

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ИМУНОГЕННИТЕ КАЧЕСТВА НА ВАКСИНА „ТРИВАК“

Райко Пешев*, Мартин Христов*, Кольо Александров**

*НДНИВМИ -“Проф. д-р. Г. Павлов” гр.София,

**Частно практикуващ ветеринарен лекар в гр. Разград

Респираторните и чревни вирусни заболявания по говедата предизвикват огромни икономически загуби на съвременното животновъдство. Годишните загуби се изчисляват на милиони долари. Най-актуални от респираторните инфекции са говежди херпес вирус-1 (ГХВ-1) с двете му форми инфекциозен ринотрахеит - инфекциозен пустулозен вулвовагинит (ГХВ-1 ИРТ-ИПВ), мукозна болест-вирусна диария (МБ-ВД), парамиксовирус-параинфлуенца 3 (ПИ-3), аденовирусна (Ад) и респираторно-синцитиалната вирусна инфекция (РСВ). Тези вируси заедно с някои бактериални патогени са известни като причинители на респираторния болестен комплекс при говедата. От чревните инфекции най-голям дял заемат ротавирусните, коронавирусните, парвовирусните ентерити по говедата и вируса на МБ-ВД. В зависимост от процента положителни животни и разпространението на инфекциите на територията на една страна, борбата с вирусните респираторни заболявания се води по различен начин. В Дания и Швейцария, където процентът на положителни животни от ГХВ-1 е нисък, вирусът е изкоренен чрез тестване и отстраняване от стадата на положителните серореагенти. В други европейски страни като Германия, Франция, Холандия и САЩ, където процентът реагирали животни е по-висок се прилагат напрегнати ваксинации с генно-делетиранни ваксини, от които са отстранени определени гени (gE, gD и ТК). В някои страни се използва и трети

вариант за изкореняване на ГХВ-1, който е комбинация от първите два метода. За профилактика и борба срещу останалите респираторни заболявания като ПИ-3, МБ-ВД и РСВ има разработени и се прилагат инактивирани и атенуирани моно и поливалентни ваксини.

В нашата страна в миналото борбата с респираторните заболявания се водеше чрез прилагане на моно, би и поливалентни инактивирани, и атенуирани ваксини. За профилактика на ГХВ-1 бяха разработени и се прилагаха с успех атенуирани и инактивирани ваксини (Хараламбиев, 1976). Беше проучен имунологичния отговор след приложението им, а по-късно от Цветков и съавт. (1984) беше разработена и приложена инактивирана ваксина “Ривовак” с комбинация от различни адюванти.

За предпазване на говеда от вируса на МБ-ВД беше разработена концентрирана и инактивирана етанол-сапонинова ваксина (Цветков и съавт. 1979), а за имунизация на телета беше разработена и приложена атенуирана ваксина.

Комбинирана ваксина се прилагаше при ПИ-3 и аденовируси (Хараламбиев, 1975), а Генова и съавт. (1993) разработиха и приложиха комбинирана ваксина срещу МБ-ВД и респираторно синцитиалната вирусна (РСВ) инфекция.

Целта на настоящото съобщение е проследяване на поствакциналния имунитет срещу вирусите на ГХВ-1, МБ-ВД и ПИ-3 след прилагане на комбинирана ваксина “Тривак” производство на Ставрополската биофабрика, Русия, предназначена за употреба при едри преживни животни.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Ваксинален продукт

В изследванията използвахме ваксина “Тривак“, която съдържа атенуирани щамове на ГХВ-1, ПИ-3 и МБ-ВД. Ваксината е съставена от

два компонента. Компонент 1 съдържа смес от атенуиран вирус на ГХВ-1, “щам ТК - В2” в количество за една доза 2.10^5 ТКИД₅₀ и атенуиран ПИ-3 вирус щам “ПТК 45/86” в количество за една доза $2.10^{5,5}$ ТКИД₅₀. Компонент 2 представлява атенуиран вирус на МБ-ВД, щам “ВК-1” в количество за една доза $2.10^{4,5}$ ТКИД₅₀.

