

қолданып көрдік. Нәтижесінде біз ұсынып отырған қоректік ортада түзілген агарлар саны бұрыннан қолданып келе жатқан қоректік ортадан кем болған жоқ. Вакциналық препаратқа қойылатын ең негізгі балау оның иммунагендік қасиеті. Өзірленген вакцинаның иммуногендік қасиеті жоғары, ол реактогенді қасиеті болған жоқ. Мұндай жолмен әзірленген вакцинаның өзіндік құны 20 % арзан, иммуногенділігі жоғары болып топалаңға шалдығатын жануарлардың едәуір азайуына септігін тигізеді.

RESUME

The vaccine developed from the 55-Vniiivvim strain without capsules, with high immunogenicity, without reactogenicity, recommended against animal anthrax, is grown in highly formed nutrient media, and ultrasonic lysate of the topoline pathogen is added to the main component of the nutrient medium using casein-yeast agar. The immunogenic fact of the vaccine depends on the characteristics of the biology of microorganisms, the impact of physical and chemical factors during inactivation, the composition of the nutrient medium, adjuvants and adsorbents, Immunostimulants, and other factors. When manufacturing a vaccine preparation, a large amount of nutrient medium occurs in production volumes, which affects the cost of the finished biological product. Therefore, it is important to reduce the cost of the finished product while preserving the immunogenic properties of the manufactured vaccine product. In our experience, we have comparatively used meat-peptone agar, which has already been used, but the price is comparatively a little more expensive, and casein-yeast agar of the nutrient medium, the price of which is much lower than for it. As a result, the number of agars formed in the nutrient medium we offer was not less than the already used nutrient medium. The main approach to a vaccine preparation is its immunogenic properties. The developed vaccine has high immunogenic properties and did not have reactogenic properties. The vaccine developed in this way has a cost of 20% cheaper than immunogenicity, which contributes to a significant reduction in the animal population.

УДК 619:578.824.11

Аманова Ж.Т., магистр биологических наук, научный сотрудник

Ершебулов З.Д., магистр биологических наук, начальник отдела обеспечения качества

Жугунисов К.Д., магистр ветеринарных наук, старший научный сотрудник

Булатов Е.А., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК, п.г.т Гвардейский, Республика Казахстан

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ

Аннотация

В статье представлены результаты исследований по оценке безопасности и иммуногенности инактивированной вакцины против бешенства животных. Безопасность и иммуногенность инактивированной вакцины проверяли на лабораторных животных (белых мышях и кроликах соответственно). В экспериментах, проведенных на мышях, массой 13-18 г установили, что подкожное введение инактивированной вакцины против вируса бешенства не вызывает реактогенности и нежелательных явлений в организме испытуемых мышей. Внутримышечное введение вакцины кроликам 6-12 мес. возраста, массой 0,4-0,8 кг, не вызывала клинических признаков бешенства, при этом обеспечивала формирование иммунитета против бешенства с образованием у вакцинированных кроликов вируснейтрализующих антител (ВНА) в титрах не менее $3 \log_2$, что соответствует международным стандартам, предъявляемым Европейской Фармакопеей при разработке вакцин против данного вируса. Напряженность иммунитета против бешенства у вакцинированных кроликов была на достаточном уровне, что подтверждено результатами контрольного заражения животных штаммом «CVS» фиксированного вируса бешенства. Таким образом, на основе анализа полученных результатов установлено, что инактивированная

вакцина против бешенства животных является безопасной и иммуногенной для белых мышей и кроликов соответственно.

Ключевые слова: бешенства, инактивированная вакцина, безопасность, реактогенность, иммуногенность, вируснейтрализующие антитела.

Введение. Бешенство (*Rabies, hydrophobia Lyssa.*) – абсолютно смертельный зооантропоноз, поражающий всех теплокровных животных, рукокрылых (летучих мышей) и человека. Это мучительное, и, как правило, смертельное заболевание известно с глубокой древности и, к сожалению, остается до сих пор одной из серьезных проблем здравоохранения и ветеринарных служб многих стран мира, в том числе и нашей страны – Республики Казахстан [1, 2].

Несмотря на значительные успехи в изучении бешенства, борьба с ним затруднена из-за широкой циркуляции вируса в природе. Это приводит к росту заболеваемости сельскохозяйственных животных [3].

