

3. Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of singlewalled carbon nanotubes on the biological properties of the cell cultures of human embryonic fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference «Science and Society» ISPC 2013,3:175—184.

УДК 619:615.371

## **ПОДБОР АДЬЮВАНТОВ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ПАСТЕРЕЛЛЕЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Красочко П.А., Красочко П.П., Иващенко И.А., Понаськов М.А.**

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

***Аннотация.** В статье приведены результаты исследования по подбору оптимальных адьювантов при конструировании поливалентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезов крупного рогатого скота на лабораторных животных. Установлено, что при разработке вакцины против вирусно-бактериальных инфекций молодняка крупного рогатого скота, более высокие показатели иммуногенности, отражающие стимулирование гуморального иммунного ответа, были получены при применении масляных депонирующих веществ Монтаниды ИЗА 61 (Montanidae, Seppic, Франция) в концентрации 15%.*

***Ключевые слова:** морские свинки, адьювант, респираторные инфекции, вакцина, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, рекомбинантный белок, респираторно-синцитиальный вирус, пастерелла.*

## **SELECTION OF ADJUVANTS IN THE DESIGN OF VACCINES AGAINST VIRAL RESPIRATORY INFECTIONS AND BOVINE PASTEURELLOSIS ON LABORATORY ANIMALS**

**Krasochko P.A., Ivashchenko I.A., Ponaskov M.A.**

EE “Vitebsk order “Badge of Honor”

State Academy Of Veterinary Medicine”, Vitebsk, Republic of Belarus

**Abstract.** *The article presents the results of research on the selection of optimal adjuvants in the design of polyvalent vaccine against infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, respiratory syncytial infection and bovine pasteuriosis in laboratory animals. It was found that during the development of vaccine against viral-bacterial infections of young cattle, higher immunogenicity indices reflecting stimulation of humoral immune response were obtained when using oil depositing substances of Montanidae IZA 201 (Montanidae, Seppic, France) at a concentration of 50%.*

**Keywords.** *Guinea pigs, adjuvant, respiratory infections, vaccine, infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, recombinant protein, respiratory syncytial virus, pasteurilla.*

**Введение.** Анализ структуры заболеваемости животных за последние несколько лет показал, что основной ущерб животноводству наносят так называемые факторные инфекции, поражающие преимущественно молодняк и проявляющиеся клинически диарейным и респираторным синдромами.

Общепринятой стройной концепции борьбы с факторными инфекциями пока нет. Однако многие исследователи сходятся во мнении, что основным звеном в системе мер борьбы с этой группой заболеваний должна быть специфическая профилактика. Вакцинация позволяет добиваться определенного уровня стадного иммунитета, снижающего циркуляцию возбудителя и защищающего конкретных животных [1].

Традиционная технология изготовления противовирусных вакцин включает в себя использование культуральных вирусов, накопленных на культуре клеток. Однако ряд вирусов имеют низкую активность и накапливаются на культуре клеток в невысоких титрах. Использование таких вирусов не позволяет получить высокоактивную вакцину. Поэтому для повышения антигенной активности биопрепаратов используются рекомбинантные антигены. Для этого в ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» совместно проведены исследования по конструированию рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синтициального вируса крупного рогатого скота путем создания новой плазмиды, несущей ген F1, кодирующий белок F1 вируса.

Полученные рекомбинантный штамм бактерий с геномом РС- вируса нами использован для конструирования и изготовления поливалентной инактивированной вакцины с антигенами вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и бактерий - *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* штаммы 1 и 2 и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синтициального вируса крупного рогатого скота [6]

Создание напряженного и продолжительного иммунитета при иммунизации КРС против вирусных болезней определяется состоянием организма животного, количеством и качеством антигена в препарате, способом вакцинации (доза, место введения и др.), а также зависит от правильности выбора и использования неспецифических стимуляторов иммуногенеза – адъювантов [2,3].

При повышенных дозах адъюванта может возникнуть иммуносупрессивное действие. При однократном введении антигена одновременно с адъювантами иммунный ответ по антителообразующим клеткам увеличивается в несколько раз, а по титру антител – даже на порядок [3].

