

УДК 619:616.98-084:[578.82/.83+579.843.95]:602:615.371:636.4

БУЗУН А.І., канд. вет. наук, доцент, epibuz@ukr.net

СТЕГНІЙ Б.Т., д-р вет. наук, admin@vet.kharkov.ua

КОЛЬЧИК О.В., канд. вет. наук, с. н. с., kolchuk-elena@ukr.net

КОРОВІН І.В., пошукач

Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини", м. Харків

РОЗРОБКА ІНАКТИВОВАНОЇ КОМБІНОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ, РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ ТА ГЕМОЛІТИЧНОГО ПАСТЕРЕЛЬОЗУ СВИНЕЙ

*У статті представлені результати вивчення імуногенності розробленої вакцини на мишах ($n=20$), яких заражали підшкірно шт. «№7» *M. haemolytica* в дозі 105 БТ50. Антигенність вакцини контролювали на свинях ($n=5$) за рівнем їх сероконверсії на 2-разове (інтервал 3 тиж.) введення препарату. Усі щеплені миші ($n=10$), на відміну від нещеплених ($n=10$) вижили після інокуляції пастерелюю. Після 1-го щеплення цільовим препаратом рівень сероконверсії мишей на збудників РРСС, ЦВС-2 та пастерельозу становив, відповідно, 0; $1/2.30 \pm 0.11$, а також $1/351.00 \pm 5.73$ ($P \leq 0.01$), а свиней – $1/8.80 \pm 2.05$; $1/22.50 \pm 7.73$ та $1/51.00 \pm 6.88$ ($P \leq 0.05$), відповідно. Через місяць після ревакцинації свині мали сероконверсію на рівні, відповідно, $1/17.40 \pm 0.78$; $1/34.23 \pm 0.73$ та $1/121.11 \pm 2.44$ ($P \leq 0.05$).*

Удосконалена вакцина «РепроСуіВак-ІЕКВМ» відповідає вимогам до захисних препаратів проти РРСС, ЦВС-2 та пастерельозу і може бути випробувана в наглядових та захисних зонах карантину проти АЧС для запобігання прихованого поширення в них збудника цієї хвороби.

Ключові слова: вакцина, гемолітичний пастерельоз, репродуктивно-респіраторний синдром, цирковірусна інфекція, щеплення.

Вступ. У 2016 – 2017 роках в ННЦ «ІЕКВМ» було встановлено феномен прихованого поширення збудника африканської чуми свиней (АЧС) серед свинопоголів'я в складі асоціативної патогенної мікрофлори – цирковірусної інфекції (ЦВС-2) та гемофільозного пастерельозу (А. Vuzun, 2016; А. Vuzun, О. Kolchuk, 2017). За отриманими нами даними встановлено, що нерідко після проведення чинних карантинних заходів проти АЧС після її спалаху у ензоотичних осередках цирковірусної інфекції та пастерельозу, підсвинки-сентинелі можуть ставати носіями збудників зазначених інфекцій і, за результатами серологічного моніторингу – збудника африканської чуми свиней (АЧС). Механізми утворення та поширення асоціацій цих збудників можуть бути пов'язаними зі специфічною для ЦВС-2 імуносупресивною дією на клітинний імунітет свині [1], а також з взаємодією тканин біологічного господаря з пастерельозними токсинами та подібними до збудника АЧС [2] герпесвірусами [3, 4]. Проте слід підкреслити, що природа зазначеного феномену ще далека від повного розуміння. Але ж очевидна надзвичайна небезпека асоційованих інфекцій АЧС для вітчизняного свинарства, робить створення відповідних захисних засобів дуже нагальним.

На цій підставі ми вирішили адаптувати раніше розроблену нами вакцину «РепроСуїВак-ІЕКВМ» для профілактики не лише 2-го типу цирковірусної інфекції (ЦВС-2) та репродуктивно-респіраторного синдрому, але й гемолітичного пастерельозу (збудник – *Mannheimia haemolytica* або гемолітична пастерела, за застарілою класифікацією): для застосування у спостережній та захисній зонах карантину проти АЧС, в першу чергу.

