

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ АДЬЮВАНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРС: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА МОДЕЛИ КРОЛИКОВ

А. Курмашева¹*, Ж. Саметова², Ж. Аманова², А. Үсембай³,
Р. Абитаев², Ш. Тұрыскелді², Д. Тоқтырова², Ж. Кондибаева²

¹НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Алматы, Казахстан

²ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Казахстан

³КГУ «Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина», Бишкек, Кыргызская Республика

[*kurmashevaalina3@gmail.com](mailto:kurmashevaalina3@gmail.com)

Аннотация. Инфекционный ринотрахеит (ИРТ) и вирусная диарея (ВД) крупного рогатого скота (КРС) относятся к числу наиболее распространенных вирусных инфекций, наносящих значительный экономический ущерб животноводству. Эффективность инаktivированных вакцин против данных заболеваний в значительной степени определяется выбором адьювантной системы, обеспечивающей формирование выраженного и продолжительного иммунного ответа. Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка физической стабильности, безопасности и иммуногенности экспериментальной ассоциированной инаktivированной вакцины против ИРТ и ВД КРС с различными коммерческими адьювантами Montanide® для обоснования выбора оптимальной адьювантной системы. Экспериментальные вакцины готовили на основе инаktivированных вирусосодержащих суспензий штамма «Р-93» вируса ИРТ и штамма «OregonC₂₄V» вируса ВД с использованием адьювантов Montanide ISA 70 VG, Montanide ISA 61 VG и Montanide GEL 01 PR. Физическую стабильность препаратов оценивали методом ускоренного термостатирования, а безопасность и иммуногенность – на модели кроликов после однократной внутримышечной иммунизации с определением титров вируснейтрализующих антител (ВНА) в реакции нейтрализации. Все исследованные вакцины сохраняли физическую стабильность в течение 10 суток термостатирования, не вызывали клинически значимых местных нежелательных реакций и характеризовались хорошей переносимостью. Наиболее высокие титры ВНА к обоим вирусам были зарегистрированы при использовании Montanide ISA 70 VG и Montanide GEL 01 PR, тогда как антигены без адьюванта индуцировали менее выраженный гуморальный иммунный ответ. Комплексная оценка позволила обосновать выбор Montanide ISA 70 VG в качестве наиболее перспективного адьюванта для дальнейшей разработки отечественной ассоциированной инаktivированной вакцины против ИРТ и ВД КРС.

Ключевые слова: инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота; вирусная диарея крупного рогатого скота; ассоциированная инаktivированная вакцины; адьюванты; Montanide; иммуногенность; вируснейтрализующие антитела; модель кроликов

Введение

Инфекционный ринотрахеит (ИРТ) и вирусная диарея (ВД) крупного рогатого скота (КРС) относятся к числу наиболее экономически значимых вирусных заболеваний,

оказывающих существенное влияние на мировое молочное и мясное скотоводство. Возбудитель ИРТ – бычий герпесвирус 1 типа (*Bovine alphaherpesvirus 1*, BoHV-1) – вызывает заболевания респираторной и репродуктивной систем [1]. Вирус ВД (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV) относящийся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, способен вызывать иммуносупрессию, репродуктивные нарушения, заболевания желудочно-кишечного тракта [2]. Экономический ущерб, обусловленный циркуляцией обоих вирусов, складывается из снижения продуктивности животных, затрат на лечение, ухудшения воспроизводительных показателей и ограничений международной торговли [3]. Особую проблему представляет сочетанная циркуляция BoHV-1 и BVDV в стадах КРС. Иммуносупрессивное действие BVDV значительно повышает восприимчивость животных к другим инфекционным агентам, включая BoHV-1, что приводит к более тяжелому клиническому течению заболевания и увеличению экономических потерь. Коинфекция сопровождается более выраженным поражением органов дыхания и репродуктивной системы, увеличением продолжительности вирусывыделения и усилением вторичных бактериальных осложнений [4]. Кроме того, установлена статистически значимая связь между инфицированием BVDV и повышенной серопозитивностью животных по BoHV-1, что подтверждает тесную эпизоотологическую взаимосвязь данных инфекций [5].

Для Республики Казахстан проблема ИРТ и ВД также остается актуальной. Согласно результатам сероэпизоотологического мониторинга, проведенного в различных регионах страны, антитела к BoHV-1 выявлены более чем у 45% исследованных животных [6], что свидетельствует о широком распространении инфекции среди поголовья КРС. Аналогично, исследования последних лет демонстрируют высокую серопозитивность животных к BVDV, достигающую более 90% в отдельных хозяйствах [7], что указывает на активную циркуляцию вируса и необходимость совершенствования мер специфической профилактики.

Наиболее эффективным методом контроля обеих инфекций остается вакцинация. В настоящее время в ветеринарной практике применяются живые аттенуированные и инаktivированные вакцины. Несмотря на способность живых вакцин индуцировать напряженный иммунный ответ, их применение ограничено возможностью остаточной вирулентности, риском использования у стельных животных и потенциальной рекомбинацией вакцинных штаммов. В связи с этим, инаktivированные вакцины рассматриваются как более безопасная альтернатива для программ массовой иммунизации, особенно в племенных и репродуктивных хозяйствах [8]. Одним из ключевых факторов, определяющих эффективность инаktivированных вакцин, является выбор адъюванта. Помимо усиления иммунного ответа, адъюванты оказывают влияние на стабильность препарата и выраженность местных поствакцинальных реакций. В ветеринарной вакцинологии широкое распространение получили адъюванты серии Montanide®, однако сравнительные данные об эффективности различных адъювантных систем при создании ассоциированных инаktivированных вакцин против ИРТ и ВД КРС, особенно применительно к отечественным разработкам, остаются ограниченными. В настоящее время производство отечественных вакцин против ИРТ и ВД КРС отсутствует. Их разработка позволит расширить ассортимент средств специфической профилактики, снизить стоимость вакцинации и снизить зависимость ветеринарной службы от импортных иммунобиологических препаратов. Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка физической стабильности, безопасности и иммуногенности экспериментальной вакцины против ИРТ и ВД КРС с различными коммерческими адъювантами Montanide® для обоснования выбора оптимальной адъювантной системы при разработке отечественного иммунопрепарата.

