

УДК 619:616.98:578.834.11:635.5

**ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ (літературний огляд)**

ГУЛЯНИЧ М. М., аспірант

НЕДОСЄКОВ В. В., д. вет. н., професор\*

КЛЕЙМАНОВ І. С., канд. вет. н., доцент\*\*

\*Національний університет біоресурсів і  
природокористування України, м. Київ\*\*Орловський державний аграрний  
університет, м. Орел, Російська Федерація  
[myroslava\\_hulyanych@ukr.net](mailto:myroslava_hulyanych@ukr.net)

Проаналізовано ключові етапи технології виготовлення інактивованих вакцин проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ. Обґрунтовано способи та засоби здійснення кожного з технологічних етапів від накопичення вірусної сировини до контролю імуногенних властивостей інактивованої вакцини

**Інфекційний ринотрахеїт ВРХ, виготовлення вакцини, інактивовані вакцина, герпесвірус ВРХ**

**Постановка проблеми.** Прогресивний розвиток скотарства можливий за умови благополучності господарств країни щодо інфекційних хвороб. Дотримання загальних ветеринарно-санітарних правил і створення імунного поголів'я за допомогою засобів специфічної профілактики – це той план дій яких забезпечить благополуччя стада.

Зараз, інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) великої рогатої худоби зустрічається в більшості країн світу та є широко розповсюдженим у всіх регіонах України [9, 17]. Захворювання спричинюється герпесвірусом, який здатний тривалий час, та навіть довічно, персистувати в організмі інфікованої тварини [4]. Економічні збитки, які завдає захворювання, складаються з вартості загиблих і вибраковування хворих тварин, зниження продуктивності та приросту живої маси, порушення відтворювальної функції у бугаїв, корів і телиць, витрат на організацію та здійснення ветеринарно-санітарних заходів щодо локалізації та ліквідації ІРТ [14].

**Метою** даної роботи було аналізувати технологічні аспекти виготовлення інактивованих вакцин проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ.

Нині розроблені та впроваджені у використання як живі, так й інактивовані вакцинні препарати проти ІРТ. Їх якість не завжди забезпечує необхідну стійкість тварин до зараження вірусом, що негативно відбивається на

ефективності заходів, спрямованих проти захворювання [3]. Зазвичай, профілактичний ефект вакцин проти герпесвірусних інфекцій досягається при дворазовому і більше введення біопрепаратів [6]. На сьогодні існують різні схеми та засоби управління епізоотичним процесом при ІРТ і найефективнішим є застосування біопрепаратів, тобто вакцин. Більшість вчених і практиків віддають перевагу застосуванню інактивованого вакцинного препарату, найзначущими позитивними властивостями якого є екологічність й епізоотична безпечність.

Виробництво інактивованої вакцини проти ІРТ складається з наступних етапів: підбір чутливої до вірусу культури, її масштабування та виробництво вірусної сировини, очищення та концентрація вірусної сировини, інактивація, підбір ад'юванта, контроль вакцини на стерильність, нешкідливість та імуногенність. Принцип технології їх виробництва залишається єдиним, але способи та засоби здійснення кожного з етапів можуть різнитись між собою.

Для виробництва вакцинних препаратів вірус ІРТ культивують використовуючи культури первинно трипсинізованих клітин нирок та легенів ембріона корови, тестикул биків, нирок теляти та інших. Поруч з цим, завдяки своїй стабільності та відтворювальній здатності, широкого використання набули лінії перещеп-

люваних культур: TrT, HT, MDBK, RBT, Marc-145, ЛЕК, НВ, ВНК-21, КСТ, які й використовують для культивування вірусу [2, 9, 12, 19].

Виробництво вірусної сировини на основі перещеплених клітин у промисловому виробництві є недостатньо оптимізованим через порівняно малу продуктивність і значну трудомісткість при вирощуванні клітин в культуральних матрасах. Як альтернативу, можна розглядати суспензійне культивування. Проте пристосованими до таких умов є всього декілька ліній перещеплених клітин тварин (ВНК-21/13, ПТП, ППК-666) і спектр чутливості їх досить обмежений. Вирощування клітин на мікроносіях пов'язане з додатковими матеріальними витратами й необхідністю застосування досить складних методик з їх пересіву, контролю за ростом, підготовки носіїв до роботи й звільнення їх від них псевдосуспензії вірусу. Все це знижує загальну рентабельність виробництва, незважаючи на збільшення кінцевої щільності клітинної популяції [2, 5].

