

Наличие антител к вирусу у супоросных и подсосных свиноматок свидетельствует о циркуляции данного возбудителя среди данных групп свиней. Учитывая доказанную возможность передачи вируса с молоком, не исключается возможность заражения поросят в период подсоса.

Учитывая имеющиеся сведения о возможности заражения человека гепатитом E от свиней, необходимо проведение широких исследований по установлению возможности циркуляции вируса гепатита E как среди людей, так и домашних свиней.

Список литературы

1. Age-related prevalence of hepatitis E virus in pigs and presence of the virus in slurry stores in the UK [Electronic resource] / Mc Creary [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 26.10.08.
2. Detection of hepatitis E virus (HEV) in samples of naturally infected pigs [Electronic resource] / De Deus [and etc] // Proceeding of the 19th IPVS Congress. – The Copenhagen, Denmark, 2006. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 16.07.06.
3. Epidemiology of hepatitis E virus (HEV) strains identified in Italian pigs affected by different pathological conditions [Electronic resource] / Martelli F [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 27.10.08.
4. Experimental infection of SPF pigs with hepatitis E virus (HEV) [Electronic resource] / Lombardi G [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 29.10.08.
5. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to finish farm [Electronic resource] / N. de Deus [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 27.10.08.
6. Molecular characterization and phylogenesis of swine hepatitis E virus (HEV) strains identified in Italy [Electronic resource] / Di Bartolo I [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 26.10.08.
7. Pigs orally inoculation with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels [Electronic resource] / M. Casas [and etc] // Proceeding of the 20th IPVS Congress. – The Durban, South Africa, 2008. – Mode of access: <http://www.ivis.org>. – Data of access: 26.10.08.
8. Route of transmission of swine hepatitis E in pigs / C. Kasornrorkbua [and etc] // Journal of Clinical virology. – 2004. – P. 5047-5052

VIRUS HEPATITIS E IN PIGS

Maksimovich V.V., Semenov V.M., Bagretsov V.F., Konotop D.S., Semenov S.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Up to date investigations concerning identification of virus hepatitis in pigs have been never carried out. For the first time serological investigations revealed seropositive animals to hepatitis E virus. Seroconversion to the HEV of sows indicates prevalence of the agent in the herd. Taking into consideration that the HEV poses a risk to humans we recommend more detailed research concerning circulation of the virus among humans and domestic animals.

УДК:619:578.825.15:57.08

ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ І ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ АКТИВНОСТІ КОНЦЕНТРОВАНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВРХ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОШКІРНОГО ВВЕДЕННЯ

Малакєєв А.С., Кучерявенко Р.О., Тризна Л.П., Кучерявенко Л.М.,
Малакєєва-Чебанюк І.В.

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

У статті представлені матеріали з розробки концентрованої інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби для внутрішньошкірної імунізації та випробування її антигенних властивостей у лабораторних умовах.

Інфекційний ринотрахеїт є однією з найбільш поширених вірусних інфекцій великої рогатої худоби в Україні. Складність, а нерідко безуспішність заходів боротьби та профілактики інфекційного ринотрахеїту обумовлені доволіною персистенцією вірусу в організмі перехворілого й навіть вакцинованого доголів'я великої рогатої худоби, а також особливостями імунітету та епізоотології [5].

У більшості країн світу в комплексі заходів боротьби та профілактики інфекційного ринотрахеїту основне місце займає вакцинація. Вона впливає на провідний регулятор епізоотичного процесу – імунітет у популяції сприйнятливих тварин.

На підставі зазначеного ведеться постійний пошук більш ефективних і безпечних вакцин і способів імунізації. Вирішення цих задач досягається за рахунок удосконалення технічних аспектів з напрацювання та збереження біомаси вірусу, методів очистки та концентрування, інактивації та оптимізації складу антигену, добору ефективних ад'ювантів [6].

Важливе значення при формуванні імунної відповіді до хвороби має спосіб імунізації. Традиційні способи внутрішньом'язового та підшкірного введення вакцини забезпечують створення системного імунітету, аерозольний – спочатку локального, а пізніше системного. Останнім часом приділяється особлива увага внутрішньошкірному способу вакцинації. Це пов'язано з морфологічними особливостями будови шкіри, яка виконує різні імунологічні функції, створюючи напружену імунну відповідь на введення мінімальних об'ємів вакцини [2, 3].

У зв'язку з зазначеним метою наших досліджень було створити інактивовану вакцину проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, оптимізувати об'єм і схеми введення біопрепарату.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на моделі штаму «Молдавський» вірусу інфекційного ринотрахеїту, біомасу якого накопичували культивуванням у моношарових культурах перещеплюваних клітин нирки вівці (НВ) та трахеї теляти (ТрТ), вирощених у ролерних флаконах ємністю 3000 см³. Інфекційність вихідної вірусомішуючої культуральної суспензії визначали за титруванням, для чого готували десятиразові робочі розведення, якими інфікували по 4 тест - об'єкти моношарової культури клітин у пробірках або у скляних флаконах (10-20) см³ з розрахунку на одне розведення. Специфічність культурального вірусу інфекційного ринотрахеїту підтверджували за результатами реакції нейтралізації з типоспецифічними сироватками за загальноприйнятим методом [4] та мікрометодом за стандартом МЕБ (Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines, 2000).

