

УДК 619:616.98:578.825.
15:578.833.3:615.371
© 2012

В.В. Кучерявенко,
кандидат

ветеринарних наук

ННЦ «Інститут
експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»

ЕМУЛЬСІЙНА ІНАКТИВОВАНА ВАКЦИНА ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ТА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Наведено результати роботи з розробки інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї великої рогатої худоби. На підставі проведених досліджень створено вакцину емульсійну інактивовану проти інфекційного ринотрахеїту і вірусної діареї, на яку розроблено та затверджено нормативну документацію, отримано реєстраційне посвідчення та деклараційний патент України.

Успішний розвиток скотарства можливий лише за стійкого благополуччя господарств щодо інфекційних хвороб, забезпечення якого в сучасних умовах може бути здійснено завдяки системному дотриманню загальних ветеринарно-санітарних правил і створенню імунного поголів'я за допомогою засобів специфічної профілактики. Серед інфекційних хвороб великої рогатої худоби значного поширення у світі набули інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) і вірусна діарея (ВД), які є головною причиною виникнення пневмоентеритів великої рогатої худоби. У країнах з високорозвиненим технологічним скотарством розроблено та впроваджено програми з контролю та ліквідації ІРТ і ВД. Основою цих програм лише в Австрії, Данії, Норвегії, Фінляндії, Швейцарії та Швеції є повна ліквідація хворих і серопозитивних тварин. В інших країнах світу розроблено програми з контролю та профілактики ІРТ і ВД, в основу яких закладено щеплення тварин проти цих інфекцій [4–8].

В Україні епізоотична ситуація з ІРТ і ВД характеризується змішаним перебігом цих інфекцій. Їх поширенню сприяє здатність вірусів ІРТ і ВД до персистенції, внаслідок чого перехворілі тварини залишаються довічними вірусоносіями й джерелом збудника інфекції [1, 3].

Мета роботи. Враховуючи дані щодо змішаного перебігу ІРТ і ВД, що нині домінує, значної серопозитивності великої рогатої худоби до цих захворювань, а також відсутність в Україні вакцини, яка б одночасно захищала тварин від цих інфекцій, визначено **мету роботи** — розробити технологію виготовлення вакцини емульсійної інактивованої проти ІРТ і ВД великої рогатої худоби.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використовували виробничі штами вірусів ІРТ та ВД великої рогатої худоби, моношарові культури перещеплюваних клітин нирки вівці (НВ), трахеї теляти (ТрТ), нирки сирійського хом'яч-

ка (ВНК-21/13), коронарних судин теляти (КСТ), морських свинок і великої рогатої худоби.

Титр вірусу обраховували за методом Ріда й Менча та виражали в тканинних цитопатогенних дозах на 1 см³ (ТЦД_{50/см³}) [2]. Постановку реакції нейтралізації за мікрметодом здійснювали за стандартом Міжнародного епізоотичного бюро у плоскодонних планшетах фірми «Nunc» та «Spectar» [9].

Результати досліджень. Створення засобів специфічної профілактики інфекційних хвороб неможливе без використання ефективних методів отримання вірусної сировини для виготовлення вакцин. Ефективність технології отримання вірусної сировини залежить від клітинної моделі, штаму вірусу, способу вирощування клітин, умов їх культивування й інших факторів, які набувають особливого значення під час виготовлення інактивованих вакцин. Тому на першому етапі нашої роботи з метою підбору чутливої клітинної системи для накопичення вірусів ІРТ і ВД з максимальним титром інфекційної активності були випробувані такі лінії перещеплюваних клітин: ТрТ, НВ, КСТ, ВНК-21/13. На кожній із цих культур клітин проведено послідовні 3-разові пасажі вірусів ІРТ і ВД з наступним визначенням титру їх інфекційної активності (табл. 1).

Установлено, що вихідний титр інфекційної активності вірусу ІРТ становив 7,12±0,14 lg ТЦД_{50/см³}. Після 3-х послідовних пасажів вірусу ІРТ на культурі клітин КСТ і ВНК-21/2-17 його титр був на рівні вихідного — 7,12±0,14 lg ТЦД_{50/см³}. Після пасажування на культурі клітин ТрТ інфекційна активність вірусу ІРТ збільшилась і становила 7,5±0 lg ТЦД_{50/см³}. Накопичення вірусу ІРТ з найвищим титром інфекційності забезпечила перещеплювана культура клітин нирки вівці. Після трьох послідовних пасажів на цій культурі клітин титр його інфекційної активності становив 8,06±0,12 lg ТЦД_{50/см³}.

