

## ВИБІР ШТАМУ-КАНДИДАТА ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ КОРОНАВІРУСУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

*А. С. Березенко<sup>1,2</sup>, PhD студент,  
В. В. Недосєков<sup>2</sup>, д-р вет. наук, професор,  
Ф. С. Вабищевич<sup>1</sup>, канд. вет. наук,  
О. В. Годовський<sup>1</sup>, канд. вет. наук*

<sup>1</sup>ТОВ «Біотестлаб»

вул. Володимирська, 57-А, м. Васильків, Київська область, 08600, Україна

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів та природокористування України  
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

[Nastia4477@gmail.com](mailto:Nastia4477@gmail.com)

*Коронавірус ВРХ (ВСоV) – один із найбільш поширених у світі вірусів, що викликає появу захворювання у поголів'я свійських корів. Саме цей вірус спричиняє діарею у дорослих тварин та інфекції респіраторного і шлунково-кишкового тракту в молодняку великої рогатої худоби, що призводить до значних економічних збитків як у молочній, так і в м'ясній ланках тваринництва. ВСоV має один серотип з деякими антигенними варіаціями між різними штамами і, як інші РНК-віруси, мутує в польових умовах, причому в наш час виділені ізоляти мають антигенні відмінності від штампів вірусів виділених раніше. Саме тому для підвищення ефективності захисту тварин потрібні вакцини, що містять більш сучасні або широко перехресно-реагуючі штами коронавірусу ВРХ.*

*Метою даного дослідження було обрати найбільш перспективний штам з виділених на території України ізолятів коронавірусу ВРХ для конструювання ефективної інактивованої вакцини. Для цього було проведено постановку перехресної реакції нейтралізації та було вивчено антигенну спорідненість, відмінність та домінантність між дослідженими польовими ізолятами та еталонним штамом коронавірусу ВРХ.*

*За результатами досліджень встановлено, що між досліджуваними польовими ізолятами та еталоном наявні тісні антигенні зв'язки, адже антигенна спорідненість між досліджуваними ізолятами та еталоном була в межах 83-100 %, що підтверджує той факт, що вони належать до одного серологічного підтипу. Відповідно до результатів досліджень, польовий ізолят коронавірусу ВРХ CV-315 домінує над еталоном KL-2 та ізолятами CV-114 та CV-172, тому його рекомендовано до використання в якості нового виробничого (вакцинного) штаму для розробки ефективної інактивованої вакцини проти коронавірусу ВРХ.*

**Ключові слова.** КОРОНАВІРУС ВРХ, ПОЛЬОВІ ІЗОЛЯТИ, АНТИГЕННА СПОРІДНЕНІСТЬ ВІРУСІВ, ДОМІНАНТНІ ШТАМИ ВІРУСІВ, РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ.

## SELECTION OF CANDIDATE STRAIN FOR VACCINE AGAINST BOVINE CORONAVIRUS PRODUCTION

A. S. Berezenko<sup>1,2</sup>, V. V. Nedosekov<sup>2</sup>, F. S. Vabishchevych<sup>1</sup>, O. V. Godovski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotestlab LLC

57-A, Vladimirska str., Vasilkiv, 08600, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

15, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

[Nastia4477@gmail.com](mailto:Nastia4477@gmail.com)

Bovine coronavirus (BCoV) is one of the most common viruses in the world, causing the disease in domestic cows. This is the virus that causes diarrhea in adult animals and infections of the respiratory and gastrointestinal tract in young cattle, leading to significant economic losses in both dairy and beef animal breeding. BCoV has one serotype with some antigenic variations between different strains and, like other RNA viruses, mutates in the field conditions, and now the isolated isolates have antigenic differences from the strains of viruses isolated previously. That is why vaccines containing more modern or widely cross-reactive strains of bovine coronavirus are needed to increase the effectiveness of animal protection.

The aim of this study was to select the most promising strain of bovine coronavirus isolates isolated in Ukraine for the construction of an effective inactivated vaccine. For this purpose, a cross-neutralization reaction was performed and the antigenic relationship, difference and dominance between the studied field isolates and the reference strain of bovine coronavirus were studied.

