

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ГУЛЯНИЧ МИРОСЛАВА МИХАЙЛІВНА

УДК 619:615.37:616.98

**НАУКОВО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ
ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, доцент
Недосєков Віталій Володимирович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри епізоотології
та організації ветеринарної справи

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Галатюк Олександр Євстафійович,
Житомирський національний
агроєкологічний університет,
завідувач кафедри мікробіології, вірусології
та епізоотології

доктор ветеринарних наук, професор
Кассіч Володимир Юрійович,
Сумський національний аграрний університет,
завідувач кафедри епізоотології та паразитології

Захист відбудеться «30» листопада 2017 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано « » жовтня 2017 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби завдає значних втрат галузі і поширений в усіх країнах з розвинутим скотарством (Graham D. A., 2013; Raaperi K., 2014; Fulton R. W., 2015). Ряду країн Європи (Австрія, Данія, Фінляндія, Швеція, Норвегія) вдалося викоринити це захворювання. Успішно діють національні програми з контролю та ерадикації інфекційного ринотрахеїту в Німеччині та Італії, де окремі регіони вже вважаються вільними від цієї інфекції (OIE Terrestrial Manual, 2016).

Україна є стаціонарно неблагополучною щодо інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (Кучерявенко Р. О., 2003; Волосянко О. В., 2003; Малакєєв А. С., 2013). Для інтенсифікації галузі скотарства необхідним є благополуччя господарств, що можливо забезпечити через обов'язкове дотримання загальних ветеринарно-санітарних правил та імунопрофілактичних заходів. У той самий час вакцинопрофілактика є основним заходом для контролю та ерадикації хвороби в усьому світі (Raaperi K., 2014; OIE Terrestrial Manual, 2016).

В Україні проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби використовують ряд вакцин іноземного виробництва. Водночас з позиції імпортозаміщення в сучасних умовах важливим є розроблення вітчизняної промислової технології виготовлення вакцини.

Раніше було розроблено вакцини для профілактики інфекційного ринотрахеїту, однак вони не знайшли широкого практичного застосування. Крім того, під час конструювання таких вакцин було використано вірус інфекційного ринотрахеїту, штам «Молдавський», який виділено ще за часів СРСР, а як інактивант – формальдегід, який є кумулятивним канцерогеном, тому ветеринарна медицина потребує розроблення ефективної вітчизняної технології виробництва високоімуногенного вакцинного препарату проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

Отже, вирішення питання науково-експериментального обґрунтування виготовлення вітчизняної інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби є актуальним і має суттєве значення для подальшого розвитку галузі та продовольчої і біологічної безпеки України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною наукових досліджень, виконаних згідно з тематичним планом кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України «Розробка методології епізоотологічного моніторингу особливо небезпечних та емерджентних хвороб тварин» (номер державної реєстрації 0115U003457, 2015–2016 рр.) та в рамках ініціативної наукової тематики «Розробка технології виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби» (номер державної реєстрації 0117U001096, 2017–2019 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – науково-експериментальне обґрунтування виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

Для досягнення зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

- оптимізувати умови отримання вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, штам «ВМ»;
- розробити спосіб імунізації кролів для отримання гіперімунної сироватки, з метою подальшого контролю розробленого вакцинного препарату;
- підібрати оптимальні інактивант та ад'ювант для конструювання вакцинного препарату;
- дослідити нешкідливість і якість дослідних серій вакцини та визначити термін придатності розробленого вакцинного препарату;
- визначити імуногенну ефективність розробленої вакцини;
- дослідити колостральний імунітет після вакцинації розробленою вакциною.

Об'єкт дослідження – технологія виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

Предмет дослідження – культуральні властивості вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, гіперімунні сироватки крові, інактивуючі та ад'ювантні властивості речовин, нешкідливість та якість вакцини, імунобіологічні властивості вакцини, поствакцинальний та колостральний імунітет.

Методи дослідження: епізоотологічні (епізоотологічний аналіз); вірусологічні (розмноження культур клітин, розмноження вірусу, дослідження інфекційної активності вірусу); бактеріологічні (бактеріальна та грибна контамінація); серологічні (дослідження рівня антитіл в сироватках); клінічні (спостереження за дослідними тваринами після вакцинації, вимірювання температури, дослідження нешкідливості вакцини) і статистичні (математична обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, штаму «ВМ», адаптований до репродукції в клітинній системі. Визначено оптимальні умови культивування вірусу ($8,63 \pm 0,12 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$) та імуногенність вірусомісного матеріалу ($9,0 \pm 0,13 \text{ log}_2$), що підтверджує його придатність для виготовлення вакцини.

Розроблено спосіб імунізації кролів для отримання гіперімунної сироватки крові до вірусу інфекційного ринотрахеїту, який відрізняється трьохкратним введенням із поступовим збільшенням дози концентрованого вірусу, що дає змогу отримати гіперімунні сироватки ($10,04 \text{ log}_2$) на 26 добу від початку імунізації.

Вперше в Україні для виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту було використано етиленімін (в кінцевій концентрації 0,01 %) в якості інактиванту та суміш високоочищеної мінеральної олії та аеросилу в якості ад'юванту, що дозволило виготовити вакцину з високою імуногенною активністю (рівень антитіл через 9 місяців після вакцинації та ревакцинації на рівні $8,0\text{--}8,2 \text{ log}_2$).

Вперше в Україні проведено дослідження колострального імунітету у телят після імунізації корів інактивованою вакциною проти інфекційного ринотрахеїту. Показано ефективність вакцини в утворенні колострального

імунітету в новонароджених телят (за умови вакцинації корів на 7–8 місяцях тільності та своєчасного випоювання телятам молозива, рівень антитіл в сироватках крові телят становив в середньому $3,07 \pm 0,07 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{cm}^3$).

Вперше науково-експериментально обґрунтовано та розроблено технологію виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, яка відрізняється від аналогів використанням вірусу інфекційного ринотрахеїту, штаму «ВМ», накопиченням вірусу в культурі клітин MDBK, використанням етиленіміну (інактивант) та високоочищеної мінеральної олії в суміші з аеросилом (ад'ювант).

Практичне значення одержаних результатів. За результатами дослідження науково-експериментально обґрунтовано та розроблено технологію виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби із застосуванням моношарової культури перещеплюваних клітин MDBK, штаму «ВМ» вірусу інфекційного ринотрахеїту, його інактивації за допомогою етиленіміну в кінцевій концентрації 0,01 % впродовж 24 год, та інноваційної суміші високоочищеної мінеральної олії з аеросилом в якості ад'юванту, яку рекомендуємо використовувати для виробництва інактивованої вакцини біопідприємствами України відповідно до розробленого проекту досьє.

Розроблена технологія виготовлення вакцини може слугувати основою для подальшого розроблення полівалентних вакцин проти інфекційних хвороб великої рогатої худоби.

Виготовлену за розробленою технологією вакцину випробувано та впроваджено в ПСП «Шевченківське».

Основні положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно здійснено літературний пошук та аналіз даних літератури. Виконано самостійно експериментальні дослідження, проведено первинний аналіз отриманих даних і зроблено попередні висновки. Спільно з науковим керівником було визначено мету, завдання роботи та способи їх вирішення, інтерпретовані результати та сформульовано висновки.