Відповідно до цього найбільш універсальним є ролерний спосіб культивування клітин у круговому моношарі у бутлях (ролерах), однак він потребує ретельного відпрацювання режимів культивування для конкретних клітинних ліній, щоб забезпечити максимальну реалізацію їх ростового потенціалу [12, 19].

З метою одержання антигену для гіперімінізації тварин були розроблені методи очищення й концентрування вірусу ІРТ. Для цього використали традиційний метод осадження вірусу іонами металів, а також концентрування поліетиленгліколем (ПЕГ), що дозволяє очистити вірусмісткий матеріал від баластного білка приблизно в 5 разів. За концентрування очищеного вірусу за допомогою ПЕГ з молекулярною масою 6000 підвищується його титр на 1 lg [1]. Для очищення й концентрування вірусу також застосовували мікропористе скло, поверхня якого сорбує білкові речовини або високошвидкісне ультрацентрифугування чи концентрування й очищення в градієнті щільності сахарози, що запропоновано для очищення вірусвакцин ще в 1922 році [13].

Для одержання біологічно безпечних вакцин застосовують фізичні й хімічні інактиватори. Вважають, що інактивація повинна бути

не тільки ефективною, але й максимально ошадною. Інактивація вірусу являє собою складний процес. При цьому необхідно визначити необхідну концентрацію різних реагентів, зважаючи, що низька концентрація їх не приведе до повної інактивації, а більша до змін антигенної структури і до зниження імунізуючої здатності вакцин. З хімічних сполук для інактивації вірусів найчастіше застосовують формальдегід і бетапропіолактон. Перший інактивує віруси завдяки високій реакційній здатності відносно білків і нуклеїнових кислот. Він вступає в з'єднання не тільки з вірусними частками, але й з численними компонентами середовища, до якого його добавляють. Механізм інактивації вірусів формальдегідом складний і характеризується двома типами реакцій. Взаємодія формальдегіду з нуклеїновою кислотою й білками вірусу протікає відповідно по типу реакції двох порядків [7, 9]. Позитивні результати в інактивації вірусу ІРТ також показує застосування аміноетилетиленіміну та глютарового альдегіду [12, 20].

Застосовують також фізичні методи інактивації вірусів, такі як гамма – і ультрафіолетове (УФ) опромінення. Дослідженнями встановлено, що під впливом гамма-променів інфекційність вірусів знешкоджується швидше, ніж антигенність. Застосування гамма-випромінювання дає можливість одночасно й надійно інактивувати і стерилізувати готовий препарат [7]. Викликаючи глибокі зміни в структурі нуклеїнових кислот вірусів, УФ-промені істотно не впливають на білкову оболонку, внаслідок цього інактивовані віруси зберігають свою антигенну й імуногенну активність [20].

Інактивація вірусів під температурним впливом визначається денатурацією вірусного капсида, що імовірно, полягає в частковому розгортанні білкових субодиниць і порушенні гідрофобних взаємодій. Основною причиною, що викликає інактивацію вірусу при нагріванні, є порушення структурної цілісності його геному, викликане розривом й утворенням внутрішньмолекулярних зв'язків нуклеїнової кислоти [16].

Фотодинамічний вплив деяких барвників, таких як метиленова синька, акридинний жовтогарячий, толудин синій, нейтральний чер-

воний й інші, до яких чутлива більшість вірусів також можна використовувати для інактивації вірусів [8, 13].

Отже, однією із проблем одержання інактивованих вакцин є пошук бездоганного способу інактивації вірусів, який би забезпечував незворотне ушкодження його реплікативного механізму при повному збереженні вихідної антигенної структури. У виробництві інактивованих вакцин формальдегід як і раніше є широко застосовуваним, оскільки має хороші інактивуєчі властивості.

Імуногенність інактивованих вакцин підвищують з використанням концентрованих вірусних суспензій та ад'ювантів. Ад'юванти є важливою складовою частиною інактивованої вакцини, це, будь які речовини, що діють неспецифічно та підвищують імунну відповідь організму на антигени. Ад'юванти функціонують як депо антигену, імуностимулятори та імуномодулятори. Імуностимулююча та імуномодулююча функція ад'ювантів обумовлена комплексною взаємодією трьох основних процесів: інтенсифікації специфічних та неспецифічних механізмів імуногенезу, посилення макрофагальної реакції, стимуляції *T*- і *B*-лімфоцитів, посилення синтезу антитіл та неспецифічних глобулінів, деякої інтенсифікації запальної реакції; зміна агрегатного стану антигену – корпускулювання його в більш інтенсивне включення до лімфоїдних органів; утворення депо у місці введення з пролонгацією циркуляції антигену [16].