According to the study's results, there are close antigenic linkages between the studied field isolates and the reference strain, as the antigenic relationship between the studied isolates and the reference was in the range of 83-100%, which confirms the fact that they belong to the same serological subtype. According to the research results, the field isolate of bovine coronavirus CV-315 dominates over the reference KL-2 and field isolates CV-114 and CV-172, so it is recommended for use as a new production (vaccine) strain for the development of an effective inactivated bovine coronavirus vaccine.

**Keywords.** BOVINE CORONAVIRUS, FIELD ISOLATES, ANTIGENIC RELATIONSHIP OF VIRUSES, DOMINANT VIRUS STRAINS, NEUTRALIZATION REACTION.

Коронавірус ВРХ (BCoV) – один із найбільш поширених у світі вірусів, що викликає появу захворювання у поголів'я свійських корів. Саме цей вірус спричиняє зимову дизентерію у дорослих тварин та інфекції респіраторного та шлунково-кишкового тракту в молодняку великої рогатої худоби, що призводить до значних економічних збитків як у молочній, так і в м'ясній ланках тваринництва (Schoch et al., 2020).

Коронавірус ВРХ належить до роду *Betacoronavirus*, родини *Coronaviridae* (Perlman & Netland, 2009), вкритий оболонкою і плеоморфний, віріон діаметром від 65 до 210 нм, покритий подвійним шаром коротких (гемаглютинін) та довгих (шип) поверхневих виступів (Clark, 1993).

BCoV має один серотип з деякими антигенними варіаціями між різними штамми (El-Ghorr et al., 1989). Дослідниками було виявлено, що найбільша дивергенція послідовностей aa (42 зміни амінокислот на 38 різних ділянках) (Nasoksuz et al., 2002) і найбільша різниця при проведенні філогенетичного аналізу були між еталонним штамом Mebus кишкового коронавірусу ВРХ (1972) та більш новими ізолятами коронавірусу ВРХ, незалежно від їх клінічного походження. Це демонструє, що коронавірус великої рогатої худоби, як і інші РНК-віруси, мутує в польових умовах, причому останні виділені ізоляти більше схожі на сучасні штамми, ніж на виділені набагато раніше штамми.

Якщо генетична дивергенція впливає на нейтралізуючі або інші ключові епітопи, що дозволяє вірусам уникати існуючого імунітету (Yoo & Deregt, 2001), то для підвищення ефективності імунізації тварин потрібні вакцини, що містять більш сучасні або широко перехресно-реагуючі штами коронавірусу ВРХ.

Саме тому метою наших досліджень було обрати з отриманих польових ізолятів штам-продуцент вірусної біомаси для виготовлення ефективної вакцини проти коронавірусної інфекції великої рогатої худоби.

**Матеріали і методи.** Культура клітин. Використовували культуру клітин (КК) MDBK (отримана з American Type Culture Collection (ATCC) зі зразку CCL-22<sup>®</sup>), що адаптована до середовища Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) від загального об'єму. Культуру клітин інкубували в вентильованих культуральних флаконах (SARSTEDT AG & Co. KG<sup>®</sup>, Німеччина) за температури 37 °С та вмісту CO<sub>2</sub> - 5 %.

Еталонний вірус. В якості еталону використовували коронавірус ВРХ, штам «KL-2» (отриманий з Банку культур клітин і штамів мікроорганізмів ТОВ «Біотестлаб») на рівні 4 пасажу з титром інфекційної активності  $6,3 \pm 0,2 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Польові ізоляти. В якості найбільш перспективних для дослідження обрали виділені від хворих телят з господарств на території України ізоляти коронавірусу ВРХ, що попередньо адаптовані до культури клітин MDBK (ATCC) на рівні 5-го пасажу (Berezenko et al., 2021):

- Ізолят «CV-114» з титром інфекційної активності  $5,45 \pm 0,25 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;
- Ізолят «CV-172» з титром інфекційної активності  $5,73 \pm 0,13 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;
- Ізолят «CV-315» з титром інфекційної активності  $5,45 \pm 0,2 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ;
- Ізолят «CV-428» з титром інфекційної активності  $5,75 \pm 0,3 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Кожен ізолят, а також еталон інактивовано бінарним етиленіміном та виготовлено зразки вакцини у вигляді суспензії з ад'ювантом – колоїдним діоксидом кремнію «А-300» (Evonik<sup>®</sup>).