Щиру вдячність висловлюємо за надану можливість проведення досліджень Ю. А. Собку та І. О. Собко. За допомогу в проведенні експериментальних досліджень та науково-консультативну допомогу автор висловлює подяку кандидату ветеринарних наук Ф. С. Вабіщевичу та кандидату ветеринарних наук О. В. Годовському. Автор висловлює глибоку подяку кандидату ветеринарних наук В. І. Білоконю за допомогу у проведенні досліджень пов'язаних з цільовими тваринами.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались, обговорювались та отримали позитивну оцінку на: II Міжнародній науково-практичній конференції «Нові завдання сучасної медицини» (м. Львів, 2015 р.); II Міжнародній науковій конференції студентів ветеринарної медицини «Non sibi, sed omnibus – not for themselves, but for

everybody» (м. Варшава, Республіка Польща, 2016 р.); XV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2016 р.); міжвузівській науково-практичній конференції викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи» (м. Дніпропетровськ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту, науку, виробництво» (м. Київ, 2016 р.); VIII Міжнародній конференції «Bioresources and viruses» (м. Київ, 2016 р.); XIV Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Бровари, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні хвороби тварин: актуальні аспекти біологічної безпеки та контролю» (м. Одеса, 2017 р.); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, 2 статті в інших виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 7 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 145 сторінках комп'ютерного тексту та складається з анотацій, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Список використаної літератури налічує 195 джерел, у тому числі 81 латиницею. Дисертаційну роботу ілюстровано 18 таблицями та 6 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана впродовж 2014–2017 років на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Окремі дослідження виконано на базі лабораторій Департаменту з наукової роботи та Департаменту контролю якості ТОВ «Біотестлаб» (м. Київ), лабораторії серології ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» (м. Київ), віварію ТОВ «Біотестлаб» (м. Київ) та ПСП «Шевченківське» (с. Гореничі Київської області).

Під час роботи з дослідними тваринами керувалися вимогами Конвенції Ради Європи, щодо захисту тварин (Страсбург, 1985 р.), вимогами Міжнародного комітету по науці та згідно вимог статті 26 закону України про захист тварин від жорстокого поводження.

Матеріалом для дослідження були корови (n=87), телята (n=114), кролі (n=94), білі миші (n=30) та перещеплювані клітинні культури.

Для аналізу поширення інфекційного ринотрахеїту в Україні було використано статистичні дані МЕБ та результати спільних з ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» ПЛР досліджень зразків отриманих від поголів'я худоби.

На *першому етапі* досліджень здійснювали підбір оптимальних параметрів культивування вірусу:

– вибір технологічно перспективної культури клітин. Досліджено перещеплювані клітинні лінії різного походження: MDBK – нирка теляти, TrT – трахея теляти, КСТ – коронарні судини теляти, НВ – нирка вівці, ST – нирка свині, РК-13 – нирка кроля, RCC – рогівка ока кроля, ВНК-21 – нирка сирійського хом'яка, Vero – нирка африканської зеленої мавпи. Використано вірус інфекційного ринотрахеїту, штам «ВМ» (5,0 lg ТЦД₅₀/см³). Методом послідовних пасажів проведено до 20 послідовних пасажів. Культивування проводили до прояву цитопатичної дії на рівні не менше 70 %, але не довше 120 год;

– вплив множинності інфікування на рівень накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту. Досліджували множинність зараження: 1,0 ТЦД₅₀/кл; 0,1; 0,01 та 0,001 ТЦД₅₀/кл в культурі клітин MDBK. Культивування проводили до прояву цитопатичної дії на рівні не менше 70 %;

– дослідження накопичення вірусу в залежності від поживного середовища. Досліджено середовища: 199, DMEM, RPMI, DMEM+RPMI та DMEM+199 (1:1), розчин Хенкса. Проводили в культурі клітин MDBK, множинність зараження 0,01 ТЦД₅₀/кл. Тривалість культивування 48 год;

– залежність репродукції вірусу інфекційного ринотрахеїту від виду сироватки в підтримуючому середовищі. Досліджували: сироватку великої рогатої худоби, фетальну сироватку великої рогатої худоби, сироватку коня, в кількості 2 %, в культурі MDBK. Тривалість культивування 48 год;

– вплив способу зараження на репродукцію вірусу інфекційного ринотрахеїту проводили інфікуванням повністю сформованого моношару та суспензії культури MDBK. Множинність зараження 0,01 ТЦД₅₀/кл. Тривалість культивування 48 год;

– порівняння інтенсивності накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту залежно від методу культивування. Досліджували ролерне та стаціонарне культивування вірусу в культурі MDBK. Множинність зараження 0,01 ТЦД₅₀/кл. Культивування проводили до прояву цитопатичної дії на рівні не менше 70 %.

Культивування ліній клітин та вірусу проводили за загальноприйнятими методиками (Сюрин В. Н., 1984). Інфекційну активність вірусомісного матеріалу визначали титруванням в культурі клітин.

На *другому етапі* досліджень отримували штамоспецифічну гіперімунну сироватку крові кролів. Гіперімунізували кролів (n=6) масою 2–2,5 кг, підшкірно, трикратно на 0, 11 та 18 добу в об'ємі 1 см³, 2 та 3 см³, відповідно. Контролем рівня антитіл були сироватки відібрані до імунізації. Використали вірусомісний матеріал вірусу інфекційного ринотрахеїту (7,5 lg ТЦД₅₀/см³). Зразки крові для дослідження антитіл відбирали до імунізації (0), на 11, 18, 26,

33 та 40 добу дослідження. Рівень специфічних віруснейтралізуючих антитіл досліджували в реакції нейтралізації.

На *третьому етапі* досліджень порівнювали інактивуючі властивості етиленіміну (0,001 %; 0,01; 0,1 %) та формальдегіду (0,02 %; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 %) за температури 21 ± 1 та $37\pm 0,5$ °С. Інфекційність зразків визначали на 24, 48, 72, 96 год, а для формальдегіду також на 120 та 144 год інактивації. Динаміку зниження інфекційності вірусу визначали титруванням, а для зразків нижче чутливості методу, досліджували залишкову інфекційність за результатами трьох послідовних пасажів у культурі клітин.

На *четвертому етапі* здійснювали підбір ад'юванту. Було виготовлено зразки вакцини, де в якості ад'юванту використано: гідроокись алюмінію в суміші з гліцерином, кремнієву емульсію 10-01 та високоочищену мінеральну олію в суміші з аеросилом. Для оцінки ад'ювантних властивостей було створено 3 дослідні (n=18) та контрольну (n=6) (вводили фізіологічний розчин) групи тварин. Вакцинацію та ревакцинацію на 14 добу проводили в дозі 1 см³. Відбір зразків крові здійснювали на 0, 14, 21 та 28 добу. Досліджували рівень специфічних віруснейтралізуючих антитіл в реакції нейтралізації.

