

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

HARMONIZATION FOR THE INTERNATIONAL RECOMMENDATIONS OF THE METHODS OF QUALITY CONTROL OF SWINE ERYSIPELAS INACTIVATED VACCINES

Pinchuk N.G.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (SSCIBSM), Kiev

It is carried out the analysis and definition of conformity of the basic methods of quality control of swine erysipelas inactivated vaccines in the countries of the European Union (EU) and effective for today in Ukraine, with the purpose of their harmonization to the international recommendations. The basic approaches to the quality assurance of swine erysipelas inactivated vaccines according to the international recommendations are presented

УДК 619:615.371:616.98:579.842.14:636.5

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ПТИЦ

Рубленко М.В.

Национальная академия аграрных наук Украины, г. Киев,

Стегний Б.Т., Обуховская О.В.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

В процессе изучения эффективности применения вакцинных препаратов исследователи прежде всего обращают внимание на уровень титров гуморальных антител и обеспечение высокой степени защиты организма животного от заражения штаммом-пробойником. Однако, существует целый ряд биохимических показателей физиологических параметров, которые характеризуют не только состояние иммунной системы, но и функциональную активность отдельных органов. Результатам таких исследований зачастую уделяют недостаточно внимания, что приводит к получению неполной информации о свойствах вакцинного препарата, который несмотря на высокие протективные свойства может оказывать на организм иммуносупрессирующие или токсическое действие [4, 9].

Целью наших исследований было изучение эффективности применения экспериментальной серии инактивированной вакцины против сальмонеллеза птиц с учетом показателей гуморального иммунитета, биологических маркеров функционального состояния организма и протективных свойств вакцины.

Материалы и методы. Опыт по изучению эффективности применения экспериментальной серии инактивированной вакцины против сальмонеллеза птиц был проведен на двух группах кур.

Инактивированная вакцина была приготовлена из производственного штамма *Salmonella Enteritidis* M по оригинальной методике ННЦ «ИЭКВМ», в качестве адьюванта использовали Мантанид-70. Одна иммунизирующая доза вакцины (0,5 мл) содержала 5×10^8 КОЕ сальмонелл.

Приготовленный препарат был проверен на стерильность (в соответствии с ДСТУ 4483) и безвредность (в соответствии с ДСТУ 46.024).

После чего были изучены его иммуногенные и протективные свойства в опыте на курах. Было сформировано две группы кур по 15 гол каждая.

Опытная группа была иммунизирована дважды внутримышечно в возрасте 21 и 28 дней. Контрольной группе препарат не вводили.

Через 14 суток после последнего введения вакцины кур обеих групп инфицировали суточной бульонной культурой *Salmonella Enteritidis* M в дозе 4 млрд. КОЕ.

За птицей обеих групп вели наблюдение в течение 14 дней после чего все особи были вынужденно забиты путем тотального обескровливания, внутренние органы (печень, желчный пузырь, селезенка, трубчатая кость) были отобраны для проведения бактериологических исследований по стандартным методикам.

У кур обеих групп отбирали кровь до проведения первой вакцинации и в процессе убоя. Сыворотки крови изучали на наличие защитных антител в пробирочной реакции агглютинации с «Антигеном для серологической диагностики сальмонеллезов животных группы Д1 в реакции агглютинации» (ТУ У 24.4-00497087-105:2010). А также определяли наличие в сыворотках крови следующих биохимических показателей – оксида азота, общего белка, циркулирующих иммунных комплексов, перекисного окисления липидов, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, молекул средней массы, Fe и Cu.

Результаты исследований. Иммуногенные свойства вакцины мы оценивали, прежде всего, по наличию в сыворотке крови птиц опытной группы защитных антител. Результаты РА с сальмонеллезным антигеном показали, что введение вакцины стимулировало выработку антител у всех особей, при этом средний показатель в группе равнялся $9,2 \pm 0,7 \text{ Log}_2$ (табл. 1). У птицы контрольной группы антител в сыворотке выявлено не было.

Экспериментальное заражение птиц обеих групп штаммом *Salmonella Enteritidis* M вызвало развитие острого течения сальмонеллеза у птиц контрольной группы. Что подтверждалось не только наличием типичных клинических симптомов (общее угнетение и истощение, диарея, у отдельных особей – нервные явления и артриты), но и результатами бактериологических исследований. Из желчного пузыря, печени, селезенки и костного мозга птиц контрольной группы была изолирована *Salmonella Enteritidis*.

Тогда, как у птицы опытной группы клинических симптомов не наблюдали, однако, из желчного пузыря и селезенки одной особи также была изолирована *Salmonella Enteritidis*.