Дія ад'ювантів відбувається в залежності від ланок імунної системи, на яку вони направлені. Наприклад, мінеральні сорбенти та масляні емульсії сприяють кращому поглинанню антигенів макрофагами. Інші ад'юванти посилюють проліферацію імунокомпетентних клітин або секрецію активізуючих факторів, треті - активізують процеси диференціації імунокомпетентних клітин (сприяють появі цитотоксичних клітин) [11].

В якості ад'ювантів застосовують: гідроокис або фосфат алюмінію; продукти мікобактерій, включаючи мураміддипептид та його похідні сапоніни, квіл-А та імуностимулюючі комплекси ISCOMи; сквалаон/сквален з емульсифікуючим агентом (арласел А); інші водно-масляні емульсії, в тому числі з мінераль-

ними маслами; багаточарові ліпосоми; блок-полімери; SAF-1: блок-полімер+сквален+твін-80+мураміддипептид; ліпополісахориди, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium parvum* IMREG-1, лімфокіни.

Найбільш широко в гуманній та ветеринарній медицині використовують солі алюмінію (гідроокис алюмінію, фосфат алюмінію, алюмокалієвий галун). Антиген адсорбується на них внаслідок іонної взаємодії, тому вакцини, виготовлені з такими традиційними ад'ювантами, прийнято називати адсорбованими або сорбованими. Вони є в міру ефективними та безпечними. При виготовленні сорбованих інактивованих вакцин проти ІРТ із великої кількості відомих депонентів найбільш широко використовують гідроокис алюмінію [5, 11].

Привертають увагу широко застосовувані в останній час нові типи масляних ад'ювантів, виготовлених на основі мінеральних та органічних масел. При використанні такого ад'юванта попередньо суспендований у воді антиген дуже тонко диспергує у маслі, внаслідок чого отримують емульсію типу "вода у маслі", краплі води з антигеном знаходяться у масляній фазі. Якщо таку суміш, утримуючу гідрофільний емульгатор, наприклад твін-80, емульгувати у воді, то отримуємо водно-масляно-водну емульсію. Часто використовуваним є ад'ювант Montanide виробництва Seppic, Франція [9, 12, 21].

Складовою технологічного процесу виготовлення інактивованих вакцин, у тому числі й проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, є контроль на стерильність, нешкідливість та імуногенність. Контроль вакцини здійснюється, як правило, державним контролером та спеціалістами біофабрики, в якому виготовляється препарат, у відповідності з вимогами, викладеними в нормативно-технічній документації. Важливим є проведення контролю не тільки готової вакцини, але й поетапний контроль проміжних продуктів під час виробництва (стерильність вірусу, інфекційний його титр, стерильність складових компонентів вакцини, визначення рН, визначення у вакцині вільного (залишкового) формальдегіду. Контроль на стерильність проводять на різних бактеріологічних поживних середовищах з метою виявлення аеробних та анаеробних бактерій,

мікоплазм, грибів та дріжджів. В практику допускається тільки стерильна вакцина. Контроль на нешкідливість проводять на лабораторних тваринах (кролики, білі миші, морські свинки) [15]. Імуногенні властивості інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту досліджують на лабораторних та сільськогосподарських тваринах шляхом прямого зараження їх вірулентним вірусом, а також за допомогою серологічних тестів. Закордонними та вітчизняними дослідниками встановлено, що найбільш об'єктивні та показові результати контролю активності вакцини проти інфекційного ринотрахеїту вдається отримати на різних сільськогосподарських тваринах, проте в основному на великій рогатій худобі, яка сприйнятлива до хвороби і в якій формується стійкий поствакцинальний імунітет. Для перевірки імуногенності вакцин вірус великої рогатій худобі вводять підшкірно або внутрішньошкірно. Серологічні реакції – РЗК, РДП, РНГА, РН, ІФА дозволяють виявляти поствакцинальні антитіла та на основі їх роботи висновки про напруженість імунітету [3].