Проучвания за безвредност на ваксината

Препоръчва се ваксината да се прилага при телета над едномесечна възраст и при клинично здрави животни. Противопоказано е приложението на ваксиналния продукт при изтощени и болни животни. След приложение на ваксината извършихме наблюдение на имунизирани животни за локални промени в мястото на инокулирането и за общи промени – температура, отказ от храна, променено поведение и др. Проучванията за безвредност извършихме и лабораторно върху хранителни среди, подходящи за развитие на бактерии и плесени. Бактериологичното изпитване извършихме на хранителна среда Soybean Casein Digestion Medium в продължение на 14 дни, а за плесени и гъби върху среда Dichloran 18% Glycerol Agar в продължение на 14 дни. Ежедневно наблюдавахме хранителните среди за наличие на бактериален и гъбичен растеж.

Схема на приложение на ваксината и изследвани проби

Ваксината приложихме съгласно указанията на фирмата производител. Лиофилизираните компоненти на ваксината разтваряхме по отделно с по 5 mL стерилен физиологичен разтвор. Флаконите разклацахме до пълно разтваряне на компонентите на ваксината, след което ги обединявахме в един флакон. С така получения разтвор имунизирахме 12 броя телета над едномесечна възраст по следната схема: Първата ваксинация беше приложена подкожно в количество 0,65 mL след установяване на изходните титри на антитела, а втората - 30 дни след

първата ваксинация със същото количество от ваксината и по същият начин. От ваксинираните телета получихме кръвни проби преди ваксинирането /0 ден/, един месец след първата ваксинация, един месец след втората ваксинация, а след това на 180-ия ден след втората ваксинацията. Серумните проби коагулирахме на 37°C за 45 min, след което центрофугирахме на 1500 rpm/10 min и инактивирахме температурно на 56°C за 30 min.

Изследване за антитела срещу вируса на инфекциозния ринотрахеит чрез ензимна имунна реакция (ELISA).

Изследванията на кръвните серуми за антитела срещу вируса на говежди херпесвирус-1 извършвахме чрез ELISA. Микротитърните плаки от кита бяха натоварени предварително с инактивиран антиген на ГХВ-1. Разрежданията на тестваните проби инкубирахме в ямките на плаките. Всички антитела от изследваните серуми, специфични за ГХВ 1, се свързваха с антигена и формираха антиген-антитяло комплекс на повърхността на ямките. След промиване на плаката, добавяхме анти-говежди IgG, белязан с пероксидаза, който се свързваше с антителата, които бяха в комплекс с антигена на ГХВ 1. Не свързания конюгат отстранявахме чрез промивни процедури и добавяхме тетраметил бензидин (ТМБ) субстрат към ямките. След инкубация за 15 min на стайна температура, спирахме реакцията със стоп разтвор. Нивото на оцветяване, което се получава беше директно пропорционално на количеството на специфичните за ГХВ 1 антитела, присъстващи в пробата.

Отчитането на адсорбцията, оптичната плътност /ОП/ на пробите и референтните контроли извършвахме на микроплаков ридер при дължина на вълната 450 nm. Първоначално отчитахме средните оптични плътности на негативните и позитивните контроли. Резултатите получавахме чрез

сравняване на ОП на пробите с оптичната плътност на положителната контрола. Критерии за валидност на изследванията бяха:

$$NCx \leq 0,500; PCx \leq 2,000; PCx - NCx \geq 0,300.$$

$$S/P \% = 100 \times \frac{\text{Пробата (450nm) - NCx}}{PCx - NCx}$$

където NCx - средната оптична плътност на двете отрицателни контроли, PCx - средната оптична плътност на двете положителни контроли, S/P % - % отношение на пробата към положителната контрола.

Като отрицателни приемахме проби със стойности S/P% < 35%, като съмнителни, пробите със стойности между 35% и 45%, а като положителни пробите със S/P% ≥ 45%.