Действие адъювантов зависит от исходного иммунного статуса, предшествующего вакцинации. Адъюванты меняют динамику развития иммунитета, они ускоряют развитие и повышают уровень иммунитета, увеличивают длительность сохранения иммунитета [4,5]

Поливалентные вакцины на основе масляных адъювантов широко используются для профилактики ряда инфекционных болезней животных уже долгое время. Эти адъюванты способствуют формированию напряженного и продолжительного иммунитета. Современные эмульсионные вакцины представляют собой иммунобиологические препараты, содержащие в большой концентрации цельные вирусы или бактерии в комбинации с масляным адъювантом, в большинстве случаев формирующим эмульсию обратного типа («вода-масло») [6].

Механизм их действия заключается в эмульгировании антигена в масляную оболочку путем образования «эмульсионного шарика». Для усиления иммунного ответа антиген должен находиться внутри капель воды, диспергированных в липидной фазе. Эмульсии освобождают антиген в течение более длительного времени, чем сорбированные вакцины, что может объяснить более напряженный и длительный иммунитет организма на вводимый антигенный компонент [7].

Выбор адъювантов для вакцины должен быть основан на анализе потенциального преимущества адъюванта для усиления иммуногенности вакцины, соотнесенного с риском индигирования местных и системных реакций [8].

**Цель исследования** – подбор оптимальных адъювантов при конструировании поливалентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезом крупного рогатого скота.

**Материалы и методы исследования.** Инактивированную вакцину с различными адъювантами изготавливали в ОАО «БелВитунифарм», используя

штаммы вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синтициального вируса крупного рогатого скота и бактерии *M. haemolytica* и *P. Multocida*.

Для инактивации в специально оттитрованную вирусосодержащую жидкость с титром 6,5-7,0 lg ТЦД 50/мл, выращенную в роллерных флаконах, использовали разведения формалина разведениях (от 0,1 до 0,5%). Перед внесением инактиванта вирусу суспензию нагревали до 37°C и вносили в нее инактивант до необходимой концентрации. Инактивацию проводили при температуре 37°C, pH 7,5–7,8 в течение 24 ч.

Для нейтрализации формалина в суспензию инактивированного и охлажденного вируса добавляли 1М раствор тиосульфата натрия из расчета 10% к объему использованного инактиванта.

Вакцину готовили по ранее разработанной схеме. Вакцина содержит авирулентные инактивированные формальдегидом штаммы вирусов инфекционного ринотрахеита (ИРТ-ВБФ-ВГАВМ №404), диареи (ВД-ВБФ-ВГАВМ №406), парагриппа-3 (ПГ-ВБФ-ВГАВМ №403), штамм *Escherichia coli* – продуцент белка F1 респираторно-синтициального вируса крупного рогатого скота, *M. haemolytica* и *P. multocida* (тип А и В), рекомбинантный штамм кишечной палочки с геномом РС-вируса, масляный адьювант.

Для изготовления образцов вакцины с различными адьювантами использовали масляный адьювант Montanidae ISA 201 (Montanidae, Seppic, France) в 50% концентрации и Montanidae ISA 61 в 15% концентрации (Montanidae, Seppic, France).

Исследования по подбору адьюванта вакцины «Пастевир - Р» против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синтициальной инфекции и пастереллезом осуществляли в клинике кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней и отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины.

Для изучения иммунного ответа у лабораторных животных использовали беспородных морских свинок обоего пола массой 250-300 г. По принципу групп-аналогов было сформировано пять групп морских свинок, по 5 животных в каждой.