Материалы и методы

Вирусы, культуры клеток. В экспериментальных исследованиях использовали штамм «Р-93» вируса ИРТ и штамм «Oregon C₂₄V» вируса ВД, полученные из лаборатории «Коллекция микроорганизмов» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ), Республика Казахстан.

В качестве системы культивирования вирусов использовали перевиваемую культуру клеток MDBK (CCL-22™) и первично-трипсинизированную культуру клеток тестикул ягнят (ТЯ), полученные из лаборатории «Клеточная биотехнология» НИИПББ. Культивирование вирусов, получение вирусосодержащих суспензий (ВСС) и их химическую инактивацию проводили по ранее опубликованной методике без модификаций [9]. Биологическая активность ВСС до инактивации составляла $6,83 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ для ВоНВ-1 и $5,33 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ для ВВДВ.

Приготовление экспериментальных вакцин. Инактивированные ВСС ВоНВ-1 и ВВДВ объединяли в объемном соотношении 1:1. Полученную антигенную смесь использовали для приготовления трех вариантов ассоциированной вакцины с различными адъювантами. Для приготовления экспериментальных вакцин использовали коммерческие адъюванты Montanide ISA 70 VG, Montanide ISA 61 VG и Montanide GEL 01 PR (SEPPIC, La Garenne-Colombes, France). ВСС соединяли с адъювантами в соотношениях, рекомендованных производителем (ISA 70 VG – 30:70, ISA 61 VG – 40:60; GEL 01 PR – 90: 10). При приготовлении вакцины с Montanide GEL 01 PR соединяли ВСС с адъювантом и перемешивали вручную до получения однородной консистенции. ВСС с адъювантами Montanide ISA 70 VG и Montanide ISA 61 VG эмульгировали с использованием роторно-статорного диспергатора с насадкой S 18 N – 19 G (IKA, Staufen, Germany) при скорости вращения 6000 об/мин в течение 60 мин до получения однородной эмульсии. Готовые вакцинные препараты асептически фасовали во флаконы объемом 100 мл, герметично укупоривали резиновыми пробками и хранили при температуре 2–8°C до использования.

Оценка физической стабильности вакцин. Физическую стабильность экспериментальных вакцин оценивали методом ускоренного термостатирования. Для исследования использовали по три флакона каждого варианта вакцины ($n = 3$). После выдерживания при комнатной температуре содержимое флаконов тщательно перемешивали. Из каждого флакона одной серии отбирали по 10 мл вакцины, объединяли в стерильном сосуде и пипетировали. Полученную смесь распределяли по трем стерильным сосудам, герметично укупоривали резиновыми пробками и помещали в термостат при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 10 суток. По окончании термостатирования оценивали физическую стабильность вакцинных эмульсий по наличию или отсутствию расслоения, изменению консистенции и сохранению однородности препарата.

Лабораторные животные и дизайн исследования. Исследование выполнено весной 2024 года на 15 клинически здоровых кроликах породы советская шиншилла в возрасте 4–6 месяцев массой 1,5–2,0 кг. До начала исследования все животные были серонегативными к ВоНВ-1 и ВВДВ, что подтверждали реакцией нейтрализации вируса (РН). Перед началом эксперимента животных выдерживали на карантине в течение 14 суток с ежедневным клиническим осмотром и термометрией. Кроликов содержали в условиях вивария при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности $55 \pm 10 \%$ и 12 часовом световом дне. Животные получали стандартный гранулированный полнорационный комбикорм и имели свободный доступ к воде (*ad libitum*).

Животных идентифицировали индивидуальными ушными бирками с номерами от 1 до 15. Распределение по экспериментальным группам осуществляли методом простой рандомизации с использованием онлайн-инструмента <http://castlots.org>. Кроликов случайным образом распределили на пять групп по три животных в каждой. Планирование эксперимента, формирование групп и представление результатов выполнены в соответствии с руководящими принципами ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).

Иммунизация животных. Перед применением экспериментальные вакцины тщательно встряхивали до получения однородной суспензии.

Животных однократно иммунизировали внутримышечно в заднюю конечность в дозе 1,0 мл. Кроликам первой группы вводили вакцину с адъювантом Montanide GEL 01 PR, второй группы – с Montanide ISA 70 VG, третьей группы – с Montanide ISA 61 VG.

Животным четвертой группы вводили инактивированную ВСС, содержащую объединенные антигены BoHV-1 и BVDV без добавления адъюванта, а пятой группе – физиологический раствор (таблица 1).

Таблица 1 – Экспериментальный дизайн исследования

Группа	Препарат	Адъювант	n	Доза	Путь введения
1	Ассоциированная вакцина	Montanide GEL 01 PR	3	1,0 мл	внутримышечно
2		Montanide ISA 70 VG			
3		Montanide ISA 61 VG			
4	Антигены без адъюванта	-			
5	Плацебо	-			

Клиническое наблюдение за животными проводили качественно (без стандартизированной шкалы оценки местных реакций) ежедневно в течение 21 суток после иммунизации. Для минимизации систематической ошибки исследователи, проводившие ежедневное клиническое наблюдение и оценку местных поствакцинальных реакций, не были осведомлены о принадлежности животных к экспериментальным группам (*single-blind design*).

Определение титров вируснейтрализующих антител (ВНА). Образцы крови отбирали у всех животных на 7-е, 14-е и 21-е сутки после иммунизации из краевой ушной вены в вакуумные пробирки с активатором свертывания и гелем. Затем, получали сыворотки крови, а титры ВНА к BoHV-1 и BVDV определяли в РН в культуре клеток MDBK и ТЯ в трех независимых повторности согласно [9]. Иммуногенность вакцин оценивали по уровню ВНА, титры выражали в $\log_2$, соответствующий максимальному двукратному разведению сыворотки, обеспечивающего полную нейтрализацию вируса. Защитными считали титры $\geq 3 \log_2$ [10].