Лабораторні тварини. Використовували кролів породи «білий велетень» вагою 2,5-3,5 кг, імунних проти вірусної геморагічної хвороби кролів.

Імунізація кролів. Сироватки отримали шляхом імунізації кролів відповідно до груп: 4 групи кролів (по 3 тварини в групі) імунізували відповідними зразками вакцин з ізолятів коронавірусу ВРХ, одну групу кролів імунізували зразком вакцини з коронавірусом ВРХ, штам «KL-2», ще одна група тварин слугувала контролем (не вакцинували).

Для гіперімунізації використовували накопичені вірусні матеріали з інфекційною активністю  $5,0 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Кролям контрольної групи вводили поживне середовище «Ігла». Власне імунізацію проводили внутрішньом'язово в дозі об'ємом по  $1,0 \text{ см}^3$ .

Гіперімунізацію проводили шляхом 2-кратної імунізації з інтервалом 21 день. Відбір крові виконували через 21 добу після останнього введення вірусу. Отримані специфічні до кожного штаму сироватки об'єднували та досліджували в реакції нейтралізації.

Реакція нейтралізації (РН). Постановку реакції виконували мікрометодом в культуральних планшетах з культурою клітин MDBK. Реакцію проводили з використанням постійної дози вірусу ( $1000 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ) та шляхом виготовлення 2-кратних розведень сироватки. Робоче розведення сироватки та вірусу інкубували протягом 1 години за температури 37 °С. Реакцію супроводжували такими контролями: робочої дози вірусу, культури клітин та токсичності досліджуваної сироватки. Титр віруснейтралізуючих антитіл в сироватці визначали за останнім розведенням сироватки, яке нейтралізувало цитопатичну дію вірусу (ЦПД) в інфікованих клітинах.

Визначення антигенної спорідненості. Проводили шляхом постановки реакції перехресної нейтралізації, в якій досліджували кожен штам вірусу з гомологічною, гетерологічною та негативною сироватками з активністю  $5,0 \text{ НД}/\text{см}^3$  (нейтралізуюча доза) в культурі клітин MDBK. Реакцію супроводжували такими контролями: культури клітин,

цитотоксичної дії сироватки та робочої дози вірусу. Облік результатів реакції нейтралізації починали після повної дегенерації культури клітин у контролі вірусу.

Антигенну спорідненість різних ізолятів та штамів коронавірусу ВРХ розраховували за формулою Архетті та Хорсфалла (Precausta & Stellmann, 2010):

$$R = \sqrt{(r1 * r2)} * 100$$

де:  $r1 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 1}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 1}}$ ;

$r2 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 2}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 2}}$ ;

$R$  – антигенна спорідненість між штамми вірусу, %.

Визначення антигенної відмінності. Відмінність між двома ізолятами та штамом вірусу (P) розраховували за формулою (Priskoka et al., 1987):

$$P = \frac{(1,0-r1) + (1,0-r2) + (r1-r2)}{2} * 100$$

де:  $r1 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 1}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 1}}$ ;

$r2 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 2}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 2}}$ ;

$P$  – антигенна відмінність між штамми вірусу, %.

Визначення антигенної домінантності. Домінантність вірусів розраховували за формулою (Precausta & Stellmann, 2010):

$$D = \sqrt{\frac{r1}{r2}}$$

Де:  $r1 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 1}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 1}}$ ;

$r2 = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 сироваткою № 2}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 сироваткою № 2}}$ ;

$D$  – домінантність (якщо  $D > 1$ , то це означає домінантність).

**Результати й обговорення.** У результаті проведеного на кролях досліду були отримані штамоспецифічні до коронавірусу ВРХ гіперімунні сироватки.

