

ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ «ПАСТЕВИР-Р»**Красочко П.А., Красочко П.П., Иващенко И.А.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*Цель исследования – изучить иммуногенность образцов вакцины для профилактики респираторных болезней телят с оптимальным соотношением компонентов на лабораторных животных. В статье приведены результаты исследования иммунного ответа у лабораторных животных на введение поливалентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, пастереллезов крупного рогатого скота с рекомбинантным белком – антигена респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. Установлено, что более выраженный иммунный ответ у морских свинок наблюдается в ответ на введение образца вакцины «Пастевир-Р» в дозе 1,0 см³ с адъювантом Монтаниды ИЗА 61 (Montanidae, Seppic, Франция) в концентрации 15 %. **Ключевые слова:** морские свинки, иммунный ответ, антигена, респираторные инфекции, вакцина, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, рекомбинантный белок, респираторно-синцитиальный вирус, пастерелла.*

IMMUNE RESPONSE IN LABORATORY ANIMALS DURING IMMUNIZATION WITH VIRAL-BACTERIAL VACCINE «PASTEVI-R»**Krasochko P. A., Krasochko P. P., Ivashchenko I. A.**

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

*The article presents the results of the study of immune response in laboratory animals to the administration of polyvalent vaccine against infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, bovine pasteuriosis with recombinant protein - antigen of respiratory syncytial infection of cattle. It was found that a more pronounced immune response in guinea pigs was observed in response to the administration of a sample of vaccine Pastevir-P at a dose of 1,0 cm³ with adjuvant Montanidae ISA 61 (Montanidae, Seppic, France) at a concentration of 15 %. **Keywords:** guinea pigs, immune response, antibodies, 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.

В структуре заболеваний крупного рогатого скота инфекции молодняка вирусной этиологии занимают одно из ведущих мест. При традиционной технологии ведения скотоводства на долю этих болезней приходится 34,1–47 %, а при промышленной – свыше 60 % всех случаев заболевания молодняка. Проведенными ранее исследованиями установлено, что у коров инфекционный ринотрахеит встречается у 61–65 % обследованных животных, вирусная диарея – у 80–85 %, ротавирусная инфекция – у 75–80 %, респираторно-синцитиальная инфекция – у 45–55 %, коронавирусная инфекция – у 65–70 %, парагрипп-3 – у 65–74 % телят [1]. При этом в основном заболевания протекают в виде ассоциаций, течение которых более тяжелое.

Основным клиническим признаком инфекций молодняка вирусной этиологии является нарушение функции кишечника (дисбактериоз), приводящее в дальнейшем к обезвоживанию организма и, как следствие, нарушению сердечной деятельности и летальному исходу [2, 3].

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 [4].

Вакцинация в настоящее время – один из основных приемов повышения сохранности животных [5]. Одним из наиболее важных и ответственных этапов при изготовлении вакцин является накопление вирусов. Однако не все вирусы накапливаются в высоких титрах в культуре клеток. В этой связи для повышения накопления вирусов в последние годы используются генно-инженерные технологии [6]. Генно-инженерные (рекомбинантные) вакцины получают путем введения генов, кодирующих основные антигены патогенов вирусов, в геном микроорганизмов-реципиентов. По сравнению с обычными вакцинами эти вакцины безопасны для введения, не реплицируются, просты в производстве, экономичны и не имеют вредного воздействия из-за нежелательных антигенных материалов.

Традиционная технология изготовления противовирусных вакцин включает в себя использование культуральных вирусов, накопленных на культуре клеток. Однако ряд вирусов имеет низкую активность и накапливается 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-синцитиального вируса крупного рогатого скота путем создания новой плазмиды, несущей ген F1, кодирующий белок F1 вируса.

Полученный 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-синцитиального вируса крупного рогатого скота [7, 8].

Цель исследования – изучить иммуногенность образцов вакцины для профилактики респираторных болезней телят с оптимальным соотношением компонентов на лабораторных животных.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ совместно с ОАО «БелВитунифарм».

При конструировании новой вирусно-бактериальной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезом молодняка крупного рогатого скота использовали следующие авирулентные штаммы вирусов: инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, рекомбинантный штамм кишечной палочки с геномом РС-вируса, штаммы *P. multocida* и *M. haemolytica*.

Накопление авирулентных вакцинных штаммов вирусов проводили с использованием общепринятых вирусологических методов на культуре клеток MDBK (клеток монослоя почек быка). Основанием для их подбора служила иммуногенная активность штаммов.