Биоэтические аспекты. Все процедуры с лабораторными животными выполняли в соответствии с национальными требованиями по содержанию и использованию экспериментальных животных, а также рекомендациями AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (2020). Исследование было одобрено Локальной комиссией по биоэтике ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (протокол № 1 от 14 июля 2023 года).

По завершении эксперимента животных подвергали гуманной эвтаназии. Общую анестезию проводили внутримышечным введением кетамина в дозе 35 мг/кг массы тела и ксилазина в дозе 5 мг/кг массы тела. После подтверждения глубокой анестезии (отсутствие реакции на тактильную стимуляцию) внутрисердечно вводили раствор хлорида калия в дозе 150 мг/кг.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism версии 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Титры ВНА переводили в логарифмы по основанию 2 ($\log_2$) и представляли в виде среднего значения (M) $\pm$ стандартного отклонения (SD). Поскольку численность животных в каждой экспериментальной группе была небольшой ($n = 3$), для сравнения титров ВНА к BoHV-1 и BVDV между группами (1, 2, 3 и 4) на 21-е сутки после вакцинации использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Группа плацебо использовалась в качестве отрицательного контроля и в статистическое сравнение эффективности вакцин не включалась.

Результаты

Физическая стабильность экспериментальных вакцин. После приготовления, вакцины

с адъювантами Montanide ISA 70 VG и Montanide ISA 61 VG представляли собой однородные эмульсии желтовато-белого цвета с осадком розового цвета без видимых механических включений. Вакцина, приготовленная с использованием Montanide GEL 01 PR, имела вид однородной суспензии оранжевого цвета (рисунок 1).

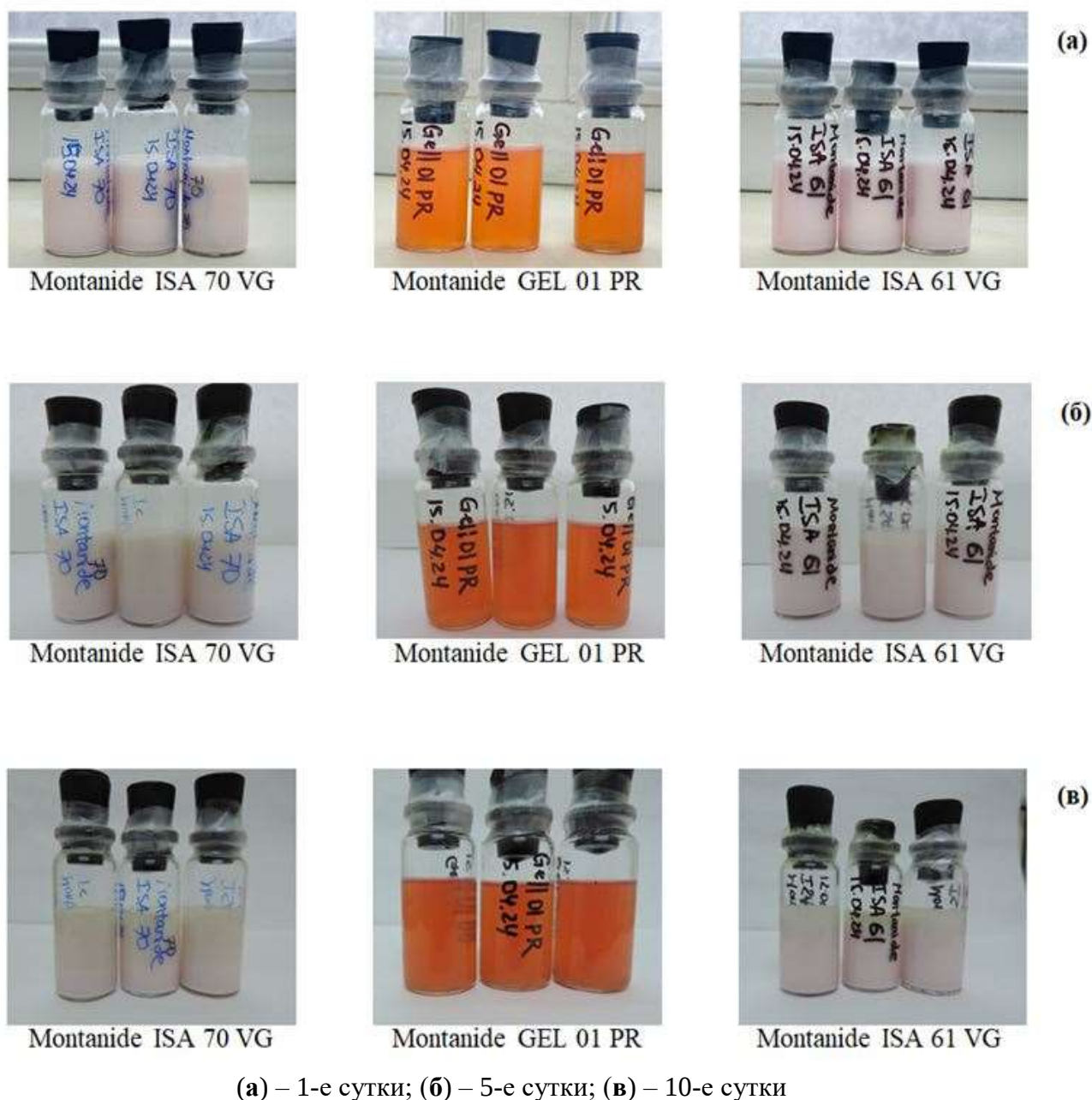


Рисунок 1 – Оценка физической стабильности экспериментальных вакцин с различными адъювантами методом ускоренного термостатирования.

В течение 10 суток ускоренного термостатирования при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ни в одном из исследуемых образцов не выявлено признаков нарушения физической стабильности. Во всех вакцинах сохранялись однородность эмульсии, исходная консистенция и цвет. Выпадения осадка, образования прозрачной водной фазы или расслоения эмульсии не наблюдали. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследованные адъювантные системы обеспечивали получение физически стабильных вакцинных препаратов в течение всего периода испытания.