Таблица 1 – Титры защитных антител в сыворотке крови кур опытной и контрольной групп

Группы птицы	Титры антител (Log ₂)	
	До иммунизации	На 14-й день после экспериментального заражения
Опыт	—	$9,2 \pm 0,7$
Контроль	—	—

С целью более глубокого изучения действия на организм птицы экспериментальной серии инактивированной вакцины против сальмонеллеза были проведены расширенные исследования биохимии сывороток крови кур обеих групп. В частности были определены отдельные показатели уровня обменных процессов в организме, индикаторы физиологического состояния внутренних органов и биохимические маркеры гуморального иммунитета. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

Важным показателем интенсивности функционирования иммунной системы является уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), который характеризует состояние гуморального иммунитета [5, 6]. Нами выявлено наличие прямой коррелятивной зависимости между уровнем титра защитных антител и значением ЦИК у кур опытной группы. Этот показатель практически в 2,5 раза превышает аналогичный в контрольной группе и подтверждает тот факт, что вакцина характеризуется интенсивным иммуногенным действием на организм птицы.

Таблица 2 – Биохимические показатели сыворотки крови кур опытной и контрольной групп

Группы птицы	Биохимические показатели								
	NO, Мкмоль/л	Общий белок, г/л	ЦИК шт/л	ПОЛ Мкмоль/л	МСМ г/л	АсАТ Мкмоль/гмл	АлАТ Мкмоль/гмл	Fe, мкг мкг %	Cu, мкг %
Опыт	14,82± 2,480***	31,95± 2,742*	29,41± 4,602**	3,06± 0,618***	0,17± 0,020	4,65± 0,525*	0,56± 0,059	317,95± 28,822	5,72± 0,612
Контроль	7,1± 0,4000	40,42± 2,271	12,00± 2,851	9,13± 1,364	0,22± 0,021	6,44± 0,366	0,57± 0,044	260,35± 25,940	6,20± 0,525

Примечание: * – $\leq 0,1$; * – $\leq 0,05$; ** – $\leq 0,01$; *** – $\leq 0,001$

Определенная группа биохимических показателей крови характеризует функциональное состояние отдельных органов и свидетельствует о наличии деструктивных процессов вследствие инфицирования организма патогенными возбудителями. Наиболее показательным в данном случае является уровень общего белка, а именно суммарная концентрация альбуминов и глобулинов, находящаяся в сыворотке крови [3, 5]. Повышение уровня общего белка говорит о развитии инфекционного процесса, что подтверждается результатами наших исследований. У птицы контрольной группы, где мы наблюдали острое течение сальмонеллеза, этот показатель увеличен на 21 % (8,47 г/л) по сравнению с опытной.

Сальмонеллы в процессе развития острого инфекционного процесса выделяют в кровяное русло большое количество экзотоксинов, которые вызывают многочисленные дегенеративные изменения в клетках паренхиматозных органов. В первую очередь поражаются паренхима печени и миокард. О наличии подобных изменений можно судить по уровню содержания в сыворотке крови органоспецифических ферментов – трансфераз. Аспартатаминотрансфераза (АсАТ) участвует в аминокислотном обмене и повышение ее уровня свидетельствует, прежде всего, о разрушении клеток сердечной мышцы вследствие воспалительного процесса [2, 3]. У кур контрольной группы этот показатель увеличен на 1,79 Мкмл/мл по сравнению с особями опытной группы. В данном случае мы можем сделать вывод о том, что в патогенный процесс при экспериментальном инфицировании птицы был вовлечен миокард, что спровоцировало развитие острого миокардита.

Аланинаминотрансфераза (АлАТ) характеризует, прежде всего, функциональное состояние печени [2, 3]. В нашем опыте разница в содержании этого фермента в сыворотке крови кур контрольной и опытной групп была незначительной и составляла 0,01 Мкмоль/мл. Что свидетельствует о том, что печень как в процессе острого инфекционного заболевания, так и в процессе формирования иммунного ответа на введение вакцины, несет значительную функциональную нагрузку.

Свидетельством наличия деструктивных процессов в паренхиматозных органах также является повышение таких биохимических показателей, как значение перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень молекул средней массы (МСМ) [8]. У птицы опытной группы значение ПОЛ было в три раза ниже, чем в контрольной группе, а МСМ – меньше на 23 % соответственно. Уровень ПОЛ и МСМ повышается вследствие интенсивного некомпенсируемого разрушения клеток паренхиматозных органов и в нашем случае подтверждает развитие генерализованного воспалительного процесса у инфицированных сальмонеллами птиц.

Что касается наличия в сыворотке микроэлементов Fe и Cu, то следует заметить, что у птицы опытной и контрольной групп оба этих показателя находились в пределах физиологической нормы. Хотя содержание Fe у птиц опытной группы было выше, чем контрольной, но разница эта была незначительна (около 12 %). Учитывая тот факт, что основная часть Fe в организме сосредоточена в гемоглобине эритроцитов, мы можем утверждать, что острое развитие сальмонеллеза не характеризовалось развитием гемолитической анемии.

Уровень Cu в сыворотке крови птиц в нашем опыте был недостаточно информативным. Этот показатель в обеих группах существенно не различался и находился в пределах физиологической нормы.