Изследване за антитела срещу вируса на МБ-ВД

Реакция микровирус неутрализация (МВНР) извършвахме в микро обеми по методи, възприети в лабораторията (Диловски и съавт., 1982). Температурно инактивираните серуми разреждахме двукратно в стерилни микроплаки със среда MEM Eagle, съдържаща 0,2M/l L глутамин, 0,075% натриев бикарбонат и антибиотици - пеницилин 100 ME и стрептомицин 100 µg/mL. Като поддържаща използвахме същата среда и 1% фетален телешки серум (ФТС). Неутрализацията на антителата в серумите постигахме чрез добавяне на равен обем вирусна суспензия, съдържаща 100 ТКИД₅₀ вирус на МБ-ВД щам "Каблешково" с краен титър 10^{4.5} ТКИД₅₀. Вирус неутрализационната смес инкубирахме за 2 h на 37°C. Като индикаторна система използвахме постоянната клетъчна линия МДВК в количество 10⁵ клетки/mL. При извършването на МВНР залагахме съответните положителна (100 ТКИД₅₀ вирус на МБ-ВД) и отрицателна контроли (неинфектирана клетъчна култура). Отчитането на реакцията извършвахме до 120 h. Като серум неутрализационен титър приемахме

най-високото разреждане на серума, даващо пълна неутрализация на използвания в реакцията вирус.

Изследване за антитела срещу ПИ-3 вирус

Изследванията извършвахме чрез реакция за задържане на хемаглутинацията с човешки еритроцити О кръвна група, по методи описани от Диловски и съавт. (1982). Температурно инактивираните серуми разреждахме двукратно с фосфатно буферен разтвор /ФБР/ рН 7,2 или физиологичен разтвор и прибавяхме 4 хемаглутиниращи единици /ХА/ от ПИ-3 вирус, щам “Извор” с титър $10^{7,66}$ ТКИД₅₀/ml. Смесите серум-вирус инкубирахме на 5°C за 1 h, след което добавяхме индикаторната система – човешки еритроцити О кръвна група. Резултатите отчитахме при утаяване на еритроцитите в контролните ямки. За контролиране правилността на приготвяне на вирусния антиген извършвахме обратна титрация на антигена. Отчитането на резултатите извършвахме до 1 h от накапване на индикаторната система. За титър на антителата приемахме най-високото разреждане на серума, даващо пълна задръжка на хемаглутинацията на индикаторния вирус.

За да може да сравним динамиката за изграждане на антитела срещу трите антигена, използвани във ваксината, нормирахме получените стойности за титрите на антителата към средната им стойност за 30-ия ден, което ни даваше възможност да сравним и разликите в титрите на антителата между трите антигена за съответните дни на изследване. Използвахме дескриптивна статистика и непараметричен Wilcoxon matched pairs тест за установяване на достоверните разлики.