Клиническое состояние животных после вакцинации. В течение 21 суток после иммунизации все кролики сохраняли удовлетворительное общее состояние. Температура тела животных находилась в пределах физиологической нормы в диапазоне 35,6–39,3 °С и не сопровождалась клиническими признаками лихорадки или угнетения. На протяжении всего периода наблюдения у животных всех экспериментальных групп местных поствакцинальных реакций в области введения препарата (отек, гиперемия) не зарегистрировано. У одного кролика, иммунизированного вакциной с адъювантом Montanide ISA 70 VG, на четвертые сутки наблюдали незначительную слизь из глаз, которое самостоятельно исчезло без какого-либо лечения в течение последующих суток и не сопровождалось изменением общего состояния животного. Таким образом, применение всех исследованных вариантов вакцины характеризовалось хорошей переносимостью и отсутствием клинически значимых местных или системных нежелательных реакций.

Иммуногенность экспериментальных вакцин. До вакцинации, а также на 7-е и 14-е сутки после иммунизации ВНА к BoHV-1 и BVDV в сыворотках крови животных не выявлялись. Результаты 21 суток представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Титры ВНА на 21-е сутки после вакцинации

Группа	Адъювант	BoHV-1 ($\log_2$, $M \pm SD$)	BVDV ($\log_2$, $M \pm SD$)
1	Montanide GEL 01 PR	$3,67 \pm 0,58$	$4,00 \pm 0,00$
2	Montanide ISA 70 VG	$3,33 \pm 0,58$	$3,67 \pm 0,58$
3	Montanide ISA 61 VG	$2,67 \pm 0,58$	$3,00 \pm 0,00$
4	Без адъюванта	$2,00 \pm 0,00$	$1,67 \pm 0,58$
5	Плацебо	0	0

Для объективной оценки влияния различных адъювантных систем на уровень гуморального иммунного ответа выполнено статистическое сравнение титров ВНА между вакцинированными группами. Критерий Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые различия между исследуемыми вариантами вакцин как при определении антител к BoHV-1 ($H = 8,17$; $df = 3$; $p = 0,043$), так и к BVDV ($H = 8,52$; $df = 3$; $p = 0,036$). Однако при последующих множественных попарных сравнениях по критерию Данна статистически значимых различий между группами после поправки на множественные сравнения не установлено ($p > 0,05$). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий при попарном сравнении, наиболее высокие средние титры ВНА к обоим вирусам были зарегистрированы у животных, иммунизированных вакцинами с адъювантами Montanide GEL 01 PR и Montanide ISA 70 VG. Вакцина без адъюванта индуцировала наиболее низкий уровень гуморального иммунного ответа. Применение Montanide ISA 61 VG обеспечивало несколько менее выраженный гуморальный иммунный ответ, но согласно критериям оценки иммуногенности ($\geq 3 \log_2$), не соответствовало требованиям по минимальному защитному уровню. Данный порог был использован как ориентировочный критерий, экстраполированный из исследований КРС

Обсуждение. Разработка современных инактивированных вакцин против ИРТ и ВД КРС представляет собой многоэтапный процесс, включающий не только подбор антигенного состава, но и оптимизацию адъювантной системы о которой в значительной степени зависят стабильность препарата, его безопасность и выраженность индуцируемого иммунного ответа.

Одним из критериев, определяющих качество инактивированной вакцины, является ее физическая стабильность. Для эмульсионных препаратов нарушение структуры эмульсии сопровождается изменением дисперсной фазы, снижением воспроизводимости дозирования и, как следствие, уменьшением эффективности вакцинации. Поэтому испытания методом ускоренного термостатирования широко используются как один из обязательных этапов предварительной оценки вакцинных препаратов. В настоящем исследовании ни одна из

исследуемых экспериментальных вакцин не продемонстрировала признаков расслоения, выпадения осадка или образования свободной водной фазы в течение 10 суток термостатирования. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как эмульсионные адъюванты Montanide ISA 70 VG и Montanide ISA 61 VG, так и полимерный адъювант Montanide GEL 01 PR обеспечивают получение физически стабильных вакцинных препаратов.

Не менее важным этапом является оценка безопасности экспериментальных вакцин. В настоящем исследовании все экспериментальные препараты характеризовались хорошей переносимостью. На протяжении всего периода наблюдения не зарегистрировано местных воспалительных реакций, снижения аппетита, угнетения или других признаков системного воздействия вакцин. Единственным отклонением стало кратковременная слезь из глаза у одного животного, иммунизированного вакциной с Montanide ISA 70 VG, которая самостоятельно исчезла без какого-либо лечения и не сопровождалась изменением общего состояния. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым современные адъюванты Montanide характеризуются благоприятным профилем безопасности при использовании в составе ветеринарных вакцин против различных инфекционных заболеваний [11, 12].

Следует отметить, что после завершения оценки физической стабильности и переносимости существенных различий между исследуемыми вариантами вакцин выявлено не было. Все три адъювантные системы удовлетворяли требованиям, предъявляемым к экспериментальным препаратам на этапе лабораторной разработки. В связи с этим иммуногенность стала тем критерием, который определял дальнейший выбор оптимального адъюванта.

Использование кроликов в качестве модели для первичной оценки вакцинных препаратов представляется обоснованным и соответствует современным экспериментальным подходам. Кролики успешно применяются при изучении иммуногенности как инаktivированных, так и субъединичных, рекомбинантных и векторных вакцин против герпесвирусных инфекций КРС благодаря способности формировать выраженный гуморальный иммунный ответ [13, 14, 15]. Вместе с тем данная модель предназначена, прежде всего, для сравнительной оценки экспериментальных вакцинных образцов и не заменяет исследований у целевого вида животных. Следовательно уровень ВНА у кроликов не может напрямую рассматриваться как показатель продолжительности и степени защиты КРС.

