hulyanych, M.M., & Nedosekov, V.V. (2016). Porivniannia chutlyvosti pereshchepliuvanykh kultur klityn do virusu infektsiinoho rynotrakheitu velykoi rohatoi khudoby [Comparison of sensitivity continuous cell cultures to the infectious bovine rhinotracheitis virus]. *Naukovyi zhurnal «Molodyi vchenyi» – Scientific journal «Young Scientist»*, 7 (34), 296-298 [in Ukraine].

6. Hulyanych, M.M., Nedosekov, V.V., & Kleimanov, I.S. (2015). Tekhnolohichni aspekty vyhotovlennia inaktyvovanykh vaktsyn proty infektsiinoho rynotrakheitu velykoi rohatoi khudoby [Technology aspects for production of inactivated vaccines against infectious bovine rhinotracheitis]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Naukovo-doslidnyi tsentr biobezpeky ta*

ekolohichnoho kontroliu resursiv APK – Scientific and technical bulletin Research Center biosafety and environmental control resources AIC, 3, No. 3, 58-63 [in Ukraine].

7. Medunicyn, N.V. (2004). *Vakcinologija [Vaccinology].* M.: Triada-H [in Russian].

8. Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene, 27*, 493-497.

УДК 619:614.94:615:636.4

ІВАНОВА О.В., канд. вет. наук, e-mail: kot30@meta.ua
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
ЗАХАРЕНКО М.О., д-р біол. наук, проф., e-mail: znikolay@mail.ru,
ШЕВЧЕНКО Л.В., д-р вет. наук, проф., e-mail: shevchenko_laris@ukr.net,
МИХАЛЬСЬКА В.М., канд. вет. наук, доц., e-mail: vitam@bigmir.net,
МАЛЮГА Л.В., канд. с.-г. наук, доц., e-mail: malugaNDI@bigmir.net,
ПОЛЯКОВСЬКИЙ В.М., канд. вет. наук, доц., e-mail: pvam@ukr.net
Національний університет біоресурсів і природокористування України

ВМІСТ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ У СТОКАХ СВИНАРСЬКИХ ПІДПРИЄМСТВ

Доведено, що відходи тваринницьких підприємств, які спеціалізуються на виробництві свинини, містять залишки ветеринарних препаратів групи антибіотиків, сульфаніламідів, антигельмінтиків, які використовують для попередження поширення збудників інфекційних та інвазійних хвороб у свиней та гормонів. Накопичення залишків ветеринарних препаратів у відходах тваринницьких підприємств залежить від системи гноєвидалення (інтенсивності розбавлення водою гнойових стоків), віку та фізіологічного стану свиней та не впливає на це тип годівлі тварин.

Ключові слова: *антибактеріальні препарати, антигельмінтики, гормональні сполуки, відходи, свинарські підприємства.*

Вступ. Широке запровадження інтенсивних технологій виробництва продукції тваринництва призвело до виникнення великих за потужністю промислових комплексів, які практикують утримання значної кількості поголів'я тварин, особливо свиней, на обмежених територіях. Останнє передбачає утворення та накопичення значної кількості рідких відходів при виробництві свинини, основу яких складає сеча, калові маси та технологічна вода [1, 2].

Гній свинарських підприємств являє собою для довкілля значну небезпеку в епідемічному та епізоотичному відношеннях [3, 4], оскільки часто він є джерелом збудників інфекційних та інвазійних хвороб тварин і людей. Для попередження поширення збудників інфекційних та інвазійних хвороб у свиней, а також для їх профілактики використовується низка антимікробних засобів, таких як сульфаніламідні, нітрофуранові препарати і антибіотики, а також антигельмінтики, залишки яких виводяться з організму і потрапляють у