Мета досліджень – розробка вакцини для профілактики вірусно-бактерійних інфекцій, які сприяють прихованому поширенню збудника АЧС в Україні.

Матеріали та методи досліджень. Для отримання цільового вакцинного препарату додатково ввели у склад вакцини «РепроСуїВак-ІЕКВМ» протективні антигени гемолітичної пастерели, приготовані традиційним методом інактивації формальдегідом 6-годинної та 1-добової культури *Mannheimia haemolytica* штаму «№ 7». У всіх випадках для конструювання вдосконаленої вакцини в якості ад'юванту замість Montanide ISA 70 (Fr.) в складі вакцини використовували вітчизняну комерційну кремній-вмісну емульсію KE 1001 у обсязі 71-75 % від загального обсягу препарату. Для виключення конкуренції антигенів у складі цільового препарату його експериментальні серії (n=4) з різними співвідношеннями протективних антигенів ЦВС-2, збудників РРСС та пастерельозу свиней вводили дорослим мишам (n=10) на кожен серію препарату та свиням (n=5). Сероконверсію на вірусні та бактерійні протективні антигени визначали, відповідно, в реакції затримки гемаглютинації з еритроцитами миші (РЗГА) та реакції затримки аглютинації бактерій *M. haemolytica* штаму «№ 7» (РЗА), з використанням 8 аглютинуючих одиниць, відповідно, вірусів ЦВС-2 [5] і РРСС [6], а також бактерій *M. haemolytica* [7]. Імуногенність отриманого препарату визначали методом біопроби на дорослих мишах з використанням у якості пробійника 6-годинної (n=10 мишей) та 1-добової культур (n=10 мишей) *M. haemolytica* штаму «№ 7» [8]. Антигенність вакцини контролювали на підсвинках 4-5-місячного віку (n=5) згідно чинного ТУ У на вакцину «РепроСуїВак-ІЕКВМ» з доповненням щодо серологічного дослідження на пастерельоз свиней.

Результати досліджень та їх обговорення.

Заміна в складі вакцини імпортного ад'юванту Montanide ISA 70 (Fr.) на вітчизняну комерційну кремній-вмісну емульсію KE 1001 у обсязі 71-75 % від загального обсягу препарату, як показують дані таблиці (див. нижче) практично не позначилася на антигенності цільового вакцинного препарату. Проте тепер препарат перед введенням потрібно було струшувати впродовж до одної хвилини, щоб отримати його однорідну емульсію. Крім того, оскільки термін придатності емульсії KE 1001 згідно паспортним даним 9 місяців, термін придатності модифікованого нею препарату має встановлюватися з урахуванням цієї особливості емульсії KE. Також встановлено, що ущільнення тканин у місці введення у мишей та свиней розсмоктуються на 2,5-3 тижні повільніше у порівнянні з ад'ювантом Montanide ISA 70.

Усі вакциновані дорослі миші (n=10), на відміну від нещеплених (n=10), вижили після інокуляції їх як 6-годинною, так і 1-добовою бульйонними культурами пастерели *M. haemolytica* у дозі 0.5 см^3 (10^5 БТ₅₀) впродовж 1-міс. випробувань.

Результати підбору антигенного складу вакцини випробування наведено у таблиці 1.

Звідні дані з підбору антигенного складу вакцини «РепроСуїВак-ІЕКВМ» проти ЦВІС, РРСС та пастерельозу свиней інактивованої, комбінованої, емульсованої (одноразове введення вакцини)