На *п'ятому етапі* здійснювали контроль виготовленої вакцини за показниками якості. Зовнішній вигляд, колір, наявності механічних домішок, цілісність флаконів, відповідність маркування досліджували, оглядаючи флакони з вакциною за денного освітлення, щільність укупорки – прокручуванням ковпачка з середнім зусиллям, повноту наповненості флаконів – шляхом відбору вмісту одноразовим шприцем. Стабільність емульсії – методом центрифугування (3000 об/хв, 20 хв), з наступним вимірюванням стовпа прозорості фракції. В'язкість емульсії – згідно Державної фармакопеї України (2011 р.) за допомогою віскозиметра відповідно до інструкції по експлуатації приладу. Бактеріальну і грибну контамінацію – згідно ДСТУ 4483-2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибною контамінації» та вимог Європейської фармакопеї (2014 р.) шляхом висіву на поживні середовища МПА (по 0,5 см³), ТГС та Сабуро (по 1,0 см³) (n=3). Інкубацію проводили впродовж 14 діб за температури $37\pm 0,5$ і 21 ± 1 °С. Повноту інактивації оцінювали за відсутністю розмноження вірусу в культурі клітин впродовж трьох послідовних пасажів. Для цього відбирали 10 см³ вакцини та центрифугували (8000 об/хв, 20 хв), а вірусним матеріалом, що відокремився проводили інфікування культури клітин. Нешкідливість досліджували згідно вимог Європейської фармакопеї (2014 р.), вакцину вводили білим мишам (n=8) масою по 18–20 г підшкірно у дозі 0,2 см³, контрольним тваринам (n=2) вводили фізіологічний розчин. За тваринами спостерігали впродовж 10 діб. Імуногенну активність досліджували шляхом вакцинації кролів (n=8) масою 2–2,5 кг, внутрішньом'язово, у дозі 1,0 см³, контрольним тваринам (n=2) вводили фізіологічний розчин. Відбір зразків крові здійснювали на 21 добу, зразки сироваток досліджували в реакції нейтралізації. Для визначення терміну придатності виготовленої вакцини, зразки трьох дослідних серій зберігали за температури 2–8 °С впродовж 24 місяців. Вакцинацію серонегативних кролів (n=63) для визначення імуногенної активності виготовленої вакцини проводили

одразу після виготовлення (0), через 3, 6, 9, 12, 18, 24 місяців зберігання. Відбір зразків крові здійснювали на 21 добу. Досліджували рівень специфічних віруснейтралізуючих антитіл в реакції нейтралізації.

На *шостому етапі* досліджували імуногенну ефективність виготовленої вакцини на великій рогатій худобі. Було сформовано 3 групи тварин: телята 2-місячного віку (n=27), 4-місячного віку (n=27); корови (2–3 років) (n=27). Кожна група була розділена на три підгрупи: вакциновані однократно (n=5); вакциновані з ревакцинацією через 21 добу (n=20); контроль – вводили фізіологічний розчин (n=2). Вакцинацію тварин проводили в дозі 2 см³ з ревакцинацією частини тварин на 21 добу. Відбирали кров для отримання зразків сироваток до вакцинації (для формування груп серонегативними тваринами), на 7, 14, 21, 28, 35, 42, 150 (5 міс.), 270 (9 міс.) та 360 (12 міс.) добу після початку дослідження. Досліджували рівень специфічних віруснейтралізуючих антитіл в реакції нейтралізації.

На *сьомому етапі* досліджували колостральний імунітет у телят після застосування розробленої вакцини. Було сформовано 3 групи серонегативних тварин: корови вакциновані на 3–4 місяці тільності (n=20); корови вакциновані на 7–8 місяці тільності (n=20); тільні корови, яких не вакцинували (n=20). Вакцинацію проводили двократно в дозі 2 см³ з інтервалом 21 доба, однією серією інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. У корів після отелу досліджували рівень антитіл до збудника інфекційного ринотрахеїту в сироватці крові та сироватці молозива. Відбір зразків проводили на наступну добу після отелу. У телят визначали рівень специфічних антитіл до збудника в сироватці крові після трьох днів випоювання молозива. Сироватки молозива та крові розводили від 1:10 до 1:10000 та досліджували в ІФА, використовуючи комерційні набори (IDEXX, США).

Титрування вірусу та проведення реакції нейтралізації здійснювали за загальноприйнятим методом та стандартом Міжнародного епізоотичного бюро (Сюрин В. Н., 1984; ОІЕ Terrestrial Manual, 2014). Розрахунок інфекційної активності (титру) вірусу і титру антитіл здійснювали за методом Ріда і Менча (1938) та виражали в логарифмах (lg та log₂). Статистичне опрацювання результатів досліджень здійснювали за допомогою персонального комп'ютера програми «Microsoft Excel». Розраховували наступні показники статистики: середнє арифметичне число (M), середнє квадратичне відхилення (m), показник істотності різниці (t) і достовірність різниці (p).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

АНАЛІЗ ПОШИРЕННЯ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ В УКРАЇНІ

З метою вивчення поширення інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби було проведено ПЛР-аналіз 657 зразків матеріалів отриманих від великої рогатої худоби з підозрою до захворювання інфекційним ринотрахеїтом. Дослідження проводили в 10 регіонах України впродовж 2014–2016 рр.

Аналіз отриманих результатів, дозволив встановити, що із 100 % досліджених зразків, які було відібрано з підозрою на захворювання інфекційного ринотрахеїту 70,3 % підтвердили попередній діагноз захворювання.

У розрізі років, в 2014 році було виявлено 52,2 % позитивних зразків, у 2015 році – 71,4 %, у 2016 році – 79 %, що може свідчити як про неоднорідність поширення, так і про тенденцію до збільшення поширення захворювання серед худоби на території України.

При аналізі поширення інфекційного ринотрахеїту на території України, виявлено, що найменший відсоток позитивних зразків було виявлено в Харківській та Рівненській областях, 62 та 63 % відповідно, від 69 до 72 % позитивних зразків матеріалу визначено у Вінницькій, Житомирській, Запорізькій, Хмельницькій, Черкаській та Чернігівській областях. Найвище значення позитивних на інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби зразків матеріалу було виявлено у Київській та Полтавській областях, а саме 77 та 75 % відповідно.

В ході досліджень та аналізу, отримані дані свідчать про високий рівень поширення інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (до 79 %) в різних областях України, зокрема центральних.

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ

З метою отримання високоактивної вірусної сировини для конструювання вакцинного препарату, було проведено порівняльний аналіз чутливості різних ліній клітин до вірусу інфекційного ринотрахеїту. Було проведено дослідження ряду технологічних аспектів з визначення оптимальних параметрів культивування вірусу, для забезпечення максимального рівня репродукції вірусу.

Вибір технологічно перспективної культури клітин. Успіх в культивуванні вірусів, перш за все, залежить від вибору оптимального клітинного субстрату. Тому, на даному етапі було проведено порівняльне дослідження чутливості різних культур до вірусу інфекційного ринотрахеїту (табл. 1).

Таблиця 1

Чутливість культур клітин до вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби ($M \pm m$; $n=5$)

Культура клітин	Титр інфекційної активності вірусу (\lg ТЦД ₅₀ /см ³)					
	Вихідний	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж	4 пасаж	10 пасаж
MDBK	5,0±0,05	6,5±0,10	7,2±0,05	7,9±0,12	8,0±0,11	7,9±0,13
TrT	5,0±0,05	5,2±0,07	6,3±0,06	6,6±0,19	6,8±0,14	6,7±0,16
HB	5,0±0,05	4,5±0,11	5,5±0,10	6,3±0,06	6,5±0,11	6,1±0,32
RCC	5,0±0,05	2,5±0,07	5,3±0,13	5,9±0,07	6,0±0,05	6,2±0,13
RK-13	5,0±0,05	3,7±0,07	5,7±0,11	5,7±0,04	5,8±0,07	5,3±0,39
Vero	5,0±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
ВНК-21	5,0±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
ST	5,0±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
КСТ	5,0±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч

Примітка. н/ч – не чутлива, цитопатична дія вірусу в культурі клітин відсутня.