Согласно информации Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ) на территории Республики Казахстан последние вспышки бешенства среди животных были зафиксированы в 2018 г. С начала 2019 г официальных случаев заболевания бешенством среди животных не зарегистрировано [4].

Одним из основных и эффективных способов предотвращения бешенства является своевременная и эффективная иммунопрофилактика, основанная на использовании антирабических вакцин [5]. В ветеринарной практике широкое распространение получили живые и инактивированные цельновирионные вакцины на основе вакцинных штаммов вируса бешенства; Paris Pasteur, Pitman-Москва, CVS-27, Reven, Flury LEP и HEP, SAD ERA, Внуково-32, Щелково-51, ТС-80, которые выращивают в первичных (почки собаки, хомяка, поросенка) и перевиваемых (ВНК-21/13, W1-38, CEF, Vero, Линия 4647, МДБК и ПС) линиях культур клеток [6, 7]. На сегодняшний день при иммунизации домашних и сельскохозяйственных животных против бешенства большее предпочтение отдают инактивированным вакцинам, которые характеризуются безопасностью и высокой иммуногенностью.

Руководствуясь мировым опытом в данной области, нами разработана инактивированная вакцина для профилактики бешенства животных в Казахстане. Технология получения вакцины основана на использовании штамма «VRC-RZ2» вируса-фикс бешенства, репродуцированного в перевиваемой линии ВНК-21/с13 с последующей инактивацией димер этиленмином (ДЭИ) с добавлением дополнительного стимулятора иммуногенеза (адьюванта) геля гидроокиси алюминия (ГОА) [8].

При выборе вакцины, предназначенной для массовой иммунизации, особое внимание обращают на безопасность применения и длительность иммунитета у животных после введения вакцины.

Основной целью этого эксперимента являлось определение безопасности и иммуногенности инактивированной вакцины против бешенства животных на основе вакцинного штамма «VRC-RZ2».

Материалы и методы исследований. Приготовление инактивированной вакцины. Нативной вирусосодержащей расплодкой штамма «VRC-RZ2» вируса бешенства заражали сосуды, содержащие перевиваемую культуру клеток ВНК-21/с13 в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. Культивирование проводили при температуре 37,0 ± 0,5 °С в течение 70-72 ч. После чего сосуды с культурой клеток охлаждали при температуре минус 40,0 ± 1,0 °С. Далее сосуды с вирусосодержащей суспензией размораживали и при работающей мешалке порционно в суспензию добавляли 8 % рабочий раствор ДЭИ до конечной концентрации 0,2 %. Затем 5М раствором уксусной кислоты или аммиака подвели рН суспензии в пределах 7,2-7,6. Инактивацию вируса бешенства животных вели при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 24 ч при периодическом перемешивании (5 мин через каждые 2 ч).

После инактивации вируса в суспензию для нейтрализации инактиванта добавляли 25 % раствор тиосульфата натрия до конечной концентрации 0,25 % и охлаждали до 2-6°С.

Инактивированную вирусную суспензию переносили в реактор, где добавляли 10 % по объему 2 % ГОА (BRENNTAG, Дания), при постоянном перемешивании суспензии. Температуру суспензии повышали до 27,0-30 °С и поддерживали на этом уровне 4-6 ч. Затем температуру вакцинной суспензии снижали до 4,0-8,0 °С и хранили еще 48-56 ч. Готовую вакцину расфасовывали в стерильных условиях по 100 см³ во флаконы, которые затем закрывали резиновыми пробками и обкатывали металлическими колпачками.

Определение безвредности и реактогенности (авирулентности) вакцины. Для определения безвредности и реактогенности были подобраны клинически здоровые нелинейные белые мыши весом от 13 до 18 г и сформированы три группы мышей (две опытные группы по 20 гол в каждой и одна контрольная группа - 10 гол).

В опыте на безвредность 20 животным вводили подкожно в область спины 0,5 мл вакцины в цельном виде. При определении реактогенности готовую вакцину тщательно встряхивали, разводили в соотношении 1:4 стерильным физиологическим раствором и вводили 20 мышам интрацеребрально в дозе 0,03 мл. Препарат считали выдержавшим испытание, если в течение всего срока исследования мыши не погибали, не теряли в весе по сравнению с контрольной группой и не проявляли признаков интоксикации.