Титри отриманих сироваток від імунізованих кролів на 21 день після 2-ої імунізації у РН складали:

- до польового ізоляту «CV-114» –  $8,40 \pm 0,25 \log_2$ ,
- до польового ізоляту «CV-172» –  $6,00 \pm 0,20 \log_2$ ,
- до польового ізоляту «CV-315» –  $7,20 \pm 0,40 \log_2$ ,
- до польового ізоляту «CV-428» –  $5,50 \pm 0,40 \log_2$ ,
- до штаму «KL-2» –  $8,75 \pm 0,25 \log_2$ .

Титри віруснейтралізуючих антитіл до всіх вірусних ізолятів та штаму KL-2 коронавірусу ВРХ відповідно до результатів постановки реакції перехресної нейтралізації вказані в таблиці 1.

Серологічна антигенна спорідненість ( $R$ ) та антигенна домінантність ( $D$ ) серед досліджуваних ізолятів, оцінені за їх віруснейтралізуючими титрами антитіл, наведені у таблиці 2.

Таблиця 1

**Титри віруснейтралізуючих антитіл відповідно до результатів постановки реакції перехресної нейтралізації ( $\log_2$ )**

Штами та ізоляти коронавірусу ВРХ	Сироватки специфічні до штамів вірусу				
	KL-2	CV-114	CV-172	CV-315	CV-428
KL-2	5,0 ± 0,0	4,6 ± 0,5	4,2 ± 0,2	4,6 ± 0,0	4,0 ± 0,4
CV-114	4,6 ± 0,4	4,8 ± 0,2	4,8 ± 0,0	4,4 ± 0,2	4,2 ± 0,5
CV-172	4,8 ± 0,2	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,0	4,2 ± 0,1	3,8 ± 0,4
CV-315	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,4	4,2 ± 0,0	4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,3
CV-428	4,8 ± 0,4	4,5 ± 0,2	4,6 ± 0,0	4,6 ± 0,5	5,0 ± 0,1

Таблиця 2

**Результати визначення білатеральної антигенної спорідненості ( $R$ , %) та домінантності вірусів**

Штами вірусів	Сироватки до штамів вірусів				
	KL-2	CV-114	CV-172	CV-315	CV-428
KL-2	100* 1,0**				
CV-114	93,5 1,04	100 1,0			
CV-172	89,8 0,88	95,5 1,0	100 1,0		
CV-315	92,5 1,05	89,9 1,04	85,9 1,01	100 1,0	
CV-428	87,6 0,83	88,9 0,89	83,6 0,82	91,4 0,93	100 1,0

*Примітка:* \* - антигенна спорідненість, %; \*\* - антигенна домінантність.

Результати визначення антигенної відмінності ( $p$ , %) між досліджуваними ізолятами та штамом KL-2 представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

**Результати визначення антигенної відмінності ( $p$ , %) вірусів**

Штами вірусів	KL-2	CV-114	CV-172	CV-315	CV-428
KL-2	-				
CV-114	5	-			
CV-172	16	4	-		
CV-315	5	8	12	-	
CV-428	20	16	24	12	-

Отже, дане дослідження було спрямоване на вивчення антигенних взаємозв'язків та домінування між ізолятами коронавірусу ВРХ, що походять з різних географічних регіонів України та виробничим (вакцинним) штамом.

Отримані результати продемонстрували тісні антигенні зв'язки між польовими ізолятами та еталоном, що підтверджує той факт, що вони належать до одного серологічного підтипу (як і в дослідженнях El-Ghorr et al., 1989).

Кожен з вірусних ізолятів нейтралізувався як гомологічною, так і гетерологічною гіперімунними сироватками. Титри віруснейтралізуючих антитіл у штаму KL-2, ізоляту CV-172, ізоляту CV-315 та ізоляту CV-428 за нейтралізації гомологічними сироватками були вищі, ніж за нейтралізації гетерологічними сироватками.

Для всіх гіперімунних сироваток, найвищі титри віруснейтралізуючих антитіл спостерігалися за нейтралізації ізоляту CV-428.

Однак, варто зазначити, що відслідковується закономірність в тому, що гіперімунні штамоспецифічні сироватки краще нейтралізують гомологічні штамів вірусу, ніж гетерологічні.