Резултати

Проучвания за безвредност на ваксината

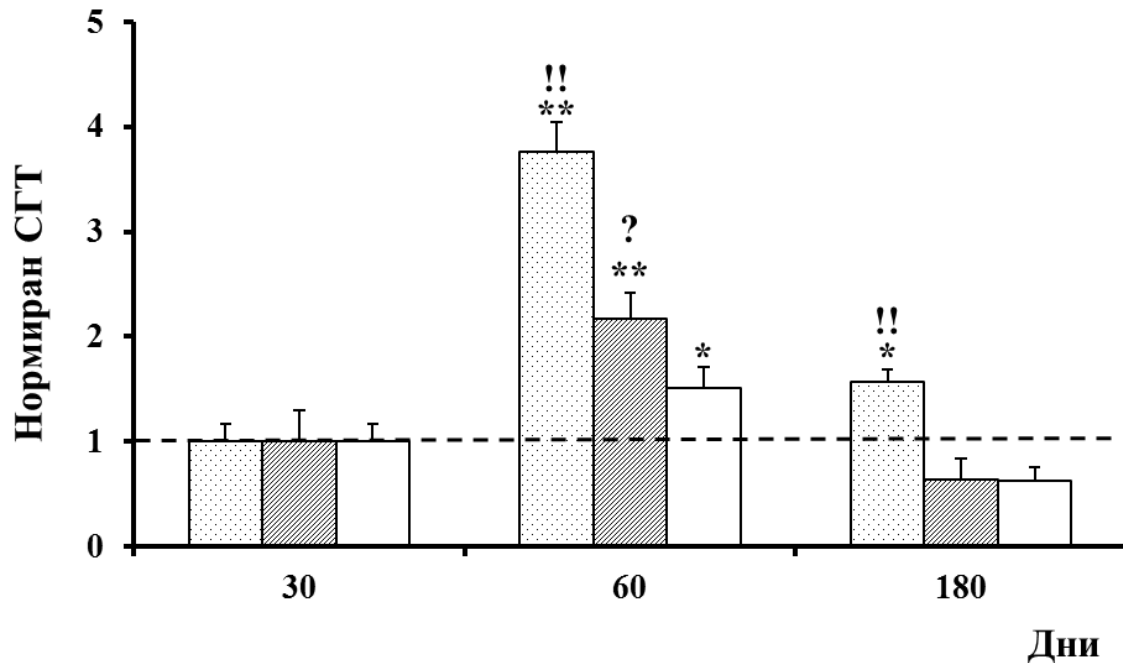
След приложение на ваксината извършихме наблюдение в продължение на 10 дни на имунизираните животни за локални промени в мястото на инокулирането и за общи промени – температура, отказ от храна, променено поведение и др. При всички изследвани телета не установихме повишение на температурата, нямаше локални реакции от имунизирането и не беше променено общото им състояние. При лабораторните проучвания за безвредност върху хранителна среда Soybean Casein Digestion Medium, а за плесени и гъби върху среда Dichloran 18% Glycerol Agar в продължение на 14 дни и ежедневното наблюдение на хранителните среди не установихме наличието на бактериален и гъбичен растеж. Тези данни потвърждават безвредността на вакциналния продукт, деклариран от производителя.

Проучвания върху имуногенността на ваксината

При изследване на динамиката на изграждане на антитела срещу вирусните антигени, използвани във ваксината установихме, че титрите на антителата нарастваха от деня на ваксинацията, като това нарастване беше значимо на 60 ден срещу вирусите на ГХВ-1, МБ-ВД и ПИ-3 ($p = 0.0022$, $p = 0.0022$, $p = 0.023$, Wilcoxon matched pairs тест) в сравнение с 30-ия ден (фиг 1). На 180-ия ден титрите на антителата бяха значимо по-високи от тези на 30-ия ден само срещу вируса на ГХВ-1 ($p = 0.0033$, Wilcoxon matched pairs тест). Титрите на антителата на 180-ия ден срещу ПИ-3 вирус бяха значимо по-ниски от тези на 30-ия ден ($p = 0.035$, Wilcoxon matched pairs тест), докато при МБ-ВД разликата не беше достоверна (фиг 1).

Достоверно най-високи бяха титрите на антитела срещу вируса на ГХВ-1 за 60 ($p = 0.0028$, $p = 0.0028$) и 180-ия ден ($p = 0.00926$, $p = 0.00443$) спрямо тези срещу МБ-ВД и ПИ-3 вирусите, като антителата срещу МБ-ВД вируса на 60-ия ден бяха значимо по-високи от тези срещу ПИ-3 вирус ($p = 0.00498$). На 180-ия ден стойностите на антителата срещу тези вируси нямаха достоверна разлика (фиг 1).

□ГХВ-1 - ELISA ▨МБ-ВД-МВНТ □ПИ-3-РЗХА



Фиг 1. Динамика на антителата след приложение на ваксина ”Тривак” на 30-ия, 60-ия и 180-ия ден след ваксинацията. Със звездичка са означени достоверните разлики в стойностите на антителата спрямо 30-ия ден за съответния антиген, с ! между ГХВ-1 и останалите два антигена, а с ? между МБ-ВД и ПИ-3 за съответните дни.

Обсъждане

Независимо от предприеманите мерки за профилактика и борба респираторните заболявания продължават да са важен здравен проблем. ГХВ-1 и МБ-ВД имат отношение не само към респираторните инфекции, но и към гениталните нарушения и безплодието. Това беше и причината да проучим ефекта от приложението на ваксина “Тривак“, в която има 3 вирусни причинителя, най-често предизвикващи респираторни заболявания. Ваксиналните щамове са достатъчно добре атенуирани и ваксината може да се прилага както при подрастващи телета, при юници

преди заплождането така и при бременни крави. Това се потвърждава от нашите проучвания върху безвредността на ваксината. Ваксината също така е и бактериално и плесенно стерилна, което установихме при бактериологичното и микологичното изследване на ваксиналния продукт.