Встановлено, що репродукція вірусу інфекційного ринотрахеїту відбувалась при інфікуванні культур клітин MDBK, TrT, HB, RCC, RK-13. Найвищий титр вірусу в суспензії отримали при культивуванні вірусу інфекційного ринотрахеїту в культурі MDBK, який на 4 пасажі склав $8,0 \pm 0,11 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$.

Тривале пасажування (впродовж 20 пасажів) вірусу інфекційного ринотрахеїту штаму «ВМ» в культурі клітин MDBK не призводило до зниження інтенсивності накопичення вірусу та залишалось на стабільному рівні ($7,9\text{--}8,1 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$). При тривалому пасажуванні в культурі клітин TrT спостерігали різке зниження інфекційної активності вірусу від 10 до 20 пасажу з $6,7$ до $5,1 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ відповідно.

Таким чином, для подальших досліджень було обрано лінію клітин MDBK, яка дозволила отримати стабільну інфекційну активність вірусу інфекційного ринотрахеїту ($7,9\text{--}8,1 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$).

Вплив множинності інфікування на рівень накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту. Дослідження показали, що оптимальною множинністю інфікування є $0,01 \text{ TЦД}_{50}/\text{кл}$. За таких умов через 40–48 год активність вірусу в суспензії досягала $8,0 \pm 0,33 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ з вираженою ЦПД на 70–90 % площі поверхні моношару. Цитопатична дія вірусу в лінії MDBK характеризувалась появою округлих клітин, які від'єднувались від субстрату та переходили в середовище, моношар втрачав цілісність.

Дослідження накопичення вірусу в залежності від поживного середовища. Встановлено, що найбільший титр був при використанні живильного середовища DMEM+RPMI ($8,0 \pm 0,16 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$) та DMEM ($8,0 \pm 0,11 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$). Найнижчий рівень накопичення вірусу було відмічено при використанні розчину Хенкса ($6,5 \pm 0,11 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$). Тому, для отримання вірусної суспензії з найбільшою інфекційною активністю використовували живильне середовище DMEM+RPMI та DMEM.

Залежність репродукції вірусу інфекційного ринотрахеїту від виду сироватки в підтримуючому середовищі. Визначено, що в результаті внесення сироватки великої рогатої худоби вдалось отримати вірусний матеріал з середнім титром $8,10 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, фетальної сироватки великої рогатої худоби – $7,96 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$, а сироватки коня – $7,93 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$. Таким чином, присутність сироватки суттєво не впливає на накопичення вірусу, тому не є ефективним способом для підвищення титру інфекційної активності вірусу в сировині.

Вплив способу зараження на репродукцію вірусу інфекційного ринотрахеїту. Інфікування культури в сформований моношар клітин дає в середньому на $0,5 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$ вищий титр інфекційної активності вірусу ніж при інфікуванні в суспензію клітин.

Порівняння інтенсивності накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту залежно від методу культивування. Промислова технологія виготовлення інактивованих вакцин потребує значного об'єму вірусної сировини з високою інфекційною активністю. Для цього було досліджено

накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту в культурі MDBK за ролерного та стаціонарного культивування.

Визначено, що оптимальною посівною дозою клітин для ролера є 50 млн кл, а для матрасу 10 млн кл., в той час як після утворення суцільного моношару кількість клітин у ролері становить 315–330 млн кл, а в матрасі – 50–60 млн кл. Отримано вірусомісний матеріал за ролерного культивування ($8,63 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) та стаціонарного ($8,0 \pm 0,15 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Таким чином за ролерного культивування вірусу інфекційного ринотрахеїту штаму «ВМ» можна отримувати вірусну сировину з вищою інфекційною активністю (в середньому на $0,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), що є більш технологічним.

ОТРИМАННЯ ГІПЕРІМУННОЇ ДО ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ СІРОВАТКИ КРОВІ КРОЛІВ

Специфічні сироватки є необхідним компонентом при проведенні діагностичних серологічних досліджень, таких як реакція нейтралізації.

Запропонований спосіб гіперімунізації кролів дозволяє отримати специфічну високоактивну гіперімунову сироватку крові на 26 добу з середнім титром віруснейтралізуючих антитіл $10,04 \pm 0,17 \log_2$ (табл. 2).

Таблиця 2

Сероконверсія віруснейтралізуючих антитіл при гіперімунізації кролів вірусом інфекційного ринотрахеїту, штам ВМ, \log_2

Дні відбору зразків крові	№ тварини						Середні значення M±m
	1	2	3	4	5	6	
0	1,90	1,92	2,00	2,00	1,80	1,78	1,90±0,04
11	3,67	3,50	3,50	3,20	3,60	3,50	3,50±0,07
18	6,00	6,33	6,50	5,50	5,50	6,30	6,02±0,19
26	10,50	9,60	10,00	9,66	10,00	10,50	10,04±0,17
33	7,66	8,00	7,50	7,90	8,00	7,60	7,78±0,09
40	7,00	7,50	7,33	6,66	7,00	7,00	7,08±0,13

Отримана сироватка використана в якості контролю (еталон позитивного зразка) при проведенні технологічного контролю (проведення реакції нейтралізації) під час розроблення та виготовлення вакцинного препарату.

ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМУ ІНАКТИВАЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ

Наступним етапом досліджень було відпрацювання режиму інактивації вірусу інфекційного ринотрахеїту штаму «ВМ», що є необхідним у виробництві інактивованих вакцин. Досліджено умови інактивації етиленіміном в порівнянні з формальдегідом (табл. 3).

Концентрація формальдегіду 0,05 % забезпечувала повну інактивацію вірусу за температури $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ через 96 год. Проте, використання в якості інактиванту етиленіміну в кінцевій концентрації 0,01 % дозволяє провести повну інактивацію впродовж 24 год. Отримані дані досліджень дозволяють вважати,

що обидва із наведених способів інактивації вірусу інфекційного ринотрахеїту штаму «ВМ» можуть бути використані при виготовленні вакцини.