Для инактивации вирусов компонентов, конструируемой вирус-вакцины были использованы следующие инактиваны – формалин в 0,3 % и теотропин в 0,3 % концентрации. Накопление *M. haemolytica* и *P. multocida* проводили на бульоне Хоттингена. Для инактивации *M. haemolytica* и *P. Multocida* также использовали формалин и теотропин в тех же концентрациях.

При подборе оптимального соотношения компонентов разрабатываемой ассоциированной вирусно-бактериальной вакцины были использованы результаты ранее проведенных исследований Красочко П.А. и др. (2001-2023 гг.), а также результаты собственных исследований.

Так, согласно проведенным ранее исследованиям, оптимальным соотношением компонентов вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3 и РС-вируса является соотношение 1:1:1:1. При этом титр вирусов должен составлять 5,0-5,5 lg ТЦД 50/мл.

В 2 вариантах нами проводилась замена культурального РС вируса рекомбинантным штаммом кишечной палочки - продуцентом белка F1 респираторно-синцитиального вируса

M. haemolytica и *P. multocida* вводились в концентрации 5,0 млрд микробных тел в 1 мл из расчета, что каждого штамма будет в количестве 1,5 млрд в 1 мл. Для этого было взято по 0,33 мл каждого бактериального штамма и внесено в вакцину 1 мл.

В качестве адъювантов нами использованы адъюванты: Монтаниды ИЗА 61 в 15 % концентрации и ИЗА 201 в 50 % концентрации.

В этой связи нами теоретически предположено, что в 5,0 мл вакцины (без адъюванта) на 4 вируса будет приходиться 4,26 мл вирусов, т.е. на каждый компонент должно приходиться 0,71 мл каждого вируса.

Составлены следующие варианты вакцины с разными соотношениями вирусов (таблица 1).

Таблица 1 – Схема подбора соотношений вирусов ассоциированной вирусно-бактериальной вакцины (мл)

Варианты вакцины	ИРТ	ВД	ПГ-3	РС-вирус	Рекомбинантный штамм РС-вируса	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. Multocida</i> (тип А)	<i>P. Multocida</i> (тип В)	Адъювант
Адъювант ИЗА 61									
№1	81	81	81	81	-	33	33	33	77
№2	108	108	108	-	33	33	33	33	77
Адъювант ИЗА 201									
№3	38	38	38	38	-	33	33	33	251
№4	39	39	39	-	33	33	33	33	251

Примечания: концентрация бактерий – 3,0 млрд микробных тел в 1 мл. Титр вирусов - 4,5-6,0 lg ТЦД 50/мл. После соединения монокомпонентов и добавления адъювантов итоговый объем вакцины составил 5,0 мл.

Инактивированную вакцину с различными адъювантами изготавливали в ОАО «БелВитунифарм», используя штаммы вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3,

респираторно-синцитиальной инфекции, бактерии *M. haemolytica* и *P. multocida* и рекомбинантный штамм кишечной палочки - продуцент белка F1 респираторно-синцитиального вируса.

Для инактивации в специально оттитрованную вирусосодержащую жидкость с титром 6,5-7,0 Ig ТЦД 50/мл, выращенную в роллерных флаконах, использовали разведения формалина (от 0,1 до 0,5 %). Перед внесением инактиванта вирусную суспензию нагревали до 37°C и вносили в нее инактивант до необходимой концентрации. Инактивацию проводили при температуре 37 °С, рН 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.

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

Исследования иммуногенности образцов вакцины «Пастевир-Р» для профилактики респираторных болезней телят с оптимальным соотношением компонентов против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезов 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 три группы 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, двигательную 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 трех 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 адъювантом ISA-61 в объеме 0,5 мл, второй - образцы опытной поливалентной вакцины с адъювантом ISA-201. Животным контрольной группы вводили плацебо. Для исследования поствакцинального иммунитета осуществляли 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» 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 конструировании поливалентной инактивированной вакцины «Пастевир-Р» против инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, *M. haemolytica* и *P. multocida* (тип А и В) с рекомбинантным штаммом кишечной палочки с геномом РС-вируса показаны в таблице 2.