Вірус інактивували з використанням 0,1 % формальдегіду. Повноту інактивації перевіряли за результатами триразового послідовного пасажування досліджуваної культуральної суспензії вірусу в культурі перещеплюваних клітин.

В якості ад'юванта використовували масло Montanaide ISA 50, виробництва фірми Serric (Франція).

Антигенну активність дослідних серій вакцини для внутрішньошкірної імунізації проти інфекційного ринотрахеїту вивчали в лабораторних умовах на морських свинках.

Результати досліджень. При виготовленні вакцини була підібрана найбільш чутлива до вірусу культура перещеплюваних клітин, яка забезпечувала накопичення його біомаси з максимальною інфекційністю. З цією метою випробували дві лінії перещеплюваних клітин: нирки вівці (НВ) та трахеї теляти (ТрТ). За результатами цих досліджень встановлено, що культура клітин НВ більш чутлива до вірусу ІРТ. Вона забезпечувала накопичення вірусної сировини за ролерного культивування в бутлях ємністю 3000 см³ з титром інфекційності $8,0 \pm 0,4 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ у мінімальній об'ємі 50 см³ підтримуючого середовища (табл. 1). Використання більших об'ємів підтримуючого поживного середовища (100 і 150 мл) при культивуванні штаму «Молдавський» вірусу ІРТ зменшувало інфекційність вірусу (відповідно до $7,8 \pm 0,3 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ та $7,5 \pm 0,4 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$).

Таблиця 1 – Характеристика репродуктивної здатності вірусу ІРТ у культурі перещеплюваних клітин у ролерних умовах

Об'єм підтримуючого середовища, (см ³)	Заражаюча об'ємна доза, (см ³)*	Титр вірусу на культурах клітин, (lg ТЦД ₅₀ см ³)	
		НВ	ТрТ
150	1	7,5±0,4	7,0±0,03
100	1	7,8±0,3	7,5±0,12
50	1	8,0±0,04	7,5±0,07

Примітка: * – вихідна інфекційність штаму «Молдавський» - вірусу ІРТ – $8,0 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$

Як відомо, у виробництві інактивованих вакцин важливим етапом є інактивація вірусу, для чого нами було випробувано формальдегід у концентрації від 0,03 до 0,5 %, який вносили у вірусну суспензію, очищену центрифугуванням від клітинного детриту. Інактивацію вірусу здійснювали за кімнатної температури (20-22) °С і 37 °С (табл. 2).

Як свідчать наведені у таблиці 2 дані, з підвищенням концентрації формальдегіду й температури скорочувався термін інактивації вірусу. Впродовж кожних 24-ох годин титр інфекційності вірусу знижувався приблизно на $1,0-2,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, що вказувало на можливість знешкодження його інфекційності на 2-3 добу. Однак залишкова інфекційність вірусу виявлялась упродовж ще 4-5 діб, котра спостерігалась лише після 2-3 послідовних пасажів у культурі клітин досліджуваних проб інактивованого вірусу. З підвищенням температури від 20-22 до 37 °С значно скорочувались терміни інактивації та відповідно залишкової інфекційності. Так, якщо 0,3 % концентрація формальдегіду забезпечувала повну інактивацію вірусу за температури (20-22) °С через 144 години, то за температури 37 °С цей процес завершувався впродовж 96 годин. На підставі цього нами обрано 0,3 % формальдегід для інактивації штаму «Молдавський» вірусу ІРТ за температури 37 °С.

Таблиця 2 – Визначення оптимальної концентрації формальдегіду для інактивації вірусу ІРТ*

Температурний режим, (°С)	Концентрація формальдегіду, (%)	Залишкова інфекційність вірусу, $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ через годин.						
		24	48	79	96	120	144	168
20-22	0,03	4,7±0,05	3,2±0,05	2,15±0,4	1,75±0,03	1,0±0,1	0,65±0,02	+
	0,05	3,25±0,6	2,0±0,14	1,43±0,5	+	+	+	+
	0,1	2,58±0,12	1,25±0,02	+	+	+	-	-
	0,3	1,15±0,10	0,56±0,03	+	+	+	-	-
	0,5	0,6±0,03	+	+	+	-	-	-
37	0,03	2,3	1,8	+	+	+	+	-
	0,05	0,9	+	+	+	+	-	-
	0,1	0,65	+	+	+	+	-	-
	0,3	+	+	+	-	-	-	-
	0,5	+	+	-	-	-	-	-

Примітка: * - вихідна інфекційність штаму «Молдавський» – вірусу ІРТ – $8,0 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$
 + - наявність залишкової інфекційності,
 - - залишкова інфекційність відсутня.

У подальших дослідженнях зі створення інактивованої вакцини інактивовану біомасу вірусу змішували у співвідношенні 1:1 з масляним ад'ювантом Montanaide ISA 50, що має менш виражену кінематичну в'язкість порівняно з традиційними масляними ад'ювантами. При дослідженні реактогенності на морських свинках його рівень місцевих запальних реакцій не перевищував 10 %.