Таблиця 3

**Визначення оптимальної концентрації інактиванту
для інактивації вірусу інфекційного ринотрахеїту*, (M±m; n=5)**

Температура, °С	Концентрація, %	Залишкова інфекційність / Інфекційна активність вірусу, lg ТЦД ₅₀ /см ³					
		Тривалість інактивації, години					
		24	48	72	96	120	144
Інактивація вірусу етиленіміном							
21±1,0	0,001	+	+	+	–	н/д	н/д
	0,01	+	–	–	–	н/д	н/д
	0,1	–	–	–	–	н/д	н/д
37±0,5	0,001	+	+	–	–	н/д	н/д
	0,01	–	–	–	–	н/д	н/д
	0,1	–	–	–	–	н/д	н/д
Інактивація вірусу формальдегідом							
21±1,0	0,02	5,6±0,10	4,3±0,09	2,5±0,07	+	+	+
	0,05	3,2±0,11	2,2±0,09	+	+	+	–
	0,1	2,4±0,06	+	+	+	–	–
	0,3	+	+	+	–	–	–
	0,5	+	+	+	–	–	–
37±0,5	0,02	3,5±0,04	2,2±0,14	+	+	–	–
	0,05	2,1±0,07	+	+	–	–	–
	0,1	+	+	–	–	–	–
	0,3	+	+	–	–	–	–
	0,5	+	+	–	–	–	–

Примітки: *вихідна інфекційна активність штаму вірусу інфекційного ринотрахеїту 8,0 lg ТЦД₅₀/см³; «+» – наявність залишкової інфекційної активності; «–» – залишкова інфекційна активність відсутня; н/д – дослідження не проводилося.

Однак, зважаючи на те, що етиленімін в порівнянні з формальдегідом має більш виражені інактивуєчі властивості, є порівняно безпечнішим за рахунок його полімеризації, не зумовлює кумуляції в організмі вакцинованих тварин, тому саме його було включено в технологію як інактивант та використано у подальших дослідженнях, щодо розроблення технології виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

ПІДБІР АД'ЮВАНТУ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ

Ефективність інактивованих вакцин напряму залежить від застосування ад'юванту, що входить в склад вакцинного препарату (табл. 4).

Результати досліджень показали, що у кролів першої групи титр антитіл на 14 добу після першої вакцинації склав 3,92±0,19 log₂, а через 14 діб після

ревакцинації – $6,87 \pm 0,18 \log_2$. Інтенсивність формування антитіл проти інфекційного ринотрахеїту у тварин другої групи, була близька до першої групи. У тварин третьої групи, що були вакциновані зразком вакцини, де в якості ад'юванту використали суміш високоочищеної мінеральної олії та аеросилу, приріст антитіл був найбільш високим. Так, на 14 добу після першої вакцинації титр антитіл склав $6,17 \pm 0,21 \log_2$, а через 14 діб після ревакцинації вже $9,0 \pm 0,13 \log_2$.

Таблиця 4

Результати серологічних досліджень зразків крові вакцинованих кролів за використання різних ад'ювантів, $M \pm m$, $n=6$

Група тварин, №	Ад'ювант у вакцині	Середній титр антитіл, \log_2			
		Дні дослідження			
		0	14 (ревакц.)	21	28
1	ГОА + гліцерин	$1,95 \pm 0,13$	$3,92 \pm 0,19^*$	$4,89 \pm 0,16^*$	$6,87 \pm 0,18^*$
2	КЕ 10-01	$2,08 \pm 0,09$	$3,72 \pm 0,08^*$	$5,39 \pm 0,10^*$	$7,02 \pm 0,15^*$
3	Мінеральна олія + аеросил	$1,78 \pm 0,17$	$6,17 \pm 0,21^*$	$8,05 \pm 0,11^*$	$9,00 \pm 0,13^*$
4	Контроль	$1,89 \pm 0,13$	$1,92 \pm 0,13$	$1,97 \pm 0,15$	$1,83 \pm 0,13$

Примітка. * різниця значень вірогідна за $p \leq 0,05$ відносно значень такого контрольного показника

Таким чином, із досліджених речовин найбільш активну імунну відповідь на введення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту спостерігали у тварин третьої групи, де в якості ад'юванта було використано суміш високоочищеної мінеральної олії та аеросилу.

КОНТРОЛЬ ДОСЛІДНОЇ СЕРІЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ЗА ПОКАЗНИКАМИ ЯКОСТІ

Важливим етапом при розробленні технології виготовлення інактивованих вакцин є контроль готового біопрепарату.

Встановлено, що вакцина є емульсією білого кольору з легким рожевим відтінком, без механічних домішок, тріщин флаконів, щільно укупорена, відповідно наповнена та маркована. Емульсія стабільна – висота стовпа прозорої фракції не перевищує 3 %. В'язкість препарату – $110 \text{ мм}^2/\text{сек}$. Не контамінована бактеріальною і грибною мікрофлорою.

Вакцина повністю інактивована, нешкідлива та імуногенна (табл. 5). Як видно з наведених даних, у вакцинованих кролів середній титр антитіл на 14 добу після вакцинації становив $6,19 \pm 0,09 \log_2$, а на 21 добу – вже $8,06 \pm 0,11 \log_2$, що свідчить про здатність вакцини індукувати утворення специфічних антитіл у тварин з приростом антитіл в 5,6 рази.

Дослідження дослідної серії вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби показали відповідність показників якості проекту досьє на препарат та міжнародним вимогам, що висуваються до інактивованих вакцин для ветеринарії.

Таблиця 5

**Рівень віруснейтралізуючих антитіл після введення вакцини
проти інфекційного ринотрахеїту кролям, \log_2**

Доба досліджу	Контроль, $M \pm m$	Дослідні тварини								
		1	2	3	4	5	6	7	8	$M \pm m$
0	1,50±0,71	1,0	1,5	1,5	2,0	1,5	1,5	1,0	1,5	1,44±0,11
7	1,25±0,35	3,0	3,5	3,5	3,0	3,5	3,5	3,0	3,0	3,26±0,10
14	1,75±0,35	6,0	6,0	6,5	6,0	6,0	6,5	6,5	6,0	6,19±0,09
21	1,25±0,35	7,5	8,0	8,5	8,0	8,5	8,0	8,0	8,0	8,06±0,11

ВИЗНАЧЕННЯ ТЕРМІНУ ПРИДАТНОСТІ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ

Визначення терміну придатності є індикативним критерієм збереження імуногенних властивостей вакцини протягом терміну зберігання препарату (табл. 6).

Таблиця 6

**Титри віруснейтралізуючих антитіл за зберігання вакцини
за температури 2–8 °С, \log_2 ($M \pm m$, n=3)**

№ серії	Одразу після виготовлення	Тривалість зберігання, місяці					
		3	6	9	12	18	24
1	8,05±0,34	8,17± 0,20*	7,89± 0,38*	8,05± 0,30*	8,11± 0,13*	8,05± 0,34*	7,44± 0,07*
2	7,89±0,38	8,11± 0,13*	7,89± 0,38*	8,11± 0,38*	8,11± 0,13*	8,22± 0,13*	7,39± 0,24*
3	8,11±0,38	8,28± 0,18*	8,22± 0,34*	8,11± 0,38*	8,28± 0,18*	7,89± 0,83*	7,11± 0,13*

Примітка. * різниця значень вірогідна за $p \leq 0,05$ відносно значень такого контрольного показника

Дані таблиці свідчать, що зберігання розробленого вакцинного препарату продовж 18 місяців за температури 2–8 °С не знижує його активність. Через 24 місяці зберігання виявлено зниження імуногенної активності в середньому 0,7 \log_2 , що склало 9 % від середнього рівня після виготовлення.

Таким чином, розроблена інактивована вакцина зберігає імуногенність впродовж не менше 24 місяців зберігання.

**ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ВИГОТОВЛЕНОЇ ВАКЦИНИ НА
ВЕЛИКІЙ РОГАТІЙ ХУДОБІ (НАПРУЖЕНОСТІ І ТРИВАЛОСТІ ІМУНІТЕТУ)**

Для визначення імуногенної активності виготовленої вакцини було проведено дослідження на великій рогатій худобі. Дані табл. 7 свідчать, що на 21 добу після вакцинації титри специфічних антитіл збільшились в середньому в 9,6 раза в порівнянні з контролем. При цьому рівень нейтралізуючих антитіл в групах телят вірогідно не відрізнявся від показників в групі корів.

Дослідження віруснейтралізуючих антитіл до вірусу інфекційного ринотрахеїту в сироватках крові імунованих телят і корів, $\log_2 (M \pm m)$

Група	Телята, 2-місячного віку			Телята, 4-місячного віку			Корови 2–3-річного віку		
	В	В+Р	К	В	В+Р	К	В	В+Р	К
Дні досліджень	Кількість тварин								
	5	20	2	5	20	2	5	20	2
0	0,90±	1,28±	0,50±	0,60±	1,25±	0,75±	1,00±	1,28±	0,50±
	0,45	0,19	0,71	0,41	0,21	1,06	0,31	0,21	0,71
7	3,40±	3,65±	1,00±	3,40±	3,68±	1,00±	3,60±	3,68±	1,00±
	0,48	0,14	0,00	0,41	0,15	0,00	0,33	0,15	0,00
14	6,50±	6,78±	0,75±	6,50±	6,53±	0,75±	6,60±	6,48±	0,50±
	0,25	0,15	1,06	0,31	0,13	1,06	0,33	0,14	0,71
21	8,90±	8,95±	0,50±	6,90±	7,03±	1,00±	6,90±	7,45±	1,00±
	0,27*	0,11*	0,71	0,37*	0,11*	0,00	0,37*	0,14*	0,00
28	8,60±	10,98±	1,25±	8,50±	10,98±	1,50±	8,40±	9,05±	1,25±
	0,21	0,14	0,35	0,25	0,13	0,71	0,21	0,18	0,35
35	8,60±	11,08±	0,50±	8,80±	10,83±	0,75±	8,40±	10,98±	1,00±
	0,21*	0,15*	0,71	0,29*	0,12*	1,06	0,21*	0,14*	0,00
42	8,60±	10,95±	1,25±	8,70±	10,90±	1,00±	8,50±	10,70±	1,25±
	0,11	0,12	0,35	0,14	0,13	0,00	0,18	0,12	0,35
150	8,20±	10,80±	1,50±	8,60±	10,83±	0,50±	8,30±	10,88±	1,00±
	0,14*	0,12*	0,71	0,21*	0,10*	0,71	0,14*	0,17*	0,00
270	5,30±	8,25±	1,00±	5,30±	8,08±	1,25±	5,00±	8,05±	1,25±
	0,38*	0,22*	0,00	0,34*	0,18*	0,35	0,31*	0,22*	0,35
360	4,00±	5,60±	1,25±	3,90±	5,73±	1,00±	4,04±	5,48±	1,00±
	0,40*	0,17*	0,35	0,41*	0,15*	0,00	0,29*	0,16*	0,00

Примітки: В – вакцинація, В+Р – вакцинація та ревакцинація, К – контроль;
* різниця значень вірогідна за $p \leq 0,05$ відносно значень такого показника у контрольних тварин

На 270 добу рівень антитіл у тварин яких було ревакциновано складав від 8,0 до 8,2 \log_2 , а у тварин яких вакцинували однократно 5,0–5,3 \log_2 , спостерігали зниження рівня антитіл у всіх дослідних групах та підгрупах в середньому на 3 \log_2 в порівнянні з даними отриманими на 150 день після вакцинації. На 360 добу досліду титри віруснейтралізуючих антитіл у досліджуваних тварин становив від 4,0 до 5,7 \log_2 .

Отримані результати дають змогу стверджувати що імунітет на високому рівні (8,0–8,2 \log_2) зберігається впродовж 9 місяців після вакцинації. Тому можна рекомендувати проведення ревакцинації для створення напруженого імунітету у тварин не раніше ніж через 9 місяців.

**ДОСЛІДЖЕННЯ КОЛОСТРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У ТЕЛЯТ
ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ**

Проведено визначення рівня антитіл до вірусу інфекційного ринотрахеїту в молозиві корів після отелу при вакцинації проти інфекційного ринотрахеїту в

різні строки тільності, та дослідження формування колострального імунітету у новонароджених телят при випоюванні молозива.

Встановлено, що в сироватці крові телят, які отримували молозиво від корів вакцинованих на 7–8 місяці тільності, виявляли антитіла до інфекційного ринотрахеїту в середньому титрі $3,07 \pm 0,07$ lg. При цьому протективний рівень антитіл ($2,6$ lg та вище) було виявлено в 100 % телят (табл. 8).

Таблиця 8

Дослідження рівня специфічних антитіл до вірусу інфекційного ринотрахеїту, lg ($M \pm m$, $n=20$)

Досліджуваний матеріал Групи тварин	Корови		Телята
	Молозиво	Сироватка крові	Сироватка крові
1 група (вакцинація на 3–4 міс. тільності)	$2,24 \pm 0,10^*$	$2,64 \pm 0,07^*$	$2,45 \pm 0,09^*$
2 група (вакцинація на 7–8 міс. тільності)	$3,20 \pm 0,08^*$	$3,75 \pm 0,07^*$	$3,07 \pm 0,07^*$
3 група (не вакциновані тварини)	$0,20 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,14$	$0,10 \pm 0,07$

Примітка. * різниця значень вірогідна за $p \leq 0,05$ відносно значень такого контрольного показника

Дослідження показали, що у корів після отелу, які були вакциновані двократно на 3–4 місяці тільності, титр специфічних антитіл в сироватці крові до збудника інфекційного ринотрахеїту склав в середньому $2,64$ lg. В той же час у корів при вакцинації на 7–8 місяці тільності титр специфічних антитіл в сироватці крові склав в середньому $3,75$ lg (розведення сироватки крові від 1:1000 до 1:10000), що майже в 13 разів вище за показники групи № 1.

Проведене дослідження підтверджує доцільність проведення вакцинації тільних корів на 7–8 місяці тільності для створення у новонароджених телят колострального імунітету. Таким чином, це дає можливість не лише захистити корів від зараження, а й створити достатній захисний рівень антитіл ($3,07 \pm 0,07$ lg) в організмі новонароджених телят до проведення першої вакцинації.

У сироватці крові групи телят, корів якої вакцинували на 3–4 місяцях тільності виявлено специфічні антитіла на рівні $2,45 \pm 0,09$ lg. При цьому лише у 40 % телят було виявлено протективний рівень антитіл в сироватці крові. У контрольній групі специфічні антитіла були відсутні у 90 % телят, а в 10 % виявляли на рівні 1 lg, що відповідає розведенню сироватки крові 1:10.

Таким чином, розроблена інактивована вакцина проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби є ефективним засобом специфічної профілактики великої рогатої худоби та відповідає вимогам, що ставляться до інактивованих вакцин для тварин відповідно нормативним документам України та Європи.

ВИСНОВКИ

В дисертації теоретично та експериментально обґрунтовано розроблення технології виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, яка включає дослідження вітчизняного штаму «ВМ», оптимізацію умов культивування, інактивації та виготовлення готового продукту. Представлено результати досліджень вакцини на лабораторних та цільових тваринах.