Изучение иммуногенности вакцины. Иммуногенную активность вакцины изучали на 15 здоровых кроликах массой 0,4-0,8 кг, 6-12 месячного возраста. Из выбранного поголовья животных были сформированы 3 группы (две опытные группы по 5 гол и одна контрольная группа - 5 гол). Иммунизацию обеих опытных групп (6 мес. кролики (n=5) и 12 мес. кролики (n=5) проводили внутримышечно по 1,0 см³ в область средней трети бедра, обрабатывая место введения вакцины 70 % спиртом. За вакцинированными животными проводили клиническое наблюдение в течение 21 сут, по истечении данного времени у всех подопытных животных отбирали кровь для определения вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу бешенства в сыворотке, с последующим интрацеребральным заражением всех вакцинированных и контрольных кроликов референс-штаммом «CVS» вируса бешенства в дозе 50 ЛД₅₀/0,2 мл. За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 сут.

Определение титра ВНА. Титр ВНА определяли согласно методике указанной в литературе [9].

Статистическая обработка экспериментальных данных. Математическую достоверность результатов исследований устанавливали с использованием программы GraphPadPrism 6.0. Порогом статистической значимости считали P<0.05.

Результаты исследований. При оценке безопасности вакцины на лабораторных мышях различия по массе тела между вакцинированными и контрольными группами не отмечалось (рисунок 1). Общее состояние и поведение животных опытных групп (для определения безвредности (n=20) и для определения реактогенности (авирулентности) (n=20)) было нормальным и соответствовало клинически здоровому состоянию животных, также не наблюдалось гибели мышей на протяжении двух недельного периода наблюдения. Таким образом, полученная вакцина безвредна, не обладает реактогенностью, соответственно авирулентна.

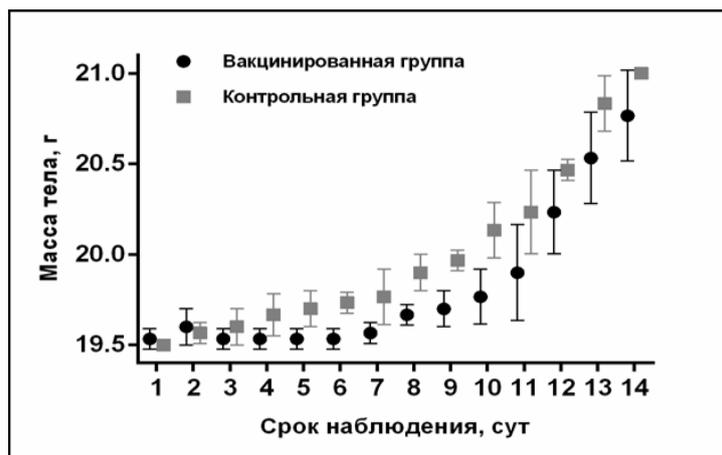


Рисунок 1 – Масса тела белых мышей, находившихся в опыте по определению безвредности и реактогенности инактивированной вакцины

При оценке иммуногенности инактивированной вакцины на кроликах установлено, что у иммунизированных кроликов (6 мес. (n=5) и 12 мес. (n=5)) на 21 сут после вакцинации инактивированной вакциной в сыворотках крови выявлялись ВНА к вирусу бешенства $3,52 \pm 0,08$ и $3,61 \pm 0,16$ МЕ/мл соответственно, при этом между взрослыми и молодыми кроликами в титрах ВНА существенной разницы не установлено ($p > 0,35$). У вакцинированных кроликов в течение 21 сут не отмечались клинические признаки бешенства, физиологическое состояние вакцинированных животных было в пределах нормы. У животных контрольной группы в сыворотках крови антитела к вирусу бешенства отсутствовали (рисунок 2).