Таблица 2 – Титр противовирусных антител у морских свинок при введении разработанной вирус-вакцины

Сроки взятия крови	Группа животных	Титр антител (\log_2)			
		ИРТ	ВД	ПГ-3	РС
До иммунизации	ОГ 1	3,25±0,25	3,0±0,00	3,5±0,29	4,0±0,41
	ОГ 2	4,25±0,25	3,75±0,48	4,5±0,65	5,0±0,41
	ОГ 3	4,5±0,29	4,0±0,58	4,5±0,29	4,25±0,48
	ОГ 4	3,75±0,25	4,5±0,5	4,25±0,48	3,5±0,29
	КГ	4,0±0,0	3,75±0,25	4,25±0,25	4,0±0,41
Через 21 день	ОГ 1	5,08±0,41	6,25±0,25	4,5±0,29	6,5±0,65
	ОГ 2	6,5±0,5	6,83±0,48	6,16±0,48	7,5±0,34
	ОГ 3	5,5±0,29	6,25±0,48	5,75±0,25	7,75±0,25
	ОГ 4	5,75±0,25	5,5±0,29	5,75±0,25	6,25±0,25
	КГ	3,75±0,48	3,5±0,5	4,75±0,25	4,25±0,48

При изучении иммунного ответа на введение вакцины «Пастевир-Р» с оптимальным соотношением компонентов получено повышение титра антител в сыворотках крови морских свинок к вирусу инфекционного ринотрахеита до значения $6,5 \pm 0,5 \log_2$, к вирусу диареи - $6,83 \pm 0,48 \log_2$, к вирусу парагриппа-3 – $6,16 \pm 0,48 \log_2$, к вирусу респираторно-синцитиальной инфекции - $7,75 \pm 0,25 \log_2$.

Результаты поствакцинальных антибактериальных антител 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) с рекомбинантным штаммом кишечной палочки с геномом РС-вируса показаны в таблице 3.

Таблица 3 – Титр антибактериальных антител у морских свинок в ответ на введение вакцины «Пастевир – Р»

Сроки взятия крови	Группа животных	Титр антител (\log_2)		
		<i>P. multocida</i> тип А	<i>P. multocida</i> тип В	<i>M. haemolytica</i>
До иммунизации	ОГ 1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	ОГ 2	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	ОГ 3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	ОГ 4	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	КГ	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Через 21 день	ОГ 1	1,66±1,67	3,0±0,00	5,0±0,00
	ОГ 2	2,8±0,86	4,0±0,55	5,0±0,00
	ОГ 3	3,66±1,67	4,66±1,33	5,0±1,00
	ОГ 4	3,0±0,41	3,25±0,48	5,0±0,41
	КГ	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

При изучении иммунного ответа на введение вакцины «Пастевир-Р» с оптимальным соотношением компонентов получено повышение титра антибактериальных антител в сыворотках крови морских свинок к *Mannheimia haemolytica* до значения $5,0 \pm 0,00 \log_2$ к *Pasteurella multocida* тип А до $3,66 \pm 1,67 \log_2$ к *Pasteurella multocida* тип В до $4,66 \pm 1,33 \log_2$.

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) с рекомбинантным штаммом кишечной палочки с геномом РС-вируса, установлено, что все исследуемые образцы оказывают положительное влияние на синтез специфических антител.

Более высокие показатели иммуногенности были получены при применении вакцины «Пастевир-Р» с масляным адъювантом Montanidae ISA 61 (Montanidae, Seppic, France) в 15 % концентрации в дозе 1 см³.

Литература. 1. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко. – Щелково, 2009. – 439 с. 2. Красочко, П. А. Иммуностимуляторы и современные способы коррекции иммунного ответа / П. А. Красочко, В. А. Машеро // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. - 2004. - № 1. - С. 32-36. 3. Ламан, А. М. Современные аспекты специфической профилактики вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов телят крупного рогатого скота / А. М. Ламан, Г. А. Тумилович // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сборник научных статей по материалам XXI Международной научно-практической конференции, г. Гродно, 18 мая 2018 г. – Гродно : ГГАУ, 2018. – С. 52–56. 4. Русалеев, В. С. Вакцинопрофилактика бактериальных факторных болезней сельскохозяйственных животных / В. С. Русалеев, В. М. Гневашеев, О. В. Прунтова // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2005. – Т. 3. – С. 219-222. 5. Бурова, О. А. Системный подход к разработке методов профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / О. А. Бурова, А. А. Блохин // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2017. – № 2 (57). – С. 46–50. 6. Gay, C. G. Genomics and vaccine development / C. G. Gay // Rev. Sci. Tech. – 2007. – Vol. 26, №1. – P. 49-67. 7. Современные подходы к разработке и изготовлению вакцин для животных / П. А. Красочко, П. П. Красочко, А. И. Зинченко [и др.] // Продовольственная безопасность в агропромышленном комплексе : материалы IV Международной научно-практической конференции, Тирасполь, 23 ноября 2023 года. – Тирасполь: Приднестровский государственный университет им. Т. Г. Шевченко, 2024. – С. 165-169. – EDN NCQTAP. 8. 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.

Поступила в редакцию 09.10.2024.