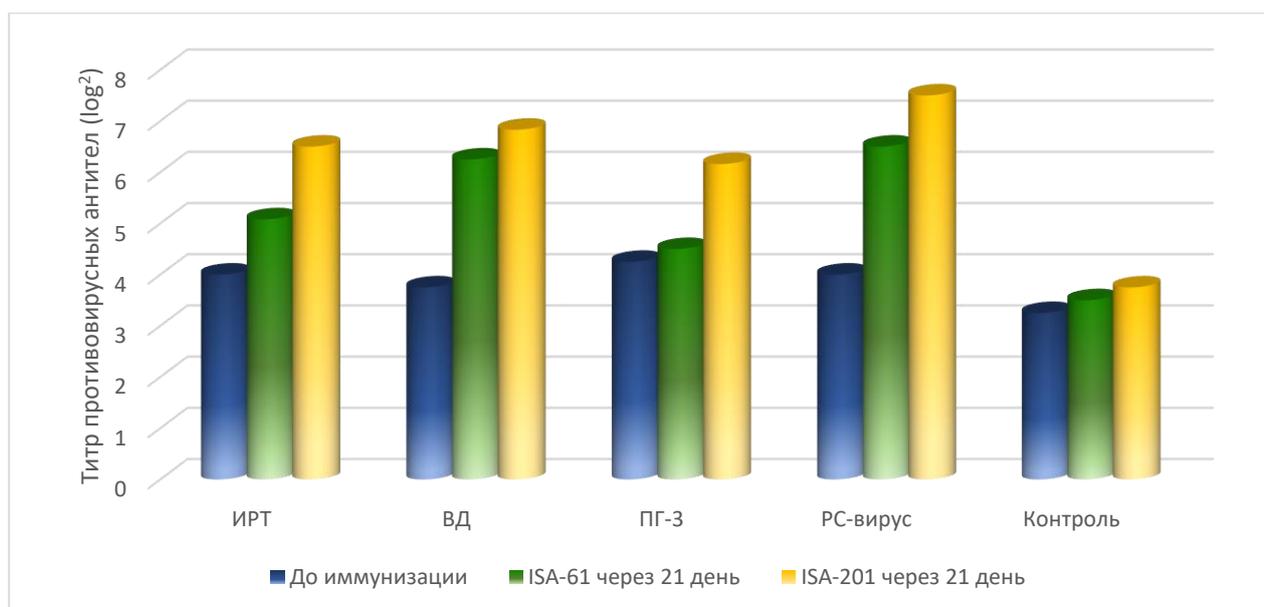
Во время эксперимента морских свинок размещали в отдельных одноярусных клетках с верхней стенкой из проволочной сетки, снабженных поилками. Наблюдения за животными опытных групп проводили ежедневно, учитывали их внешний вид, общее состояние, двигательная активность, состояние шерстного покрова и видимых слизистых оболочек, реакцию на внешние раздражители, поедаемость корма, отношение к воде, подвижность и

ритм дыхания, выживаемость. Все лабораторные животные содержались в одинаковых условиях, со свободным доступом к корму и воде. Перед началом исследований все животные в течение трёх суток были выдержаны с целью адаптации в клетке. За время адаптации ежедневно учитывалось общее состояние, реакция на внешние раздражители, прием корма и воды. Морским свинкам первой опытной группы вводили внутримышечно во внутреннюю поверхность бедра двукратно, с интервалом в 14 дней образцы опытной поливалентной вакцины «Пастевир-Р» с адьювантом ISA-61 в объёме 0,5 мл, второй - образцы опытной поливалентной вакцины с адьювантом ISA-201 в объёме 0,5 мл, третьей - образцы опытной поливалентной вакцины с адьювантом ISA-61 в объёме 1,0 мл, четвертой - образцы опытной поливалентной вакцины с адьювантом ISA-201 в объёме 1,0 мл. Животным контрольной группы вводили плацебо. Для исследования поствакцинального иммунитета осуществим взятие проб сыворотки крови до и на 21 день после второго введения вакцины. В пробах сыворотки крови определяли титр противовирусных антител в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с эритроцитарными диагностикумами, содержащими антигены вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ по общепринятой методике, антибактериальных – в реакции агглютинации (РА).

Статистическую обработку проводили с использованием персонального компьютера и программы Excel.