В отличие от живых вирусных препаратов, инаktivированные антигены практически не способны самостоятельно индуцировать полноценный врожденный иммунный ответ, поэтому эффективность подобных вакцин во многом определяется способностью адъюванта усиливать презентацию антигена и последующую стимуляцию В-лимфоцитов [16]. Традиционно наиболее выраженный гуморальный иммунный ответ связывают с масляными эмульсиями типа «вода в масле». Их эффективность объясняется формированием длительного депо антигена в месте введения и постепенным его высвобождением, что обеспечивает продолжительную стимуляцию иммунной системы [17]. Так, например, в исследованиях Балашова и др. [18] вакцина против бешенства собак на основе ISA 70 VG индуцировала уровень ВНА более чем в 2 раза выше, чем вакцина на основе Montanide GEL 01. В настоящем исследовании результаты РН показали, что включение любого из исследованных адъювантов сопровождалось более интенсивным образованием ВНА по сравнению с препаратом, не содержащим адъюванта. Более высокие средние титры ВНА к обоим вирусам были зарегистрированы после применения вакцин с Montanide GEL 01 PR и Montanide ISA 70 VG. Несколько менее выраженный иммунный ответ наблюдался при использовании Montanide ISA 61 VG. Однако этот результат ISA 61 VG не следует интерпретировать как свидетельство более низкой иммунологической активности данного адъюванта. Напротив, многочисленные исследования демонстрируют его высокую эффективность при создании ветеринарных вакцин различного назначения [12, 19].

Возможно, в наших исследованиях эффективность адъюванта определяется не только его физической природой, но и другими особенностями. Вероятнее всего различия обусловлены особенностями состава исследуемой вакцины, включающей комбинацию двух вирусных антигенов, их концентрацией, а также особенностями иммунного ответа породы лабораторных кроликов.

Следует учитывать и ограничения настоящего исследования.

1. Работа выполнена на ограниченном количестве лабораторных животных ($n = 3$ на группу). Статистический анализ подтвердил наличие общего влияния типа адъювантной системы на уровень гуморального иммунного ответа, но статистически значимых различий при попарном сравнении не выявлено, что ограничивает статистическую мощность исследования.

2. Иммунный ответ оценивали только по уровню ВНА без определения показателей клеточного иммунитета и длительности поствакцинальной защиты.

Однако подобный дизайн полностью соответствовал поставленной задаче – выбору оптимального состава экспериментальной вакцины на этапе лабораторной разработки.

Несмотря на несколько более высокие средние титры антител, зарегистрированные при использовании Montanide GEL 01 PR, статистически значимых различий между группами Montanide GEL 01 PR и Montanide ISA 70 VG выявлено не было. Стоит отметить, что масляные эмульсионные адъюванты, в частности серии Montanide ISA, широко применяются при производстве коммерческих ветеринарных вакцин. Этот дополнительный критерий послужил основанием для выбора Montanide ISA 70 VG при дальнейшей разработке ассоциированной вакцины против ИРТ и ВД КРС, эффективность которой впоследствии была подтверждена при испытаниях на целевом виде животных при формировании длительного гуморального иммунитета [20] и обеспечении колюстральной защиты телят [9]. Таким образом, проведенное исследование показывает, что выбор адъювантной системы должен основываться не на одном показателе, а на комплексной оценке.

Заключение. В настоящем исследовании проведена сравнительная оценка экспериментальных вариантов ассоциированной инактивированной вакцины против ИРТ и ВД КРС, содержащих различные коммерческие адъюванты. Установлено, что все исследованные адъювантные системы обеспечивали получение физически стабильных образцов вакцин, сохранявших однородность и отсутствие признаков расслоения в условиях ускоренного термостатирования, а также характеризовались хорошей переносимостью при однократном внутримышечном введении кроликам. Включение адъювантов в состав вакцины сопровождалось более выраженной индукцией ВНА по сравнению с препаратом без адъюванта, что подтверждает их ключевую роль в формировании гуморального иммунного ответа при использовании инактивированных вакцин. Комплексная оценка позволила обосновать выбор Montanide ISA 70 VG в качестве наиболее перспективного адъюванта для дальнейшей разработки отечественной ассоциированной инактивированной вакцины против ИРТ и ВД КРС, что имеет практическое значение в ветеринарном секторе страны.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (BR218004/0223).

Благодарности: Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории «Технологии культивирования микроорганизмов», «Клеточной биотехнологии» и «Коллекции микроорганизмов», за оказанную помощь при выполнении НИР по теме статьи.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Булатов Е.А., Курмашева А.К. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: краткий обзор // Биобезопасность и Биотехнология. – 2024. – № 18. – С. 19-43. <https://doi.org/10.58318/2957-5702-2024-18-19-43>.