При емульгуванні культуральної суспензії інактивованого вірусу ІРТ і масляного ад'юванта отримано стійку дрібнодисперсну суміш, що легко перетікає за температури (5-10) °С і вводиться при ін'єкції.

Виготовлений зразок інактивованої емульсин-вакцини випробувано на морських свинках на антигенну активність за показниками гуморального імунітету. Його вводили морським свинкам інтраплантарно в дозі 0,2 смі. Контрольні групи цих тварин були

шеплені відповідно вакцинами «Рипавак» (проти ІРТ і парагрипу – 3) внутрішньом’язово в дозі 0,5 смі, «Комбовак» (проти ІРТ, ПГ-3, ВД, респіраторно–синтиціальної інфекції, рота-коронавірусних інфекцій) внутрішньом’язово в дозі 0,5 смі.

Встановлено, що дослідний зразок інактивованої вакцини на основі масляного ад’юванта для внутрішньошкірного введення викликав за інтраплантарного щеплення у морських свинок високу індукцію вірусспецифічних антитіл, титр яких на 28 добу становив $7,53 \pm 0,14 \log_2$, у той час як за імунізації вакцинами «Рипавак» і «Комбовак» він не перевищував $6,03 \pm 0,18 \log_2$ і $4,67 \pm 0,11 \log_2$ (таблиця 3).

Отже, результати вивчення дослідної інактивованої концентрованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту для внутрішньошкірного введення показали, що її антигенна активність перевищувала комерційні зразки на $(1,50 - 2,86) \log_2$.

Вивчення антигенної активності вакцини продовжили на морських свинках через 6 та 11 місяців. Через 6 місяців антигенна активність дослідного зразка вакцини залишалась незмінною, а через 11 місяців – знизилась на $1,2 \pm 0,18 \log_2$.

Таблиця 3 – Результати порівняльного вивчення антигенної активності дослідної і комерційних вакцин

Дослідні зразки вакцин	Терміни відбору (діб), (титри антитіл в РН, \log_2)		
	7	14	28
Дослідний зразок (для внутрішньошкірного застосування)	$4,54 \pm 0,12$	$6,83 \pm 0,12$	$7,53 \pm 0,14$
«Рипавак»	$3,0 \pm 0,14$	$6,0 \pm 0,14$	$6,03 \pm 0,18$
«Комбовак»	$2,1 \pm 0,12$	$4,55 \pm 0,12$	$4,67 \pm 0,11$
Інтактні тварини	0	0	0

Висновки: 1. Чутливою клітинною системою при ролерному способі культивування для отримання біомаси вірусу ІРТ для виготовлення вакцини є культура перещеплюваних клітин нирки вівці, в якій титр інфекційності складає $8,0 \pm 0,4 \lg \text{ТЦД}/_{50\text{см}}^3$.

2. Формалін у концентрації 0,3% формальдегіду забезпечує повну інактивацію вірусу ІРТ штаму “Молдавський” упродовж 96 годин за температури 37 °С.

3. Антигенна активність дослідної інактивованої концентрованої вакцини на основі масляного ад’юванта проти інфекційного ринотрахеїту для внутрішньошкірного застосування перевищує комерційні зразки на $(1,50 - 2,86) \log_2$ і становить $7,53 \log_2$.

Список літератури

1. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [Текст]: монография / А. Г. Глотов, [и др.] / Новосибирск.: 2006. – 12 с. 2. Безигольный способ введения биологических препаратов в организм [Текст]: монография / А. А. Воробьев, [и др.]; -М.: Медицина 1972. – 35с. 3. Чернуха, А. М. Кожа [Текст]: монография / А. М. Чернуха, Е.П. Флорова; – М.: Медицина, 1982. – 141-143.с. 4. Сюрин, В. Н. Руководство по ветеринарной вирусологии [Текст] / В.Н. Сюрин. – М.: – Колос, 1966. – 175 с. 5. Кучерявенко, Р. О. Інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби (епізоотологія, діагностика та специфічна профілактика): автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / Р.О. Кучерявенко; [Ін-т експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН]. – Х., 2003. – 20 с. 6. Стеценко, В.І. Дві тактики в стратегії профілактики гострих респіраторних вірусних захворювань молодняка великої рогатої худоби / В.І. Стеценко, Б.Т. Стегній, Р.О. Кучерявенко // Ветеринарна медицина. – 2008. – №91. – С. 476-477.

TECHNOLOGY OF PREPARATION AND STUDY OF ANTIGEN ACTIVITY OF CONCENTRATED INACTIVATED VACCINE AGAINST BOVINE INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS FOR INTRADERMAL INTRODUCTION

Malakeev A.S., Kucheryavenko R.A., Trizna L.P., Kucheryavenko L.N.,
Malakeeva-Chebanyuk I.V.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Data on the development of the technology of preparation of concentrated inactivated vaccine against bovine infectious rhinotracheitis for intradermal introduction and testing of its immunogenicity on laboratory animals is presented in the paper.