1. Встановлено, що перещеплювана культура клітин MDBK володіє високою чутливістю ($8,63 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ – за ролерного культивування) до вірусу і є оптимальною моделлю для культивування штаму «ВМ» вірусу інфекційного ринотрахеїту та дозволяє отримувати високоактивний вірусомісний матеріал для подальшого виготовлення вакцини.

2. Розроблений спосіб гіперімунізації кролів, який включає в себе трикратну імунізацію тварин та дозволяє отримати специфічні високоактивні гіперімумні сироватки у високому титрі ($10,04 \log_2$) на 26 добу від початку імунізації, що може бути використано при розробленні засобів діагностики та контролю вакцин проти інфекційного ринотрахеїту.

3. Встановлено, що використання етиленіміну в якості інактиванту (кінцева концентрація 0,01 %) дозволяє інактивувати вірус впродовж 24 годин, що скорочує період інактивації вірусу в тричі в порівнянні з формальдегідом, що дозволяє оптимізувати процес виготовлення вакцини. Порівняльний аналіз ад'ювантних речовин на кролях показав, що найбільш активну імунову відповідь на введення вакцини проти інфекційного ринотрахеїту спостерігали у тварин, де в якості ад'юванта було використано суміш мінеральної олії та аеросилу. Так, на 14 добу після першої вакцинації титр антитіл склав $6,17 \pm 0,21 \log_2$, а на 28 добу – $9,0 \pm 0,13 \log_2$.

4. Визначено, що вакцина виготовлена за розробленою технологією при зберіганні за температури 2–8 °С впродовж 24 місяців знижує імуногенну активність лише на 9 %. Тому термін придатності вакцини становить не менше 24 місяців.

5. Дослідженнями імуногенності розробленої вакцини встановлено, що проведення вакцинації та ревакцинації на 21 добу дозволяє підвищити рівень специфічних антитіл на $2,5 \log_2$ в порівнянні з тваринами, ревакцинацію яких не проводили. Використання розробленої інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби дозволяє створити у поголів'я імунітет на 28 добу після вакцинації на рівні 9–11 \log_2 . Показано, що при застосуванні розробленого вакцинного препарату через 150 днів рівень специфічних антитіл був в межах 10,80–10,88 \log_2 . Тривалість специфічного імунітету у тварин не менше 9 місяців ($8,0$ – $8,2 \log_2$).

6. При вакцинації корів розробленою інактивованою вакциною проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби на 7–8 місяці тільності у більшого числа тварин відзначаються високі титри специфічних антитіл до інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в сироватці крові ($3,75 \pm 0,07 \lg$) та молозиві ($3,20 \pm 0,08 \lg$), що забезпечує високий колостральний

імунітет у новонароджених телят при його своєчасному вживанні. Експериментально обґрунтовано ефективність вакцинації тільних корів, оскільки надалі при вживанні молозива новонародженим телятам, у них формувалася колостральний імунітет до вірусу інфекційного ринотрахеїту ($3,07 \pm 0,07$ Ig), який зумовлює захист тварин до проведення першої вакцинації.

7. Встановлено, що інактивована вакцина проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби відповідає вимогами, що поставлені до інактивованих вакцин для тварин відповідно нормативним документам України та Європи за зовнішнім виглядом, стабільністю емульсії, в'язкістю, відсутністю контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою, повнотою інактивації, нешкідливістю та імуногенністю, здатний формувати високий рівень імунного захисту.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для профілактики інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби в господарствах та приватному секторі України рекомендується застосування інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту.

За результатами дослідження науково-експериментально обґрунтовано та розроблено технологію виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби із застосуванням моношарової культури перещеплюваних клітин MDBK, штаму «ВМ» вірусу інфекційного ринотрахеїту, його інактивації за допомогою етиленіміну в кінцевій концентрації 0,01 % впродовж 24 годин, та інноваційної суміші високоочищеної мінеральної олії та аеросилу в якості ад'юванту, яку рекомендуємо використовувати для виробництва інактивованої вакцини біопідприємствами України відповідно до розробленого проекту досьє.

Виготовлену за розробленою технологією вакцину випробувано та впроваджено в приватне сільськогосподарське підприємство «Шевченківське», с. Гореничі Київської області.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи НУБіП України.

Отримані результати пропонуються використовувати при написанні відповідних розділів підручників і навчальних посібників з епізоотології та ветеринарної біотехнології.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Гулянич М. М., Недосєков В. В., Клейманов І. С. Технологічні аспекти виготовлення інактивованих вакцин проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Науково-технічний бюлетень Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. 2015. Т. 3. № 3. С. 58–63. *(Здобувачем проведено літературний пошук, узагальнено отримані дані, підготовлено статтю).*

2. Гулянич М. М., Недосєков В. В., Годовський О. В. Підбір ад'юванту для конструювання інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Ветеринарна біотехнологія. 2016. Вип. 29. С. 93–99. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

3. Гулянич М. М., Недосєков В. В. Дослідження інфекційної активності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби за тривалого пасажування в культурі клітин. Ветеринарна біотехнологія. 2017. Вип. 30. С. 57–62. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

4. Гулянич М. М., Недосєков В. В., Годовський О. В. Імуногенна ефективність препарату «Бовіmun ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ» – вакцини інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Тваринництво України. 2017. № 3–4. С. 36–39. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала статтю).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

5. Гулянич М. М., Недосєков В. В. Дослідження колострального імунітету у телят при застосуванні інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Ветеринарна медицина. 2017. Вип. 103. С. 332–334. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала статтю).*

6. Гулянич М. М., Недосєков В. В. Дослідження вакцини інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби за показниками якості. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017. Вип. 265. С. 75–84. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

Стаття у науковому виданні іншої держави:

7. Hulyanych Myroslava, Nedosekov Vitalii, Sobko Yurii. Determination of Cultural Conditions of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Strain «BM». Annals of Agrarian Science. Elsevier. 2016. Vol. 14. Issue 3. P. 201–204. Режим доступу: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/15121887>. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

Статті в інших виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

8. Гулянич М. М., Недосєков В. В. Порівняння чутливості перещеплюваних культур клітин до вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Молодий вчений. 2016. № 7 (34). С. 296–298. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено статтю).*

9. Гулянич М. М. Аналіз тестування вакцини інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Молодий вчений. 2016. № 11 (38). С. 102–106.

Тези наукових доповідей:

10. Гулянич М. М. Лабораторна діагностика інфекційного ринотрахеїту ВРХ. Нові завдання сучасної медицини: II Міжнародна науково-практична конференція, м. Львів, 23–24 жовтня 2015 року: тези доповіді. 2015. С. 103–106.