2. Cui H., Ren B., Wang L., Chen J., Li J., Hu W., Yang Y. Enhanced pathogenicity and synergistic effects of co-infection with bovine viral diarrhea virus 1 and HoBi-like virus in cattle and guinea pigs // *Front. Vet. Sci.* – 2024. – Vol. 11. – P. 1464745. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1464745>.
3. Newcomer B.W., Walz P.H., Givens M.D., Wilson A.E. Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis // *Theriogenology*. – 2015. – Vol. 83 (3). – P. 360–365.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.028>.
4. Hou Z., Wang J., Tan B., Zhang S. A systematic study of bovine viral diarrhoea virus co-infection with other pathogens // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17 (5). – P. 700. <https://doi.org/10.3390/v17050700>.
5. Barrett D., Lane E.A., Lozano J.M., O'Keeffe K., Byrne A.W. Bovine herpes virus type 1 (BoHV-1) seroprevalence, risk factor and bovine viral diarrhoea (BVD) co-infection analysis from Ireland // *Sci. Rep.* – 2024. – Vol. 14 (1). – P. 867. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50433-5>.
6. Омарова Г., Байкадамова Г., Аканова Ж., Асауова Ж. Серопревалентность инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в Казахстане: динамика распространения в 2021-2022 годах // *3i: intellect, idea, innovation – интеллект, идея, инновация*. – 2024. – № 4. – С. 16–23. https://doi.org/10.52269/22266070_2024_4_16.
7. Башенова Э., Нисанова Р., Жармухаметова А., Акшалова П., Сериков М., Маманова С., Кирпиченко В. Отбор высокопозитивных образцов сыворотки крови от крупного рогатого скота, инфицированного вирусной диареей // *Евразийский журнал прикладной биотехнологии*. – 2024. – № 3. – С. 66–72. <https://doi.org/10.11134/btp.3.2024.7>.
8. Smith B.I., Rieger R.H., Dickens C.M., Schultz R.D., Aceto H. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine // *Am. J. Vet. Res.* – 2015. – Vol. 76 (10). – P. 913–920. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.10.913>.
9. Bulatov Y., Kurmasheva A., Amanova Z., Abitaev R., Sametova Z., Kyrgyzbayeva A., Kondybaeva Z., Turyskeldi S., Ussembay A., Toktyrova D., Mazbayeva D., Shayakhmetov Y., Kerimbayev A., Khussainov D., Wentao M., Rsaliyev A., Abduraimov Y. The Influence of the associated inactivated vaccine against infectious rhinotracheitis and bovine viral diarrhea on the formation and duration of colostral immunity in kazakh whiteheaded calves // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13(4) – P. 408. <https://doi.org/10.3390/vaccines13040408>.
10. Frey M.L. One year antibody responses of four inactivated infectious bovine rhinotracheitis-bovine viral diarrhea vaccines // *Bov. Pract.* – 1989. – Vol. 24. – P. 18–21. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol0no24p18-21>.
11. Ahmed D.A.A., Sadiek Y., Eldin M.S., Ibrahim R.S., Amen O., Abodalal S.E.S.A. Evaluation of comparative effect between aluminum hydroxide gel and montanide (ISA 70) in potency and protection of locally prepared rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) vaccines in rabbits // *BMC Vet. Res.* – 2024. – Vol. 20 (1). – P. 407. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04239-w>.
12. Fegan J.E., Waeckerlin R.C., Tesfaw L., Islam E.A., Deresse G., Dufera D., Assefa E., Woldemedhin W., Legesse A., Akalu M., Bayissa B., Nguyen Q.H., Ng D., Ahn S.K., Schryvers A.B., Tefera T.A., Moraes T.F., Gray-Owen S.D. Developing a PmSLP3-based vaccine formulation that provides robust long-lasting protection against hemorrhagic septicemia-causing serogroup B and E strains of *Pasteurella multocida* in cattle // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1392681. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1392681>.
13. Zhang S., Zhang Y., Liu G., Wang C., Ji Y., Chen J., Hu C., Chen X., Guo A., Chen Y. The safety and protective efficacy evaluation of an attenuated *M. bovis*-BoHV-1 bivalent vaccine in rabbits // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11 (11). – P. 1698. <https://doi.org/10.3390/vaccines11111698>.
14. Ruiz-Sáenz J., Jaime J., Vera V. An inactivated vaccine from a field strain of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) has high antigenic mass and induces strong efficacy in a rabbit model // *Virol. Sin.* – 2013. – Vol. 28 (1). – P. 36–42. <https://doi.org/10.1007/s12250-013-3283-z>.
15. Donofrio G., Cavirani S., Vanderplasschen A., Gillet L., Flammini C.F. Recombinant

bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13 (11). – P. 1246–1254. <https://doi.org/10.1128/CVI.00200-06>.

16. Yao Y., Zhang Z., Yang Z. The combination of vaccines and adjuvants to prevent the occurrence of high incidence of infectious diseases in bovine // *Front. Vet. Sci.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1243835. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1243835>.

17. Jansen T., Hofmans M., Theelen M., Schijns V. Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23 (8). – P. 1053–1060. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.08.023>.

18. Балашов А.Н., Доронин М.И., Борисов А.В., Лозовой Д.А., Михалишин Д.В., Стариков В.А. Изучение гуморального иммунитета собак при использовании антирабических инактивированных вакцин, изготовленных с применением адъювантов Montanide ISA 70 VG и GEL 01 // *Ветеринария сегодня.* – 2020. – № 1 (32). – С. 25–30. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-25-30>.

19. Khorasani A., Madadgar O., Soleimanjahi H., Keyvanfar H., Mahravani H. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle // *Iran. J. Vet. Res.* – 2016. – Vol. 17 (1). – P. 8–12. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2016.3596>.

20. Bulatov Y., Sametova Z., Abitayev R., Kyrgyzbayeva A., Ussembay A., Kondibaeva Z., Amanova Z., Turyskeldy S., Toktyrova D., Mazbayeva D., Shorayeva K., Jekebekov K., Zhugunissov K., Barakbayev K., Kerimbayev A., Rsaliyev A., Abduraimov Y., Kurmasheva A. Duration of immunity against infectious rhinotracheitis and bovine viral diarrhea after vaccination in calves in southern region of Kazakhstan // *Front. Vet. Sci.* – 2025. – Vol. 12. – P. 1681624. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1681624>.

References

1. Bulatov E.A., Kurmasheva A.K. (2024) Infekcionnyj rinotraheit krupnogo rogatogo skota: kratkij obzor [Infectious bovine rhinotracheitis: a brief overview]. *Biosafety and Biotechnology*, no 18, pp. 19-43. <https://doi.org/10.58318/2957-5702-2024-18-19-43>.

2. Cui H., Ren B., Wang L., Chen J., Li J., Hu W., Yang Y. Enhanced pathogenicity and synergistic effects of co-infection with bovine viral diarrhea virus 1 and HoBi-like virus in cattle and guinea pigs // *Front. Vet. Sci.* – 2024. – Vol. 11. – P. 1464745. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1464745>.

3. Newcomer B.W., Walz P.H., Givens M.D., Wilson A.E. Efficacy of bovine viral diarrhea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis // *Theriogenology.* – 2015. – Vol. 83 (3). – P. 360–365.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.028>.

4. Hou Z., Wang J., Tan B., Zhang S. A systematic study of bovine viral diarrhoea virus co-infection with other pathogens // *Viruses.* – 2025. – Vol. 17 (5). – P. 700. <https://doi.org/10.3390/v17050700>.