Випробовуваний препарат	вміст Аг пастерел	Середньгеометричний титр антитіл проти					
		вірусу ЦВС-2		вірусу РРСС		<i>M. haemolytica</i>	
		миші	свині	миші	свині	миші	свині
«РепроСуїВак-ІЕКВМ» експ.сер.1	3	1/3.77 ± 0.07	-	0	-	1/131.00 ± 8.22	-
«РепроСуїВак-ІЕКВМ» експ.сер.2	9	1/2.64 ± 0.17	-	0	-	1/247.03 ± 4.53	-
«РепроСуїВак-ІЕКВМ» експ.сер.3	18	1/2.30 ± 0.11	1/22.50 ± 7.73	0	1/8.80 ± 2.05	1/351.00 ± 5.73	1/51.00 ± 6.88
«РепроСуїВак-ІЕКВМ» експ.сер.4	27	0	-	0	-	1/745.87 ± 3.55	-
«РепроСуїВак-ІЕКВМ» проти РРСС та ЦВІС, лаб. сер.7	0	1/2.28 ± 0.08	1/25.33 ± 3.24	0	1/12.32 ± 4.25	0	0

За основу взято рецептуру вакцини з вмістом 18-20 % пастерельозних антигенів від загального антигенного складу вакцини (експериментальна серія №3). Рівень сероконверсії мишей на антигени збудника РРСС, ЦВС-2 та пастерельозний антигени у вакцині, виготовленій за цією рецептурою, становив, відповідно, 0; 1/2.30±0.11, а також 1/351.00±5.73 ($P \leq 0.01$). З даних таблиці також видно, що застосування меншої чи більшої за 18-20% кількості пастерельозних антигенів у вакцині «РепроСуїВак-ІЕКВМ» проти РРСС, ЦВІС та пастерельозу свиней інактивованій комбінованій призводить до суттєвої конкуренції між вірусними і бактерійними антигенами. Тому для випробувань на свинях використовували вакцину, приготовану саме за цією рецептурою.

Всі вакциновані свині ($n=5$) через 3 тижні після першого щеплення мали рівень сероконверсії на цільові вірусні (РРСС та ЦВС-2) та пастерельозний антигени, відповідно, 1/8.80±2.05; 1/22.50±7.73 та 1/51.00±6.88 ($P \leq 0.05$). Через місяць після ревакцинації, зробленої через 3 тижні після першого щеплення, свині мали сероконверсію на ті самі антигени на рівні, відповідно, 1/17.40±0.78; 1/34.23±0.73 та 1/121.11±2.44 ($P \leq 0.05$).

Отримані дані засвідчили, що розроблений на основі існуючого вакцинний препарат дозволяє формувати гуморальний імунітет свині проти ЦВС-2 та РРСС на тому ж рівні, що і вакцина «РепроСуїВак-ІЕКВМ» проти РРСС та ЦВІС інактивована емульсована. В той же час цей препарат стимулює у свиней гуморальний імунітет проти гемолітичної пастерели, яка у формі вірус-асоційованих інфекцій сприяє прихованому поширенню збудника АЧС. Застосування такого препарату в сучасному свинарстві, на нашу думку, дозволить дезавувати поширення АЧС на ранніх фазах її епізоотичного процесу в Україні – до виникнення спалахів хвороби принаймні у промисловому свинарстві.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

За показниками імуногенності та антигенності удосконалена вакцина «РепроСуїВак-ІЕКВМ» відповідає вимогам до захисних препаратів проти РРСС, ЦВС-2 та пастерельозу, які сприяють прихованому поширенню збудника АЧС в Україні.