Антигенна спорідненість між досліджуваними ізолятами та еталоном була в межах 83-100 %, що свідчить про майже повну антигенну ідентичність. Також з наведених даних можна встановити, що найбільшу антигенну спорідненість з еталоном виявлено у ізолятів CV-114 (93,5 %) та CV-315 (92,5 %), а найбільш тісний зв'язок спостерігався між ізолятами CV-114 та CV-172 (95,5 %).

Визначення домінантності виявило, що ізолят CV-114 домінує над еталоном KL-2, а ізолят CV-315 – над еталоном KL-2 та ізолятами CV-114 та CV-172. Не спостерігається антигенного домінування у ізолятів CV-172 та CV-428 над будь-яким вірусом.

Відповідно до отриманих результатів, польовий ізолят коронавірусу ВРХ CV-315 можна рекомендувати в якості нового виробничого (вакцинного) штаму та використовувати в подальших дослідженнях з метою розробки ефективної інактивованої вакцини проти коронавірусу ВРХ.

## ВИСНОВКИ

1. У результаті проведених досліджень доведено можливість отримання активних в реакції нейтралізації гіперімунних кролячих сироваток проти коронавірусу ВРХ, що доводить можливість використання кролів в якості лабораторної моделі при контролі вакцини проти коронавірусу ВРХ.

2. Отримані результати в перехресній реакції нейтралізації продемонстрували тісні антигенні зв'язки між досліджуваними польовими ізолятами та еталоном, адже антигенна спорідненість між досліджуваними ізолятами та еталоном була в межах 83-100 %, що підтверджує той факт, що вони належать до одного серологічного підтипу. Кожен з вірусних ізолятів нейтралізувався як гомологічною, так і гетерологічною гіперімунними сироватками, проте гіперімунні штамоспецифічні сироватки краще нейтралізували гомологічні штами вірусу, ніж гетерологічні.

3. Відповідно до результатів досліджень польовий ізолят коронавірусу ВРХ CV-315 домінує над еталоном KL-2 та ізолятами CV-114 та CV-172, тому його було рекомендовано до використання в якості нового виробничого (вакцинного) штаму для розробки ефективної інактивованої вакцини проти коронавірусу ВРХ.

**Перспективи досліджень.** Отримані результати в подальшому будуть використанні в розробці ветеринарних імунобіологічних засобів проти коронавірусу ВРХ.

## References

Berezenko, A., Nedosekov, V., & Godovskiy, O. (2021). Izolyatsiya koronavirusu VRKh v kulturakh klitynn. Naukovi dopovidi NUBiP Ukrainy. (4(92)). <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/15026> [in Ukrainian].

Clark, M. (1993). Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal*, 149(1), 51–70. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80210-6](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80210-6).

El-Ghorr, A.A., Snodgrass, D.R., Scott, F.M.M., & Campbell, I. (1989). A serological comparison of bovine coronavirus strains. *Archives of Virology*, 104(3–4), 241–248. <https://doi.org/10.1007/bf01315546>.

Hasoksuz, M., Sreevatsan, S., Cho, K. O., Hoet, A. E., & Saif, L. J. (2002). Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Research*, 84(1–2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00004-7).

Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 439–450. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>.

Precausta, P., & Stellmann, C. (2010). Isolation and Comparative Study “in vitro” of Five Strains of Contagious Ecthyma of Sheep. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, 20(5), 340–355. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1973.tb01135.x>.

Priskoka, V.A., Sobko, A.I., & Manniy, K. (1987). Metodicheskiye rekomendatsii po opredeleniyu rodstva, razlichiy i dominantnosti virusov v serologicheskikh reaktsiyakh. *Ukr. Nauchno-issledovat. vet. inst-t.* [in Russian].

Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020:[baaa062](https://doi.org/10.1093/database/baaa062). PubMed: [32761142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/) PMC: [PMC7408187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7408187/).

Yoo, D., & Deregt, D. (2001). A Single Amino Acid Change within Antigenic Domain II of the Spike Protein of Bovine Coronavirus Confers Resistance to Virus Neutralization. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 297–302. <https://doi.org/10.1128/cdli.8.2.297-302.2001>.