5. Barrett D., Lane E.A., Lozano J.M., O'Keeffe K., Byrne A.W. Bovine herpes virus type 1 (BoHV-1) seroprevalence, risk factor and bovine viral diarrhoea (BVD) co-infection analysis from Ireland // *Sci. Rep.* – 2024. – Vol. 14 (1). – P. 867. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50433-5>.

6. Omarova G., Bajkadamova G., Akanova ZH., Asauova ZH. (2024) Seroprevalentnost' infekcionnogo rinotraheita krupnogo rogatogo skota v Kazahstane: dinamika rasprostraneniya v 2021-2022 godah [Seroprevalence of infectious bovine rhinotracheitis in Kazakhstan: propagation dynamics in 2021-2022]. *3i: intellect, idea, innovation*, no 4, pp. 16–23. https://doi.org/10.52269/22266070_2024_4_16.

7. Bashenova E., Nisanova R., Zharmuhametova A., Akshalova P., Serikov M., Mamanova S., Kirpichenko V. (2024) Otbor vysokopozitivnyh obrazcov syvorotki krovi ot krupnogo rogatogo skota, inficirovannogo virusnoj diareej [Selection of strong positive serum samples from cattle infected with bovine viral diarrhea]. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, no 3, pp. 66–72. <https://doi.org/10.11134/btp.3.2024.7>.

8. Smith B.I., Rieger R.H., Dickens C.M., Schultz R.D., Aceto H. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine // *Am. J. Vet. Res.* – 2015. – Vol. 76 (10). – P. 913–920. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.10.913>.
9. Bulatov Y., Kurmasheva A., Amanova Z., Abitayev R., Sametova Z., Kyrgyzbayeva A., Kondybaeva Z., Turyskeldi S., Ussembay A., Toktyrova D., Mazbayeva D., Shayakhmetov Y., Kerimbayev A., Khussainov D., Wentao M., Rsaliyev A., Abduraimov Y. The Influence of the associated inactivated vaccine against infectious rhinotracheitis and bovine viral diarrhea on the formation and duration of colostral immunity in kazakh whiteheaded calves // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13(4) – P. 408. <https://doi.org/10.3390/vaccines13040408>.
10. Frey M.L. One year antibody responses of four inactivated infectious bovine rhinotracheitis-bovine viral diarrhea vaccines // *Bov. Pract.* – 1989. – Vol. 24. – P. 18–21. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol0no24p18-21>.
11. Ahmed D.A.A., Sadiek Y., Eldin M.S., Ibrahim R.S., Amen O., Abodalal S.E.S.A. Evaluation of comparative effect between aluminum hydroxide gel and montanide (ISA 70) in potency and protection of locally prepared rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) vaccines in rabbits // *BMC Vet. Res.* – 2024. – Vol. 20 (1). – P. 407. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04239-w>.
12. Fegan J.E., Waeckerlin R.C., Tesfaw L., Islam E.A., Deresse G., Dufera D., Assefa E., Woldemedhin W., Legesse A., Akalu M., Bayissa B., Nguyen Q.H., Ng D., Ahn S.K., Schryvers A.B., Tefera T.A., Moraes T.F., Gray-Owen S.D. Developing a PmSLP3-based vaccine formulation that provides robust long-lasting protection against hemorrhagic septicemia-causing serogroup B and E strains of *Pasteurella multocida* in cattle // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1392681. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1392681>.
13. Zhang S., Zhang Y., Liu G., Wang C., Ji Y., Chen J., Hu C., Chen X., Guo A., Chen Y. The safety and protective efficacy evaluation of an attenuated *M. bovis*-BoHV-1 bivalent vaccine in rabbits // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11 (11). – P. 1698. <https://doi.org/10.3390/vaccines11111698>.
14. Ruiz-Sáenz J., Jaime J., Vera V. An inactivated vaccine from a field strain of bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) has high antigenic mass and induces strong efficacy in a rabbit model // *Virol. Sin.* – 2013. – Vol. 28 (1). – P. 36–42. <https://doi.org/10.1007/s12250-013-3283-z>.
15. Donofrio G., Cavirani S., Vanderplasschen A., Gillet L., Flammini C.F. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13 (11). – P. 1246–1254. <https://doi.org/10.1128/CVI.00200-06>.
16. Yao Y., Zhang Z., Yang Z. The combination of vaccines and adjuvants to prevent the occurrence of high incidence of infectious diseases in bovine // *Front. Vet. Sci.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1243835. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1243835>.
17. Jansen T., Hofmans M., Theelen M., Schijns V. Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23 (8). – P. 1053–1060. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.08.023>.
18. Balashov A.N., Doronin M.I., Borisov A.V., Lozovoj D.A., Mihalishin D.V., Starikov V.A. (2020) Izuchenie gumoral'nogo immuniteta sobak pri ispol'zovanii antirabicheskikh inaktivirovannykh vakcin, izgotovlennykh s primeneniem ad'yuvantov Montanide ISA 70 VG i GEL 01 [Studies on humoral immunity in dogs after use of rabies inactivated vaccines formulated with Montanide ISA 70 VG and GEL 01 adjuvants]. *Veterinary Science Today*, no 1 (32), pp. 25–30. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-1-32-25-30>.
19. Khorasani A., Madadgar O., Soleimanjahi H., Keyvanfar H., Mahravani H. Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle // *Iran. J. Vet. Res.* – 2016. – Vol. 17 (1). – P. 8–12. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2016.3596>.
20. Bulatov Y., Sametova Z., Abitayev R., Kyrgyzbayeva A., Ussembay A., Kondybaeva Z., Amanova Z., Turyskeldy S., Toktyrova D., Mazbayeva D., Shorayeva K., Jekebekov K., Zhugunissov K., Barakbayev K., Kerimbayev A., Rsaliyev A., Abduraimov Y., Kurmasheva A.