1. Результати визначення інфекційної активності вірусів IPT і ВД на різних лініях перещеплюваних клітин ($M \pm m$, $n=3$)

Перещеплювана культура клітин	Титр інфекційної активності вірусів ($\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$)							
	IPT				ВД			
	Послідовні пасажі вірусів							
	Вихідний титр	1	2	3	Вихідний титр	1	2	3
ТрТ	7,12±0,14	7,37±0,14	7,43±0,12	7,5±0	6,0±0,2	6,0±0,2	6,25±0,28	6,56±0,12
КСТ	7,12±0,14	7,12±0,14	7,12±0,14	7,12±0,14	6,0±0,2	6,75±0,28	7,0±0,28	7,5±0*
НВ	7,12±0,14	7,75±0,28	7,87±0,14	8,06±0,12*	6,0±0,2	6,0±0,2	6,12±0,14	6,31±0,12
ВНК-21/2-17	7,12±0,14	7,12±0,14	7,12±0,14	7,12±0,14	6,0±0,2	6,0±0,2	6,0±0,2	6,0±0,2

* Різниця достовірна за $P < 0,01$ відносно вихідного титру.

Вихідний титр інфекційної активності ВД становив $6 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ і не змінився після пасажування на культурі клітин ВНК-21/2-17. На інших перещеплюваних культурах клітин спостерігали зростання його титру. Максимальний титр інфекційної активності ВД отримали на перещеплюваній культурі клітин коронарних судин теляти на рівні $7,5 \pm 0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

Отже, перещеплювані лінії культур клітин НВ й КСТ забезпечували оптимальну репродукцію вірусів IPT і ВД з максимальним титром інфекційної активності. На підставі цього вони були використані нами в подальшій роботі як базові для отримання вірусної сировини.

Після проведення дослідів з підбору ефективних систем культивування, концентрування та очистки вірусів IPT і ВД великої рогатої худоби провели підбір інактиватора. Як відомо, однією з головних вимог до інактиваторів є повне знищення інфекційності за збереження антигенної активності вірусів. Ми вивчали вплив формальдегіду та етиленіміну на антигенну активність вірусів IPT і ВД, оскільки ці інактиватори набули широкого застосування під час виготовлення інактивованих вакцин. Для цього нами проведено щеплення тварин зразками

вірусів IPT і ВД, інактивованих формальдегідом та етиленіміном (табл. 2).

Як свідчать дані табл. 2, імунна відповідь на антиген вірусу IPT становила відповідно на 14-ту та 34-ту доби на рівні $2,5 \pm 0,57$ — $5,6 \pm 0,57 \log_2$, інактивованого формальдегідом, $2,33 \pm 0,57$ — $6 \pm 0 \log_2$, інактивованого етиленіміном. За імунізації тварин ВД, інактивованим формальдегідом та етиленіміном, імунна відповідь становила $2,75 \pm 0,5$ — $8 \pm 0 \log_2$ та 3 ± 0 — $7,66 \pm 0,57 \log_2$ відповідно. На підставі отриманих даних ми зробили висновок, що використані інактиватори не мають негативного впливу на антигенну структуру вірусів, тому титр віруснейтралізаційних антитіл на введені інактивовані антигени вірусів був майже на однаковому рівні. До технології виготовлення інактивованої вакцини проти IPT і ВД ми ввели як інактиватор формальдегід, оскільки, за літературними даними, він, на відміну від етиленіміну, не має токсичних і мутагенних властивостей.

Після підбору оптимального співвідношення антигенів (вірусу IPT і ВД) у вакцинному препараті провели дослід щодо підбору ефективного ад'юванту, з огляду на те, що імунна від-

2. Результати вивчення впливу інактиватора на антигенну активність вірусів IPT і ВД ($M \pm m$, $n=5$)

Зразки вірусів, інактивованих різними інактиваторами	Титр віруснейтралізаційних антитіл (\log_2)					
	IPT			ВД		
	через 14 діб	через 24 доби	через 34 доби	через 14 діб	через 24 доби	через 34 доби
Формальдегідом	2,5±0,57	4,33±0,57	5,6±0,57	2,75±0,57	4,0±0	8,0±0
Етиленіміном	2,33±0,57	4,0±1,0	6,0±0	3,0±0	5,33±0,57	7,66±0,57
Плацебо	0	0	0	0	0	0

повідь за щеплення інактивованими вакцинами значною мірою залежить від останнього. Для цього ми щепили морських свинок дослідними зразками вакцини, які відрізнялися лише ад'ювантом, який входив до їхнього складу. Антигенні властивості дослідних зразків вакцини вивчали за титром віруснейтралізаційних антитіл проти ІРТ і ВД. Так, уже через 7 днів після введення всі дослідні зразки індукували утворення специфічних антитіл до вірусу ІРТ і ВД на рівні 4–9 \log_2 . Найвираженішу антигенну активність мав зразок вакцини з ад'ювантом Montanide ISA 70. Порівняно з іншими ад'ювантами він забезпечував утворення на високому рівні ранньої імунної відповіді та її подальше розгортання. На підставі цих даних ми включили як ад'ювант масло Montanide ISA 70 до технології виготовлення інактивованої вакцини проти ІРТ і ВД.