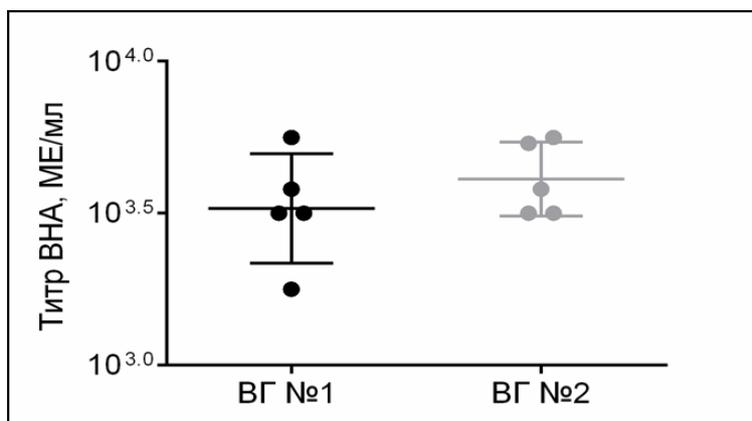


Рисунок 2 – Среднегеометрический титр ВНА в сыворотках крови вакцинированных кроликов на 21 сут.

Согласно международным стандартам для надежной защиты животных против бешенства уровень ВНА в сыворотке крови животных должен составлять 0,5 МЕ, то есть в пределах 1:8-1:16, что составляет 3-4 \log_2 [9], что соответствует данным, полученными нами по титру ВНА.

В результате проведенных исследований по определению наличия напряженного иммунитета установлено, что все вакцинированные кролики проявляют устойчивость к вирусу бешенства в течение двух недельного периода наблюдения. При этом не наблюдались клинические симптомы бешенства или иной инфекции, общее состояние вакцинированных животных было в рамках физиологической нормы.

В свою очередь, кролики контрольной группы заболели с проявлением характерных для бешенства клинических признаков. У последних наблюдались изменения в поведении с резкими сменами периодов апатии и возбуждения. Начиная с 3-4 сут, отмечались приступы резкого возбуждения и агрессии, нарушение координации движений, появление беспокойства

при виде воды. В последующие дни у контрольных животных наблюдались потеря аппетита, апатическое состояние, слюноотделение, у некоторых животных судороги, коматозное состояние с последующей смертью животных.

На основе анализа полученных результатов по определению безопасности и иммуногенности инактивированной вакцины против бешенства животных установлено, что разработанная вакцина является безопасной и обладает высокой иммуногенностью для лабораторных животных.

Обсуждение результатов исследований. На основе штамма «VRC-RZ2» полученного в НИИПББ была разработана жидкая инактивированная антирабическая вакцина против бешенства животных, производство которой основано на современных биотехнологических методах: инфицированные вирусом бешенства (штамм «VRC-RZ2») клетки перевиваемой линии ВНК-21/с13, инактивированной ДЭИ с добавлением адьюванта геля ГОА.

Известно, что при выборе вакцины особое внимание обращают на безопасность препарата и длительность иммунитета у животных. В связи с этим нами были проведены работы по оценке безопасности и иммуногенности разработанной инактивированной вакцины против бешенства животных из штамма «VRC-RZ2».

Следовательно, полученные экспериментальные данные, по оценке безопасности и авирулентности разработанной инактивированной вакцины на лабораторных животных (белые мыши), продемонстрировали полную безопасность и авирулентность вакцины для мышей, так как у животных привитых однократно подкожно в дозе 0,5 см³ и интрацеребрально по 0,03 см³ в течение всего срока наблюдения (14 сут) не отмечались гибель и проявление признаков какой-либо болезни.

Дальнейшие испытания разработанной вакцины на кроликах показало возможность этой вакцины формировать у кроликов клиническую и вирусологическую защиту от интрацеребрального заражения референс-штаммом «CVS» вируса бешенства в дозе 50 ЛД₅₀/0,2 мл в течение 14 сут.

Разработка аналогичных вакцин сообщаются в исследованиях Ц. Пуревхуу, где в результате вакцинации животных инактивированной вакциной из штамма «ВНИИЗЖ» вируса бешенства вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови обнаруживаются через 7 сут и сохраняются в сыворотке крови животных в течение 12 мес в титрах до 3,2 log₂ [10].

В исследованиях О.Г. Лаптевой инактивированные антирабические вакцины из штамма «РБ-71», приготовленные в производственных условиях, были безвредными и отвечали требованиям ВОЗ по иммуногенности (>1,0 МЕ/мл) [11].

Очередную инактивированную антирабическую вакцину для животных из штамма «Щелково-51» создали В.С. Иванов, И.В. Иванов, А.Я. Самуйленко, и др., разработанный препарат не содержит в своем составе живого вируса бешенства и при испытании его на мышцах обладал иммуногенной активностью не менее 2,47 МЕ/мл [12].