11. **Hulyanych M. M.**, Nedosekov V. V., Sobko Y. A. Cultural Properties of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. Non sibi, sed omnibus - not for themselves, but for everybody: 2nd International Scientific Conference of Veterinary Medicine Students. Warsaw, 15th May 2016: thesis. 2016. P. 76. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).*

12. **Гулянич М. М.**, Недосєков В. В. Вивчення культуральних властивостей вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва: XV Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу та аспірантів, м. Київ, 19–20 травня 2016 року: тези доповіді. 2016. С. 130. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).*

13. **Гулянич М. М.**, Недосєков В. В. Оптимізація режиму культивування лінії кліток MDBK. Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи: Міжвузівська науково-практична конференція викладачів і студентів, м. Дніпропетровськ, 1–2 червня 2016 року: тези доповіді. 2016. С. 84. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).*

14. **Hulyanych Myroslava**, Nedosekov Vitalij. Biological Characteristics of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus strain «BM». Bioresources and viruses: 8th International conference, Kyiv, 12–14th September 2016: thesis. 2016. P. 178–180. *(Здобувачем проведено дослідження, здійснено аналіз результатів, підготовлено матеріал до друку).*

15. **Гулянич М. М.**, Недосєков В. В. Виділення вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. XIV Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини, м. Бровари, 6–7 жовтня 2016 року: тези доповіді. 2016. С. 50–52. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала матеріал до друку).*

16. **Гулянич М. М.**, Недосєков В. В. Ефективність формування колострального імунітету у телят при застосуванні інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 22 червня 2017 року: тези доповіді. 2017. С. 16–18. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала матеріал до друку).*

АНОТАЦІЯ

Гулянич М. М. Науково-експериментальне обґрунтування виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. – На правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено науково-експериментальному обґрунтуванню виготовлення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту. Висвітлено питання дослідження культурних властивостей вірусу інфекційного ринотрахеїту штам «ВМ» та оптимізації його накопичення. Розроблено технологію накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту в ролерній культурі перещеплюваних клітин MDBK з високою біологічною активністю ($8,63 \pm 0,12 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$). Розроблено спосіб гіперімунізації кролів для отримання специфічної високоактивної гіперімунної сироватки ($10,04 \text{ log}_2$). Використано в якості інактиванту етиленімін в концентрації 0,01 %, що дозволяє скоротити процес інактивації до 24 годин. Порівняльне дослідження ряду речовин в якості ад'ювантів показало, що найбільш активну імунну відповідь на введення інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту спостерігали у тварин, яким в якості ад'юванта було використано суміш високоочищеної мінеральної олії та аеросилу. Встановлено, що розроблена вакцина відповідає вимогам до інактивованих вакцин для ветеринарії. Дослідження імуногенності показало ефективність розробленої інактивованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Дозволяє створити у поголів'я імунітет на 28 добу після вакцинації на рівні 9–11 log_2 . Показано, що при застосуванні розробленого вакцинного препарату через 150 днів рівень специфічних антитіл був в межах 10,80–10,88 log_2 . Тривалість специфічного імунітету у тварин не менше 9 місяців (8,0–8,2 log_2).

Показана ефективність вакцинації тільних корів, оскільки надалі при випоюванні молозива новонародженим телятам, у них формувався колостральний імунітет до інфекційного ринотрахеїту, який зумовлює захист тварин до проведення першої вакцинації.

Ключові слова: інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби, вакцинація, технологія, імунітет, вакцинопрофілактика.

АННОТАЦИЯ

Гулянич М. М. Научно-экспериментальное обоснование изготовления инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена научно-экспериментальному обоснованию изготовления инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита. Освещены вопросы исследования культурных свойств вируса инфекционного ринотрахеита штамм «ВМ» и оптимизации его накопления. Разработана технология накопления вируса инфекционного ринотрахеита в роллерной культуре перевиваемых клеток MDBK с высокой биологической активностью ($8,63 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Разработан способ гипериммунизации кроликов для получения специфической высокоактивной гипериммунной сыворотки ($10,04 \log_2$). Использование в качестве инактиванта этиленимин в концентрации 0,01 %, что позволяет сократить процесс инактивации до 24 часов. Сравнительное исследование ряда веществ в качестве адъювантов показало, что наиболее активно иммунный ответ на введение инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита наблюдали у животных, которым в качестве адъюванта было использовано смесь высокоочищенного минерального масла и аэросила. Так, на 14 сутки после первой вакцинации титр антител составил $6,17 \pm 0,21 \log_2$, а на 28 сутки уже $9,0 \pm 0,13 \log_2$. Установлено, что разработанная вакцина изготовлена в соответствии соответствует требованиям к инактивированным вакцинам для ветеринарии. Вакцина безвредна при введении лабораторным животным и вызывает индукцию специфических противовирусных антител у кроликов. Исследование иммуногенности показало эффективность разработанной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Позволяет создать в поголовья иммунитет на 28 сутки после вакцинации на уровне 9–11 \log_2 . Показано, что при применении разработанного вакцинного препарата через 150 дней уровень специфических антител был в пределах 10,80–10,88 \log_2 . Продолжительность специфического иммунитета у животных не менее 9 месяцев ($8,0$ – $8,2 \log_2$).

Установлено, что в сыворотке крови телят, получавших молозиво от коров вакцинированных на 7–8 месяце стельности, проявляли антитела к инфекционного ринотрахеита в среднем титре $3,07 \pm 0,07 \lg$. При этом протективный уровень антител было обнаружено в 100 % телят. Показана эффективность вакцинации стельных коров, поскольку в дальнейшем при выпаивании молозива новорожденным телятам, у них формировался колостральный иммунитет к инфекционному ринотрахеиту, обуславливающий защите животных к проведению первой вакцинации.

Ключевые слова: инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, вакцинация, технология, иммунитет, вакцинопрофилактика.

ANNOTATION

Hulyanych M. M. Scientific and experimental substantiation of manufacturing inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. – The Manuscript.

Dissertation for the candidate of veterinary sciences degree in speciality 16.00.03 Veterinary Microbiology, Epizootology, Infectious Diseases and Immunology. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The dissertation is devoted to the scientific and experimental substantiation of the manufacture of an inactivated vaccine against infectious rhinotracheitis. The research questions of the cultural properties of the infectious rhinotracheitis virus strain «BM» have been highlighted and the optimization of its accumulation. The technology of infectious rhinotracheitis virus has been developed accumulation in the roller culture of MDBK transfected cells with high biological activity ($8.63 \pm 0.12 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$). The method for the hyperimmunization of rabbits has been developed to obtain a specific high-level hyperimmune serum ($10.04 \log_2$). Ethyleneimine has been used for the inactivation at concentration of 0.01 %, which reduces the inactivation process to 24 the conducted comparative study hours. The conducted comparative study of a number of substances as adjuvants showed that the most active immune response to the administration of the inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis was observed in animals using a mixture of highly purified mineral oil and aerosol as an adjuvant. It has been established that the developed vaccine was manufactured in accordance with the requirements for inactivated vaccines for veterinary medicine. The study of immunogenicity has shown the effectiveness of the developed inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. It allows you to create livestock immunity for 28 days after vaccination at the level 9–11 \log_2 . It has been shown that the application of the developed vaccine preparation in 150 days resulted in a level of specific antibodies in the range of 10.80–10.88 \log_2 . The duration of this specific immunity in animals is at least 9 months ($8.0\text{--}8.2 \log_2$).

The effectiveness of the vaccination of single cows has been shown. Because in the future when the colostrum was given to newborn calves, they formed colostral immunity to IBR, which predetermines the protection of animals before the first vaccination.

Key words: infectious bovine rhinotracheitis, vaccination, technology, immunity, vaccine prophylaxis.