Найбільш аргументованими є віруснейтралізуючі антитіла, які відображають якісну і кількісну напруженість імунітету, тому за їх рівнем стверджують про стан поствакцинального та постінфекційного імунітету. Для їх виявлення використовують реакцію нейтралізації вірусу інфекційного ринотрахеїту [3, 9, 10, 12], яка вважається класичною та застосовується найбільш широко, а при проведенні вказаних досліджень є еталоном, за яким порівнюють специфічність та чутливість інших серологічних реакцій. В зв'язку із зазначеним

імуногенна активність вакцин проти інфекційного ринотрахеїту визначається за титром віруснейтралізуючих антитіл у сироватках крові від щеплених тварин. За повідомленнями Сюрин В.Н. та Фоминой Н.В. [18], щеплена проти інфекційного ринотрахеїту велика рогата худоба, а також перехворілі тварини з титром віруснейтралізуючих антитіл 1:80 та більше протистояли експериментальному зараженню. Вважається, що наявність поствакцинальних віруснейтралізуючих антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби в титрі 1:8-1:16 свідчить про достатньо напружену імунну відповідь проти інфекційного ринотрахеїту.

**Висновки та перспективи подальших розробок.** На сьогодні існує велика кількість культур клітин для напрацювання вірусної сировини ІРТ, проте відомо, що їх продуктивність різниться, через це є необхідність у підборі найбільш продуктивної клітинної лінії. Існує велика кількість засобів для інактивації вірусу, які працюють, але є необхідність у визначенні найбільш оптимальної технології інактивації. Триває пошук та удосконалення ад'ювантів для застосування при виробництві вакцин проти ІРТ. Існує потреба в оптимізації схем виробництва високоякісних інактивованих вакцин проти ІРТ ВРХ, яка б відрізнялась високою технологічністю та якістю. Тому, всі основні етапи виробництва вакцинного препарату потребують глибших досліджень. Продовжується робота над розробкою нових, удосконаленням та оптимізацією вже існуючих засобів та технологій для забезпечення виробництва якісного продукту.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гридин А.С. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусом животных / А. С. Гридин, И. Н. Титов.— М. : Колос, 1971.—240с.
2. Дьяконов Л. П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Л. П. Дьяконов, В. И. Ситьков.— М.: Спутник+, 2000.—400 с.
3. Закутский Н. И. Герпесвирусные болезни животных / Н. И. Закутский.— Владимир; Покров : Фолиант, 2003.— 281 с.
4. Самуйленко А. Я. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А. Я. Самуйленко [и др.] // Инфекционная патология животных.—М., 2006.— Т. 1.— С. 662–667.
5. Катингер Х. Массовое культивирование клеток животных и получение продуктов / Х. Катингер, У. М. Шейпер // Биотехнология клеток животных.— М., 1989.— Т. 1.— С. 179–209.
6. Красочко П. А. Система интегрированной профилактики вирусных инфекций крупно-