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ЖҰҚПАЛЫ РИНОТРАХЕИТІ МЕН ВИРУСТЫҚ ДИАРЕЯСЫНА ҚАРСЫ ЭКСПЕРИМЕНТТІК ҚАУЫМДАСТЫРЫЛҒАН ВАКЦИНАНЫҢ ОҢТАЙЛЫ АДЬЮВАНТТЫҚ ЖҮЙЕСІН ТАҢДАУ: ҚОЯНДАР МОДЕЛІНДЕГІ САЛЫСТЫРМАЛЫ ЗЕРТТЕУ

А. Курмашева¹*, Ж. Саметова², Ж. Аманова², А. Үсембай³,
Р. Абитаев², Ш. Тұрыскелді², Д. Тоқтырова², Ж. Кондибаева²

¹«Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Алматы, Қазақстан

²«QazBioPharm» Ұлттық холдинг «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, Гвардейский, Қазақстан

³«К.И. Скрябин атындағы Қырғыз ұлттық аграрлық университеті» КММ, Бишкек, Қырғыз Республикасы

* kurmashevaalina3@gmail.com

Аннотация. Ірі қара малдың (ІҚМ) жұқпалы ринотрахеиті (ЖРТ) мен вирустық диареясы (ВД) мал шаруашылығына елеулі экономикалық шығын келтіретін ең кең таралған вирустық инфекциялардың қатарына жатады. Аталған ауруларға қарсы инактивтелген вакциналардың тиімділігі айқын әрі ұзаққа созылатын иммундық жауаптың қалыптасуын қамтамасыз ететін адьюванттық жүйені дұрыс таңдауға едәуір дәрежеде байланысты. Осы зерттеудің мақсаты оңтайлы адьюванттық жүйені негіздеу үшін Montanide® коммерциялық адьюванттарының әртүрлі түрлері қолданылған ІҚМ-ның ЖРТ мен ВД-сына қарсы эксперименттік қауымдастырылған инактивтелген вакцинаның физикалық тұрақтылығын, қауіпсіздігін және иммуногендігін салыстырмалы түрде бағалау болды. Эксперименттік вакциналар ЖРТ вирусының «Р-93» штаммы мен ВД вирусының «OregonC₂₄V» штаммының инактивтелген вирусқұрамды суспензиялары негізінде Montanide ISA 70 VG, Montanide ISA 61 VG және Montanide GEL 01 PR адьюванттарын пайдалану арқылы дайындалды. Препараттардың физикалық тұрақтылығы жеделдетілген термостаттау әдісімен бағаланды, ал қауіпсіздігі мен иммуногендігі қояндар моделінде бір реттік бұлшықет ішіне иммундаудан кейін бейтараптандыру реакциясында вирусбейтараптандырушы антиденелердің (ВБА) титрлерін анықтау арқылы зерттелді. Зерттелген вакциналардың барлығы 10 тәулік бойы термостаттау кезінде физикалық тұрақтылығын сақтап, клиникалық тұрғыдан жергілікті жағымсыз реакциялар туғызбады және жақсы көтерімділік көрсетті. Екі вирусқа да қарсы ВБА-ның ең жоғары титрлері Montanide ISA 70 VG және Montanide GEL 01 PR адьюванттарын қолданған кезде тіркелді, ал адьювантсыз антигендер гуморальдық иммундық жауаптың төменірек деңгейін қалыптастырды. Кешенді бағалау нәтижелері ІҚМ-ның ЖРТ пен ВД-сына қарсы отандық қауымдастырылған инактивтелген вакцинаның оңтайлы адьюванты ретінде Montanide ISA 70 VG таңдалуын ғылыми тұрғыдан негіздеуге мүмкіндік берді.

Түйін сөздер: ірі қара малдың жұқпалы ринотрахеиті; ірі қара малдың вирустық диареясы; қауымдастырылған инактивтелген вакцина; адьюванттар; Montanide; иммуногендік; вирусбейтараптандырушы антиденелер; қояндар моделі

SELECTING AN OPTIMAL ADJUVANT SYSTEM FOR AN EXPERIMENTAL ASSOCIATED VACCINE AGAINST INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS AND VIRAL DIARRHEA: A COMPARATIVE STUDY IN A RABBIT MODEL

A. Kurmasheva¹*, Z. Sametova², Z. Amanova², A. Ussembay³, R. Abitayev²,
S. Turiskeldy², D. Toktyrova², Z. Kondibayeva²

¹“Kazakh National Agrarian Research University”, Almaty, Kazakhstan

²“Research Institute for Biological Safety Problems” National Holding “QazBioPharm”,
Gvardeyskiy, Kazakhstan

³“Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin”, Bishkek, Kyrgyz
Republic

* kurmashevaalina3@gmail.com

Abstract. Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine viral diarrhea (BVD) are among the most common viral infections causing significant economic losses in livestock production. The efficacy of inactivated vaccines against these diseases is largely determined by the choice of an adjuvant system that ensures the formation of a pronounced and long-lasting immune response. The aim of this study was to comparatively evaluate the physical stability, safety, and immunogenicity of an experimental associated inactivated vaccine against IBR and BVD formulated with various commercial Montanide® adjuvants to substantiate the choice of the optimal adjuvant system. Experimental vaccines formulations were prepared based on inactivated virus-containing suspensions of the IBR virus strain “R-93” and the BVD virus strain “OregonC₂₄V” using Montanide ISA 70 VG, Montanide ISA 61 VG, and Montanide GEL 01 PR adjuvants. The physical stability of the vaccines was assessed using an accelerated thermostability test, while safety and immunogenicity were assessed in a rabbit model following a single intramuscular immunization, with determination of virus-neutralizing antibody (VNA) titers in a neutralization test. All studied vaccines maintained physical stability for 10 days of incubation, did not cause clinically significant local adverse reactions, and were well tolerated. The highest VNA titers to both viruses were observed in the groups immunized with vaccines formulated with Montanide ISA 70 VG and Montanide GEL 01 PR, while antigens without adjuvant induced a less pronounced humoral immune response. This comprehensive evaluation supported the selection of Montanide ISA 70 VG as the optimal adjuvant for the domestic associated inactivated vaccine against IBR and BVD.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis; bovine viral diarrhea; associated inactivated vaccines; adjuvants; Montanide; immunogenicity; virus-neutralizing antibodies; rabbit model