**Результаты исследований.** При введении морским свинкам опытных групп образцов вакцины «Пастевир-Р» с различными адьювантами, установлен прирост специфических антител к используемым вакцинным агентам. При клиническом обследовании животные всех групп во время опыта были клинически здоровы.

Результаты поствакцинальных противовирусных антител при подборе оптимального адьюванта при конструировании поливалентной инактивированной вакцины «Пастевир-Р» против инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, *M. haemolytica* и *P. multocida* (тип А и В) показаны на рисунке 1.

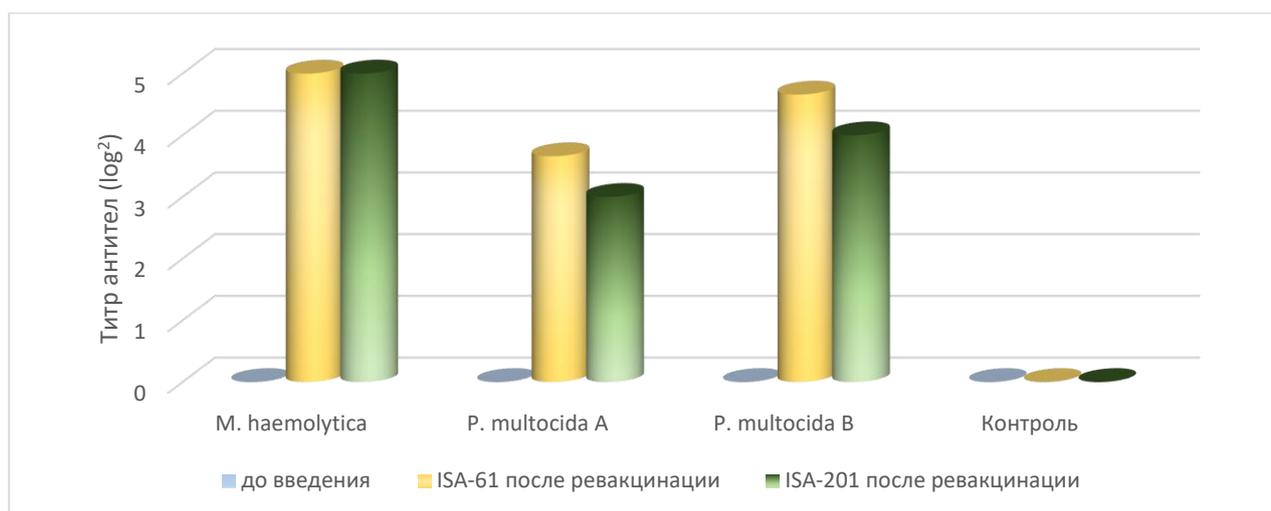


**Рис 1. – Титры поствакцинальных противовирусных антител у морских свинок при введении вакцины «Пастевир-Р» с различными адьювантами**

При применении масляного адьюванта ISA-61, получено повышение титра антител в сыворотках крови морских свинок к вирусу инфекционного ринотрахеита до значения  $5,08 \pm 0,41 \log_2$ , к вирусу диареи -  $6,25 \pm 0,25 \log_2$ , к вирусу парагриппа-3 –  $4,5 \pm 0,29 \log_2$ , к вирусу респираторно-синцитиальной инфекции  $6,5 \pm 0,65 \log_2$ .

При использовании масляного адьюванта ISA-201 получен результат повышения титра антител  $6,5 \pm 0,5 \log_2$  к вирусу инфекционного ринотрахеита,  $6,83 \pm 0,48 \log_2$  к вирусу диареи,  $6,16 \pm 0,48 \log_2$  к вирусу парагриппа-3 и  $7,5 \pm 0,34 \log_2$  к вирусу респираторно-синцитиальной инфекции.

Результаты поствакцинальных антибактериальных антител при подборе оптимального адьюванта при конструировании поливалентной инактивированной вакцины «Пастевир-Р» против инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, *M. haemolytica* и *P. multocida* (тип А и В) показаны на рисунке 2.