При проследяване на хуморалния имунен отговор след прилагане на ваксината, установихме, че антителата срещу вируса на ГХВ-1 намаляват плавно един месец след втората ваксинация. След 6-ия месец от първата ваксинация СГТ намаляват, но са все още значимо по-високи от тези след първото имунизирание.

При изследване на серологичния отговор при телета срещу МБ-ВД и ГХВ-1 Цветков (1987) установява намаляване на титрите на антителата срещу вируса на МБ-ВД между 40 и 50-ия ден, докато при настоящите проучвания установихме намаляване на СГТ на антителата, след 30-ия ден от втората ваксинация, което най-вероятно се дължи на различния имуномодулятор, използван във ваксината и на различните изходни количества от антигените. Серологичният отговор при повечето от животните намаляваше значимо след 180-ия ден, но в сравнение с други ваксини, предимно инактивирани, се запазваше в по-високи стойности. При сравнителни изследвания на четири комерсиални инактивирани и атенуирани ваксини, съдържащи ГХВ-1, МБ-ВД, ПИ-3 и говежди РСВ (Fulton и съавт. 1995) установяват, че титрите на антителата, индуцирани от модифицираните живи и химически променени ваксини срещу ГХВ-1 вирус, са с по-високи стойности и имат по-голяма продължителност, в сравнение с тези, предизвикани от инактивираните ваксини. За вируса на МБ-ВД антителата индуцирани от инактивираните ваксини са по-ниски и се появяват по-късно на 42-ия ден в сравнение с тези, предизвикани от модифицираните живи ваксини - 28-ия ден. След ваксинирането на телета, притежавачи първоначално антитела срещу ПИ-3 вируса, установяват по-високи титри на антитела, образувани от инактивираната ваксина на 7-ия

ден, в сравнение с модифицираната жива ваксина и доказват, че всичките четири ваксини, предизвикват повишение на антителата срещу ПИ-3 от 7-ия ден (ваксини I, II, и III) или 14-ия ден (ваксина IV).

При изследване на бивалентна ваксина срещу РСВ и МБ-ВД за безвредност и имуногенност Генова и съавт. (1993) установяват, че имунният отговор на телета, ваксинирани с моно- и би-ваксина е равностоеен за всеки антиген на 20-ия ден от първата ваксинация, докато ние намираме, че след първоначалното прилагане на ваксина “Тривак“ най-високи титри на антитела има срещу вируса на ГХВ-1. За вируса на МБ-ВД след втората ваксинация титрите варират между 5 и 6 \log_2 а за РСВ 4 до 5 \log_2 (Генова и съавт. 1993). При нашите изследвания установихме покачване на титрите на антителата срещу ГХВ-1 почти 3 пъти след втората ваксинация, а срещу МБ-ВД титрите се движеха между 2 и 5 \log_2 , което вероятно се дължи на различните изходни титри на вирусните антигени, участващи във ваксината. Разликите в нивата на антителата за двете ваксини вероятно се дължат на различните видове аджуванти, използвани в тях и на различната имуногенност на използваните ваксиналните антигени.

От проведените проучвания се вижда, че изградените титри на антитела са високи до 6-ия месец след имунизацията и срещу трите вирусни причинителя намиращи се във ваксината., От получените резултати може още да се заключи, че тази ваксина е безвредна и имуногенна за говеда.

Изводи

1. Ваксина “Тривак“ е безвредна и имуногенна за говеда.

2. Приложението на ваксината по схемата, предложена от производителя, създава високи титри на антитела и срещу трите основни причинители на респираторни инфекции по говедата, намиращи се във ваксината.

3. Изградените титри на антитела след 180-ия ден намаляват плавно, но все още са на достатъчни нива да предпазват имунизираните телета срещу циркулиращите в стадата вирусни агенти

Използвана литература:

1. Диловски М., Хараламбиев Х., Текерлеков П., Герганов Г. Диагностика на вирусните болести по домашните животни, София, Земиздат, 1982.