Вакцину необхідно випробувати на ефективність у відповідних зонах карантинування територій щодо АЧС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Reduced antigen presentation capability and modified inflammatory/immunosuppressive cytokine expression of induced monocyte-derived dendritic cells from peripheral blood of piglets infected with porcine circovirus type 2 / N. Yang, J. Li, Q. Yang, J. Qiao, D. Cui, F. Liu, H. Li, S. Zhou // Archives of virology. – 2018. – Feb 3.
2. Kvensakul M. The Bcl-2 Family in Host-Virus Interactions / M. Kvensakul, S. Caria, M. G. Hinds // Viruses. – 2017. – Vol. 9.
3. Effect of experimental infection of cattle with bovine herpesvirus-1 (BHV-1) on the ex vivo interaction of bovine leukocytes with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica leukotoxin / F. Leite, M. J. Sylte, S. O'Brien, R. Schultz, S. Peek, K. van Reeth, C. J. Czuprynski // Veterinary immunology and immunopathology. – 2002. – Vol. 84. – P. 97–110.
4. Buzun A. Threat of hidden spread of the African swine fever as a concurrent infection in Ukraine / A. Buzun // СБЕР Ukraine Research Forum and Peer. Review Session (Kyiv, Ukraine, 4–8 April 2016): abstr. – Kyiv, 2016. – P. 72.
5. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus / G. M. Allan, K. V. Phenix, D. Todd, M. S. McNulty // Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B. – 1994. – Vol. 41. – P. 17–26.
6. Hemagglutination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. / E. R. Jusa, Y. Inaba, M. Kohn, H. Mashimo, O. Hirose // The Journal of veterinary medical science. – 1996. – Vol. 58. – P. 521–527.
7. Purification and characterization of an adhesin from Pasteurella haemolytica / L. Jaramillo, F. Díaz, P. Hernández, H. Debray, F. Trigo, G. Mendoza, E. Zenteno // Glycobiology. – 2000. – Vol. 10. – P. 31–37.
8. Immunogenicity of Mannheimia haemolytica recombinant outer membrane proteins serotype 1-specific antigen, OmpA, OmpP2, and OmpD15 / S. Ayalew, B. Shrestha, M. Montelongo, A. E. Wilson, A. W. Confer // Clinical and vaccine immunology. – 2011. – Vol. 18. – P. 2067–2074.

РАЗРАБОТКА ИНАКТИВИРОВАННОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА И ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ПАСТЕРЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ / Бузун А.И., Стегний Б.Т., Кольчик Е.В., Коровин И.В.

*В статье представлены результаты изучения иммуногенности разработанной вакцины на мышцах ($n = 20$), которых заражали подкожно шт. «№7» *M. haemolytica* в дозе 105 БТ50. Антигенность вакцины контролировали на свиньях ($n = 5$) по уровню их сероконверсии на 2-разовое (интервал 3 нед.) введение препарата. Все привитые мыши ($n=10$), в отличие от непривитых ($n = 10$) выжили после инокуляции пастерел. После 1-ой прививки целевым препаратом уровень сероконверсии мышцей на возбудителей РРСС, ЦВС-2 и пастереллеза составил, соответственно, 0; $1 / 2.30 + 0.11$, а также $1 / 351.00 + 5.73$ ($P < 0.01$), а свиней - $1 / 8.80 + 2.05$; $1 / 22.50 + 7.73$ и $1 / 51.00 + 6.88$ ($P < 0.05$), соответственно. Через месяц после ревакцинации свиньи имели сероконверсию на уровне, соответственно, $1 / 17.40 + 0.78$; $1 / 34.23 + 0.73$ и $1 / 121.11 + 2.44$ ($P < 0.05$).*

Усовершенствованная вакцина «РепроСуиВак-ИЭКВМ» соответствует требованиям к защитным препаратам против РРСС, ЦВС-2 и пастереллеза и может быть апробирована в надзорных и защитных зонах карантина против АЧС для предотвращения скрытого распространения в них возбудителя этой болезни.

Ключевые слова: вакцина, гемолитический пастереллез, репродуктивно-респираторный синдром, цирковирусная инфекция, прививки.

DEVELOPMENT OF VACCINE AGAINST CONCURENT AFRICAN SWINE FEVER INFECTIONS THAT PROMOTE ECLIPSE OF IT'S SPREAD IN UKRAINE / Buzun A.I., Stegnyy B.T., Kolchik O.V., Korovin I.V.

Introduction. In a newly established approach to blind spreading of ASF in Ukraine as concurrent infections (A. Buzun, 2016; A. Buzun, O. Kolchik, 2017), we decided to adapt of our early developed vaccine “ReproSuiVac-IECVM” to prevention of PCV-2, PRRS and Mannheimia haemolytica infections in limited areas around ASF outbreaks.

Aims. Development of vaccine for prevention of the concurrent infections that promote to blind spreading ASF in Ukraine.