**Рис. 2 - Титры антибактериальных антител у телят при введении вакцины «Пастевир-Р» против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезов с различными адьювантами**

При использовании масляного адьюванта ISA-61 получено повышение уровня титра антибактериальных антител в сыворотках крови морских свинок до значений  $5,0 \pm 0,00 \log_2$  к *Mannheimia haemolytica*,  $3,66 \pm 1,67 \log_2$  к *Pasteurella multocida A*,  $4,66 \pm 1,33 \log_2$  к *Pasteurella multocida B*.

При применении масляного адьюванта ISA-201 наблюдалось повышение уровня антибактериальных антител в сыворотках крови морских свинок опытных групп к *Mannheimia haemolytica* до  $5,0 \pm 0,00 \log_2$ , к *Pasteurella multocida A* до  $3,0 \pm 0,41 \log_2$ , к *Pasteurella multocida B* до  $4,00 \pm 0,55 \log_2$ .

**Заключение.** Анализируя полученные данные при проведении серологических исследований сывороток крови морских свинок, иммунизированных вакциной «Пастевир-Р» против инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, *M. haemolytica* и *P. multocida* (тип А и В), установлено, что все исследуемые адьюванты оказывают положительное влияние на синтез специфических антител.

При подборе оптимального адьюванта при изготовлении вакцины «Пастевир-Р» более высокие показатели иммуногенности были получены при применении масляного адьюванта Montanidae ISA 61 (Montanidae, Seppic, France) в 15% концентрации. Общих и местных изменений в клиническом состоянии, аллергических реакций не выявлено. На протяжении всего опыта животные сохраняли активность и аппетит, болезненность и воспалительных реакций на месте введения образцов вакцины не наблюдалось.

## Список использованной литературы

1. Красочко, П. Специфическая профилактика вирусных энтеритов телят / П. Красочко, М. Понаськов // *Ветеринарное дело (Минск)*. – 2019. – № 7. – С. 22-25. – EDN SUUYSI. Русалеев, В. С. Вакцинопрофилактика бактериальных факторных болезней сельскохозяйственных животных / В. С. Русалеев, В. М. Гневашев, О. В. Прунтова // *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. – 2005. – Т. 3. – С. 219-222.
2. Красочко, П. А. Современные подходы к специфической профилактике вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота / П. А. Красочко, И. А. Красочко, С. Л. Борознов // *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. – 2008. – Т. 6. – С. 243-251. – EDN MOUHVZ.
3. Медуницын, Н.В. Вакцинология. Изд. 2-е, перераб. и доп. / Н.В. Медуницын – М.: Триада-Х, 2004. – 448 с.
4. Михалишин, В.В. Адъюванты и их использование / В.В. Михалишин, Н.С. Мамков // *Тр. Федерального центра охраны здоровья животных*. – Владимир, 2008. – Т. 6. – С. 340-371
5. Addition of saponin to double oil emulsion FMD vaccines enhances specific antibody responses in cattle and pigs / E. Smitsaart, A.M. Espinoza, R. Sanguinetti [et al.] // *Europ. Commiss. Control FMD. Sess. Res. Group Stand. Techn. Comm.* – Chania, Grete, 2004. – P. 344-351.
6. Singh, M. Advances in vaccine adjuvants / M. Singh, D. O'Hagan // *Nature Bio.* – 1999. – Vol. 17. – P. 1075-1081..
7. Красочко П.А. Современные подходы к классификации иммуномодуляторов. *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария*. - 2006. - № 2. - С. 35-40.
8. Красочко П.А. и др. Адъюванты при конструировании ассоциированных вакцин против инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота // *Ветеринарна бютехнолопя*. - 2019. - № 35. - С. 90-99.
9. Специфическая профилактика вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота / П. А. Красочко, Ю. В. Ломако, И. А. Красочко [и др.] // *Ветеринарная наука - производству*. – 2005. – № 38. – С. 302-305. – EDN YOQSMZ. Scherlie R. Delivery of antigens used for vaccination: recent advances and challenges / Regina Scherlie // *Therapeutic Delivery*. - 2012. - Vol.2, № 10. - P.1351-1368.