2. Генова К., Цветков П., Петкова К., Проучване върху безвредността и имуногенността на бивалентна ваксина срещу респираторно синцитиалната вирусна инфекция и мукозната болест – вирусна диария. Вет. Мед. Науки XXVII, 2, 4 – 7, 1993.

3. Цветков П., Върху имунопрофилактиката на заразен ринотрахеит и мукозна болест-вирусна диария по говедата, Докторска дисертация, София, 1987.

4. Цветков П., Петкова К., Бачийски Л., Хараламбиев Х., Получаване и проучване на имуногенните особености на бивалентна инактивирана ваксина срещу мукозна болест и инфекциозен ринотрахеит. Вет. Мед. Науки 16 (5), 3-9, 1979.

5. Цветков П., Йолов Й., Бачийски Л., Хараламбиев Х., Диловски М., Получаване и проучване имуногенността на инактивирана восьмично-алкохолна ваксина /Ривовак/ против заразния ринотрахеит по говедата. Доклади 20 години ИКВП, София, 1984.

6. Цветков П., Йолов Й., Бачийски Л., Диловски М., Хараламбиев Х., сравнително изпитване на инактивирани ваксини против заразния ринотрахеит по говедата, съдържаща различни адюванти. Доклади 20 години ИКВП, София, 1984.

7. Fulton R. W., Confer A. W., Burge L. J., Perino L. J., d'Offay J. M. , Payton M. E. Mock R. E. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. Vaccine, Vol. 13, No. 8. 725-733, 1995.

8. Haralambiev H., The immunological response of calves after submucosal application of a live vaccine against parainfluenza 3 and adenovirus (Brief report), Arch. Exp. Veterinarmed., 29 (3), 397-400, 1975.

9. Haralambiev H., Immunogenicity studies of an inactivated IBR vaccine administered into the nasal mucosa, Acta Vet. Acad. Sci. Hung., 26 (2) 215-217, 1976.

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ИМУНОГЕННИТЕ КАЧЕСТВА НА ВАКСИНА „ТРИВАК“

Райко Пешев*, Мартин Христов*, Кольо Александров**

*НДНИВМИ -“Проф. д-р. Г. Павлов” гр.София,

**Частно практикуващ ветеринарен лекар в гр. Разград

Резюме

В настоящето проучване е проследен поствакциналният имунитет срещу вирусите на говеждия херпес вирус-1 (ГХВ-1), мукозна болест-вирусна диария (МБ-ВД) и парамиксовирус параинфлуенца 3 (ПИ-3) след прилагане на комбинирана ваксина “Тривак” производство на Ставрополската биофабрика, Русия, предназначена за употреба при едри преживни животни. Ваксината е изследвана за безвредност и имуногенност върху телета ваксинирани по схема и е установено, че е безвредна и имуногенна, създава високи титри на антитела и срещу трите причинителя, намиращи се във ваксината, а изградените титри на антитела след 180-ия ден намаляват плавно, но все още са достатъчни да предпазват имунизиранияте телета срещу циркулиращите в стадата вирусни причинители.

STUDIES ON IMMUNOGENIC QUALITY OF VACCINE “TRIVAC”

R.PESHEV*, M.HRISTOV*, K.ALEXANDROV**

*National Diagnostic and Research Veterinary Medicine Institute, “Prof d-r G.Pavlov”, Sofia,

** Private practicing vet in Razgrad city.

Summary

In the current studies is traced the post vaccine immunity against bovine herpes virus-1 (BHV-1), mucosal disease-virus diarrhea (BVDV) and paramyxovirus parainfluenzae 3 (PI-3) viruses after treatment with combined vaccine “Trivac”

Russia, and intended for use in big ruminants. On calves vaccinated with recommended scheme, the vaccine is investigated for harmless and immunogenicity enough to protect the immunized calves against circulated on the field virus agents. and it is determined, that the vaccine is harmless and immunogenic and create high antibody titers against the three components presented in the vaccine. The antibodies titers after 180 days decrease slowly, but they are still