Сравнительный анализ полученных результатов и литературных данных показал, что по созданию продолжительного протективного иммунного ответа у кроликов инактивированная вакцина из штамма «VRC-RZ2» вируса-фикс бешенства не уступает разработанным коммерческим инактивированным вакцинам против бешенства животных. Полученные результаты дают основание полагать, что разработанная вакцина может составить хорошую альтернативу инактивированным вакцинам, применяемым в Казахстане.

Заключение. Анализ экспериментальных данных позволяет заключить, что инактивированная вакцина против бешенства животных является безвредной, ареактогенной для белых мышей и обладает высокой иммуногенностью при однократной иммунизации кроликов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мусаева Г.К., Керимбаев А.А., Омарова З.Д., Раметов Н.М., Орынбаев М.Б. Мониторинг бешенства в популяциях диких плотоядных и летучих мышей // Исследования, результаты. – 2015. - №4. – С.37-41.
2. Алимов, Д.В. Бешенство животных. - Душанбе: Дониш, 1984.

3. Рожаев Б.Г., Ильгекбаева Г.Д., Жамансарин Т.М. Эпизоотическая ситуация по бешенству крупного рогатого скота в Республике Казахстан // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2014. - №1(30). – С. 59-63.

4. Эпизоотическая ситуация в мире по данным МЭБ. - [Электронный ресурс]. – режим доступа: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/foreign.html>.

5. Керимбеков К.К., Муфалинов К.К., Уразбахова А.Ж. Эффективность живой и убитой антирабических вакцин при пероральной вакцинации животных // Современ. проблемы зоонозных инфекций: матер. всесоюз. междунар. конф. - Симферополь, 1981. – С. 226-227.

6. Иванов В.С. Бешенство животных: экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной защиты ЦНС от возбудителя заболевания: автореф. ... док. вет. наук: 16.00.03. - Щелково, 2001. - 60 с.

7. Вишняков И.Ф., Никишин И.В., Недосеков В.В., Горшкова Т.Ф., Жестерев В.И., Шевченко А.А., Зуев В.В., Груздев К.Н. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства животных // Ветеринария. - 1998. - № 6. - С.76-80.

8. Кондибаева Ж.Б., Жугунисов К.Д., Далбаев Н.К., Ершебулов З.Д., Булатов Е.А. Определение оптимальной концентрации димерэтиленимина для инактивации вируса бешенства штамма «VRC-RZ2» // Вестник науки Казахского Агротехнического Университета имени С. Сейфуллина. – 2019. № 3 (102). – С. 223-231.

9. Таранов Д.С., Булатов Е.А., Жугунисов К.Д., Ершебулов З.Д., Аманова Ж.Т., Кондибаева Ж.Б., Абдураимов Е.О., Хайруллин Б.М. Производственные испытания иммуногенной активности инактивированной вакцины против вируса бешенства животных // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2016. - №4 (69). – С 124-131.

10. Пуревхуу Ц. Культуральная инактивированная вакцина против бешенства из штаммов «ВНИИЖ» и «ЕРА»: автореф. ... канд. вет. наук: 16.00.03. - Владимир, 2005. С. 21-22

11. Лаптева О.Г. Усовершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против бешенства: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук. – Покров, 2003. – С. 132.

12. Пат. 2366457 С1 Российская Федерация, МПК: А61К 39/205 (2006.01), А61Р 31/12 (2006.01). Вакцина антирабическая для животных (УНИРЭВ) / Иванов В.С., Иванов И.В., Самуйленко А.Я., Красуткин С.Н., Пухова Н.М., Салов Д.А., Елаков А.Л.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН; заявл. 27.02.08; опубл. 10.09.09, Бюл. № 25.