- го рогатого скота. Использование живых и инактивированных вакцин против вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, рота- и коронавируса крупного рогатого скота / П. А. Красочко И. А. Красочко // Наше сельское хозяйство.— 2010.— № 12.— С. 57–62.
7. Кучерявенко Л. І. Розробка технології виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту та парагрипу-3 великої рогатої худоби / Л. І. Кучерявенко, В. І. Стеценко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2000.— Вип. 77.— С.220–224.
  8. Кучерявенко Р. О. Мінливість репродуктивної здатності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в залежності від умов зберігання та культивування / Р. О. Кучерявенко [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011.— Вип. 95.— С. 127–130.
  9. Малакеев А. С. Вакцина інактивована проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби для внутрішньошкірного застосування: автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / А. С. Малакеев ; [ННЦ «ІЕКВМ»].— Харків, 2013.— 20 с.
  10. Матковская С. Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита – пустулезного вульвовагинита крупного рогатого скота по показателям антител в носовом, влагалищном секрете и слезе : дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / С. Г. Матковская.— Минск, 2001.— 196 с.
  11. Медуницын Н. В. История, принципы конструирования комбинированных вакцин и проблемы вакцинопрофилактики при их применении / Н. В. Медуницын // ЖМЭИ.— 2001.— № 1.— С. 90–94.
  12. Нестеров А. А. Усовершенствование технологии изготовления вакцин против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота : автореф. дис. канд. вет. наук : 06.02.02 / А. А. Нестеров ; [ФГБУ «ВНИИЗЖ»].— Владимир, 2015.— 24 с.
  13. Кузнецова С. В. Очистка и концентрирование вируса ИРТ / С. В. Кузнецова [и др.] // Ветеринария.— 1985.— № 10.— С. 31–32.
  14. Андреев Е. В. Профилактика респираторных болезней у телят / Е. В. Андреев [та ін.] // Ветеринария.— 1980.— № 11.— С. 35.
  15. Семенченко О. Г. Адаптация вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ-ИПВ) крупного рогатого скота к лабораторным животным : автореф. дис. канд. вет. наук / О. Г. Семенченко ; [ВИЭВ].— М., 1985.— 27 с.
  16. Сергеев В. А. Вирусные вакцины / В. А. Сергеев. — К. : Урожай, 1993. - 369 с.
  17. Стеценко В. І. Епізоотична ситуація щодо інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в Україні / В. І. Стеценко, Л. І. Кучерявенко, Р. О. Кучерявенко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб.— Х., 2003.— Вип. 82.— С. 585–588.
  18. Сюрин В. Н. Диагностика вирусных болезней животных: справ. / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина.— М. : Агропромиздат, 1991.— 528 с.
  19. Юрков С. Г. Универсальная роллерная технология культивирования перевиваемых клеток животных / С. Г. Юрков [ и др.] // Ветеринария.— 1995.— № 9.— С. 29–34.
  20. Хухоров И. Ю. Биотехнологические аспекты производства противовирусных вакцин / И. Ю. Хухоров // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с.-х. животных и людей : материалы междунар. науч.-практ. конф. 16–18 апреля 2002 г.— Покров : ВНИИВВиМ, 2002.— С. 287–288.
  21. Щербаков П. Н. Инактивированная вакцина против инфекционного ринотрахеита телят (иммуногенные, реактогенные свойства и способ применения) : автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / П. Н. Щербаков ; [ВИЭВ].— М., 1993.— 25 с.

## ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Гулянич М. М., Недосеков В. В., Клейманов И. С.

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев*

*Проанализировано ключевые этапы технологии изготовления инактивированных вакцин про-*

*тив инфекционного ринотрахеита КРС. Обоснованно способы и средства осуществления каждого из технологических этапов от накопления вирусного сырья до контроля иммуногенных свойств инактивированной вакцины*

***Инфекционный ринотрахеит КРС, изготовление вакцины, инактивированная вакцина, герпесвирус КРС***

---

## **TECHNOLOGY ASPECTS FOR PRODUCTION OF INACTIVATED VACCINES AGAINST INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS**

**M. Hulyanych, V. Nedosiekov, I. Kleimanov**

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv*

*The Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) occurs in the majority of countries and widespread in all regions of Ukraine. Diseases caused by the herpes virus which is able for a long period and do not persist in the body of an infected animal.*

*Purpose. Analysis of the technological aspects of the production of vaccines, inactivated against infectious bovine rhinotracheitis.*

*Results. Today developed and implemented in the use live and inactivated vaccines against IBR. Principle of their production technology is the only one, but the ways and means to implement each of the stages may vary. Wide use becomes a line of inoculated cell cultures due to its stability and reproductive ability. Culturing cells in rollers in a circular monolayer bottles is the most universal method. For purification and concentration of the virus used traditional method of deposition virus metal ions, concentration of polyethylene glycol, microporous glass. Consider that inactivation should be not only effective but also maximally savings.*

*For the inactivation of viruses most frequently used formaldehyde, beta propio-lactone, amino ethyl ethylene and glutaraldehyde. The most commonly in humane and veterinary medicine use aluminium salts, but now attract attention widely used in recent years new types of oil adjuvants made from mineral and organic oils. Part of the process production of inactivated vaccines against infectious bovine rhinotracheitis is the control for sterility, harmlessness and immunogenicity. Immunogenic properties of inactivated vaccines against infectious rhinotracheitis tested on laboratory and farm animals by direct infection of virulent virus, and then using serological tests. To estimate intensity of post-vaccination immunity detects antibodies mostly through virus neutralization and ELISA.*

*Conclusion. There is a need to optimize the production of high quality schemes inactivated vaccines against IBR, which would differ high technology and quality. Therefore, all the main stages of production vaccine preparation need deeper research. Work on the development of new, improved and optimization of existing tools and technologies for the production of a quality product is continuing*

***Infectious bovine rhinotracheitis, production of the vaccine, inactivated vaccine, herpesvirus***

---