Завершальним етапом нашої роботи був підбір оптимальної імунізаційної дози вакцини для щеплення великої рогатої худоби. Для цього піддослідних корів щепили вакциною у дозі 5, 7 і 10 см^3 , а телят — 3, 5 і 7 см^3 . Під час проведення аналізу з оцінки індукції віруснейтралізаційних антитіл проти ІРТ і ВД після щеплення виявлено залежність цього показника від дози препарату. Так, у корів максимальний під-

йом рівня специфічних антитіл до вірусу ІРТ спостерігали через 25 днів після щеплення — 7,33 \log_2 у тварин, щеплених вакциною в дозах 10 та 7 см^3 . Максимальний титр антитіл до ВД у корів спостерігали через 45 днів на рівні 7,75 \log_2 після введення вакцини об'ємом 7 см^3 , на 60–120-ту добу після щеплення ці показники знижувались. Причому титр специфічних антитіл до вірусів ІРТ і ВД у цей проміжок часу був майже на одному рівні у корів, вакцинованих цим препаратом у дозах 10 та 7 см^3 , за значно нижчих показників — у корів, щеплених у дозі 5 см^3 . Отже, оптимальною дозою щеплення корів є 7 см^3 вакцини.

Залежність рівня специфічних антитіл до вірусів ІРТ і ВД від дози щеплення встановлено також і в телят. Так, максимальні значення цих показників виявлено на 45-ту добу після щеплення до ВД на рівні 9,33 \log_2 , а до вірусу ІРТ — на рівні 7,6 \log_2 у телят, щеплених 5 см^3 вакцини. В подальшому на 60-ту та 120-ту доби рівень антитіл до вірусу ІРТ і ВД у всіх щеплених телят знижувався, але у телят, вакцинованих 5 см^3 , цей спад був незначним, на відміну від телят, імунізованих вакциною в дозах 3 та 7 см^3 . Отже, оптимальною дозою щеплення телят є доза вакцини об'ємом 5 см^3 .

Висновки

На підставі проведених досліджень створено вакцину емульсійну інактивовану проти інфекційного ринотрахеїту і вірусної діареї, на яку розроблено та затверджено нормативну

документацію, отримано реєстраційне посвідчення (№ 3279-04-0362-08) та деклараційний патент України на корисну модель №4626 Україна, МПК А61К39/26.

Бібліографія

1. Красочко П.А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия): автореф. дис. на соиск. науч. степ. д-ра вет. наук: 16.00.03/Академия аграрных наук Республики Беларусь. — Минск, 1997. — 32 с.
2. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных/В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. — М.: Агропромиздат, 1986. — 351 с.
3. Поспишил З., Меншик Я. Вирусы инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи КРС как причина повышенной смертности и заболеваемости телят в промышленном скотоводстве// XXI Всемир. вет. конгр.: Рез. докл. и сообщ. — М., 1979. — Т. 5. — С. 152–153.
4. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота/А.Г. Глозов, О.Г. Петрова, Т.И. Глотова и др.//Ветеринария. — 2002. — № 3. — С. 17–21.
5. Эпизоотологические исследования инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на

фермах Литвы/А. Ремейкис, А. Шаломскас, Б. Тамашаускас, Р. Щербавичюс//Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: Матер. междунар. науч. конф. — Х., 1995. — С. 63–65.

6. A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves/D. Deregt, P.S. Carman, R.M. Clark et al.//J. of Veterinary Diagnostic Investigation. — 2002. — 14, № 5. — P. 433–437.

7. Bilge Dagalp S., Yildirim Y., Alkan F. Detection of maternal antibody levels against BHV-1 in calves //Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. — 2001. — 48, № 2. — P. 117–122.

8. Greiser-Wilke I., Grummer B., Moennig V. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe//Biologicals. — 2003. — № 31. — P. 113–118.

9. Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines. — 2000. — Part 2, section 2.3, Chapter 2.3.5–2.10.6.