Materials and methods. For improvement of vaccine “ReproSuiVac-IECVM” the antitoxin and bacterin of the Mannheimia haemolytica were added to former composition in relations that not cause the antigens competition in vaccine (as tested by seroconversion on correspondence antigens). In addition we replaced the Montanide ISA 70 (Fr.) on KE 1001 emulsion (UA). For research of post-vaccine levels of antibodies in both mice and porcine we used our test-kit “ReproSuiScreen-IECVM” for PRRS- and PCV-2 antibodies and agglutination test with correspondence bacterin for Mannheimia haemolytica antibodies.

Research results and discussion.

All vaccinated adult mouse (n=12) at contrast to unvaccinated (n=8) were alive after its inoculation with broth culture of Mannheimia haemolytica in dose 0.5 cm³ (10⁵ BC₅₀) during 1 month of trials. Level of vaccinated mouse seroconversion on PRRS, PCV-2 and bacterial antigens was 0; 1/2.30±0.11 and 1/351.00±5.73 (P≤0.01), in correspondence. All vaccinated pigs (n=5) after first injection had a levels of seroconversion on PRRS, PCV-2 and bacterial antigens (3 week after vaccination) 1/8.80±2.05; 1/22.50±7.73 and 1/51.00±6.88 (P≤0.05), in correspondence. After revaccination (3 week after first injection) pigs had a levels of seroconversion on PRRS, PCV-2 and bacterial antigens (3 week after second injection) 1/17.40±0.78; 1/34.23±0.73 and 1/121.11±2.44 (P≤0.05), in correspondence.

Conclusions. Modified vaccine “ReproSuiVac-IECVM” are ready to clinical trials against the concurrent ASF-hemolytic pasteurellosis infections that promote of blind spreading of ASF agent in the quarantine areas of ASF outbreaks (promote of its attribution) in Ukraine.

Keywords: vaccine, hemolytic pasteurellosis, reproductive and respiratory syndrome, circovirus infection, vaccinations.

REFERENCES

- 1 Yang N, Li J, Yang Q, Qiao J, Cui D, Liu F, Li H, Zhou S. (2018) [Reduced antigen presentation capability and modified inflammatory/immunosuppressive cytokine expression of induced monocyte-derived dendritic cells from peripheral blood of piglets infected with porcine circovirus type 2.] *Arch Virol.* 3, 32-35 [in English].
- 2 Kvensakul M, Caria S, Hinds MG. (2018) *The Bcl-2 Family in Host-Virus Interactions.* *Viruses* Oct 6, 9-10 [in English].
- 3 Leite F, Sylte MJ, O'Brien S, Schultz R, Peek S, van Reeth K, Czuprynski CJ. (2002) Effect of experimental infection of cattle with bovine herpesvirus-1 (BHV-1) on the ex vivo interaction of bovine leukocytes with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica leukotoxin. *Vet Immunol Immunopathol.* 1, 97-110 [in English].
- 4 Buzun, A. (2016) Threat of hidden spread of the African swine fever as a concurrent infection in Ukraine. *CBEP Ukraine Research Forum and Peer. Review Session*, Kyiv, Ukraine, 100, 72-75 [in English].
- 5 Allan GM1, Phenix KV, Todd D, McNulty MS. (1994) Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralb. Veterinarmed.* 41, 17-26 [in English].
- 6 Jusa ER, Inaba Y., Kohno M., Mashimo H., Hirose O. (1996) Hemagglutination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Med Sci.* 58, 521-527 [in English].
- 7 Jaramillo L1, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. (2000) Purification and characterization of an adhesin from Pasteurella haemolytica. *Glycobiology.* 1, 31-37 [in English].
- 8 Ayalew S., Shrestha B., Montelongo M., Wilson A.E., Confer A.W. (2011) Immunogenicity of Mannheimia haemolytica recombinant outer membrane proteins serotype 1-specific antigen, OmpA, OmpP2, and OmpD15. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 2067–2074 [in English].