ТҮЙІН

Бұл мақалада жануарлардың құтыру ауруына қарсы вакцинаның қатерсіздігі мен иммуногендігін анықтау бойынша зерттеулер нәтижелері көрсетілген. Құтыру ауруына қарсы инактивтелінген вакцинасын салмағы 13-18 г ақ тышқандарға тері астына егу әдісі арқылы жүргізілген тәжірибелердің нәтижесінде сыналған тышқандар ағзасында реактогенділік және аурудың клиникалық белгілерін тудырмайтындығы анықталынды. Вакцинаны массасы 0,4-0,8 кг 6-12 айлық қояндардың бұлшықетішіне егкенде құтыру ауруының клиникалық белгілері туындамайтындығы, сонымен қатар сыналған қояндар ағзасында түзілген вирусбейтараптаушы антиденелердің (ВБА) титрлері 3 log₂ асып құтыру ауруына қарсы иммунитеттің қалыптасуын қамтамасыз етті, яғни алынған нәтиже құтыру ауруына қарсы вакциналарды дайындауда Еуропалық Фармакопея ұсынған халықаралық стандарттарға сәйкестендірілді. Вакцина егілген қояндарда құтыру ауруына қарсы қарқынды иммунитеттің қалыптасуы жеткілікті деңгейде түзілді және құтыру ауруының фикс вирусының «CVS» штамымен бақылаулық зақымдау нәтижелерінде расталды. Жүргізілген зерттеулер нәтижелерін талдай келе жануарлардың құтыру ауруына қарсы инактивтелінген вакцинасы ақ тышқандар үшін қатерсіз және қояндар үшін иммуногенді деп танылды.

RESUME

The article presents the results of studies to determine the safety and immunogenicity of an inactivated rabies vaccine in animals. In experiments conducted on mice weighing 13-18 g, it was established that subcutaneous administration of an inactivated vaccine against rabies virus does not cause reactogenicity and adverse events in the body of the tested mice. Intramuscular administration of the vaccine to rabbits 6-12 months. age, weighing 0.4-0.8 kg, did not cause clinical signs of rabies, while ensuring the formation of immunity against rabies with the formation in vaccinated rabbits of virus-neutralizing antibodies (VNA) in titers of at least 3 log₂, which corresponds to international standards imposed by the European Pharmacopoeia when developing vaccines against this virus. The intensity of immunity against rabies in vaccinated rabbits was at a sufficient level, which is confirmed by the results of the control infection of animals with the strain «CVS» of fixed rabies virus. Thus, based on an analysis received of the results, it was established that the inactivated rabies vaccine animal is safe and immunogenic for white mice and rabbits, respectively.

УДК 619: 618.14-002 (045)

Джакупов И.Т., доктор ветеринарных наук, профессор

Искакова Г.К., Ph.D докторант

Каскирбаева Н.К., магистрант

НАО «Казахский агротехнический университет имени С.Сейфуллина», г. Нур-Султан, Республика Казахстан

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИИ ОРГАНОВ ВОСПРОИЗВОДСТВА У КОРОВ

Аннотация

Существует ряд клинико-лабораторных методов определения патологии органов воспроизводства у продуктивных животных. Они в разной степени сложны по технике выполнения и отличаются, друг от друга по времени наступления реакции, что без сомнения имеет большое практическое значение. Актуальным решением данной проблемы стоит изучение методов диагностики состояния половых органов у коров. Определенно наличие острых, хронических течений эндометритов у коров в сельскохозяйственных формированиях Акмолинской области, выяснено что, хронические эндометриты составляют 38,02 %, острые и подострые эндометриты 31 %. Диагностика этих заболеваний проводилась с учетом дней после отела с использованием методов клинической и лабораторной диагностики. Эффективность методов диагностики эндометритов у коров при остром течении эндометритов клиническими методами составляет 82-91%, лабораторные методы 23-36,4%, при подостром течении клиническими методами диагностируется 27,3-59,1 %, лабораторными методами 36,4-45,6%. Определение хронического эндометрита клиническими методами составляет 7,4-2%, лабораторные методы позволили диагностировать 37% больных животных. Таким образом, методы клинической диагностики состояния половых органов у коров эффективны при остром и подостром течении эндометрита, лабораторные же методы позволяют определить хронические эндометриты.

***Ключевые слова:** крупный рогатый скот, половые органы, эндометрит, послеродовые патологии, инволюция матки, клиническая диагностика, лабораторная диагностика.*

Введение. Одним из факторов, сдерживающих динамичное развитие животноводческой отрасли, является высокая степень заболеваемости коров в послеродовом периоде. Важнейшей причиной нарушения воспроизводительной функции животных является возникновение различных осложнений после родов. По данным литературных источников выбраковка и убой бесплодных животных вследствие эндометрита достигают 24-72% [1].

Основной причиной бесплодия являются последствия патологических родов и послеродовые болезни половой системы, которые в основном наблюдаются в зимне-весенний