Особый интерес вызывает уровень эндогенного оксида азота в сыворотке крови птицы (NO). Существует мнение, что NO является одним из основных маркеров гуморального иммунитета и свидетельствует о высокой активности фагоцитов. Его значение повышается в процессе проникновения в организм чужеродных антигенов и наработке иммунокомпетентными клетками защитных антител [1, 7, 10]. Учитывая тот факт, что в организм инфицированных птиц также были введены антигены сальмонелл, можно было бы ожидать, что уровень NO в этой группе будет выше, чем у вакцинированных. Однако, содержание эндогенного оксида азота в сыворотке крови инфицированных птиц практически вдвое ниже, чем у вакцинированных. Это свидетельствует не только о более интенсивном процессе наработки антител в ответ на введение вакцины, но и об отсутствии иммуносупрессивного влияния испытанного нами препарата.

Выводы. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что двукратная иммунизация птицы экспериментальной инактивированной вакциной против сальмонеллеза стимулирует наработку защитных антител в титрах $9,2 \pm 0,7 \text{ Log}_2$ и обеспечивает защиту 93 % особей от заражения патогенным штаммом сальмонелл.

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

Высокий уровень ЦИК и эндогенного NO в сыворотке крови кур опытной группы (по сравнению с контрольной) свидетельствует об интенсивном функционировании иммунной системы и об отсутствии иммуносупрессивного влияния вакцины.

Повышение уровня АсАт, ПОЛ и МСМ у особей контрольной группы указывает на развитие интенсивных деструктивных процессов во внутренних органах (в частности печени и сердце) инфицированной птицы. Более низкое значение этих показателей у птицы опытной группы не только подтверждает высокие протективные свойства вакцины, но и свидетельствует о полном отсутствии какого-либо токсичного действия препарата.

Перспективы дальнейших исследований. С целью углубленного изучения влияния на организм птиц инактивированной вакцины против сальмонеллеза необходимо провести расширенный спектр биохимических исследований, включая определение α -, β - и γ -глобулинов и большего числа клеточных ферментов (α -амилазы, глутаматдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, гаммаглутамилтрансферазы).

Список литературы

1. Авдеева, М.Г. Оксид азота сыворотки крови как дополнительный критерий оценки течения лептоспироза [текст]/ М.Г. Авдеева, И.Н. Бондаренко// Клин. лаб. диагн. – 2006. – № 6. – С. 50-51. 2. Антонов, Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии. Биохимические и микробиологические: Справочник [текст]/ Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина и др. – М.: Агропромиздат, 1991. – 288 с. 3. Бажибина, Е.Б. Методические основы оценки клинико-морфологических показателей крови домашних животных [текст]/ Е.Б. Бажибина, А.В. Коробов, С.В. Середа и др. – М.: Аквариум, 2005. – 128 с. 4. Бектимиров, Т.А. Побочное действие вакцин [текст]/ Т.А. Бектимиров//Бюл.: Вакцинация.-2000.-№ 2 (8). – С. 15-16. 5. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики [текст] И.П. Кондрахин – М.: Колос, 2004. – 520 с. 6. Мейер, Д. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика [текст] Д. Мейер и Дж. Харви – М.: Софион, 2007. – 456 с. 7. Костокрыз, В. Б. Особенности метаболизма оксида азота у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии с имплантированным электрокардиостимулятором: возможности медикаментозной коррекции блокаторами бета-адренорецепторов [текст] В.Б. Костокрыз, Т.В. Туровская//Український медичний часопис «Актуальні питання клінічної практики». – 2010. – № 5 (79). – С. 23-25. 8. Кузьменко, Д.И. Оценка резерва липидов сыворотки крови для перекисного окисления в динамике окислительного стресса у крыс [текст] Д.И. Кузьменко, Б.И. Лаптев// Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 1. – С. 34-35. 9. Мешкова, Р.Я. Иммунопрофилактика. Руководство для врачей [текст] Р.Я. Мешкова, М.: Медицина. – 1998. – 133 с. 10. Чагина, Е. А. Определение уровня оксида азота в различных биологических субстратах у хирургических больных [текст] Е.А. Чагина, Е.П. Турмова // «Наука о человеке»: сб. статей по мат-лам пятого конгресса мол. ученых и специалистов, Томск, СибГМУ. – 2004. – С. 412.

STUDY OF EFFICIENCY OF INACTIVATED VACCINE AGAINST AVIAN SALMONELLOSIS

Rublenko M.V.

National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kiev,

Stegniy B.T., Obuhovskaya O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

There was established that double immunization of chickens by a series of experimental inactivated vaccine against salmonellosis stimulates operating time of protective antibodies in the credits $9.2 \pm 0.7 \text{ Log}_2$ and protects 93% of individuals from infection of pathogenic Salmonella strain.

Analysis of biochemical parameters of blood serum of chickens of experimental and control groups indicates that the intensive functioning of the immune system and the absence of immunosuppressive and toxic effects of vaccines on the avian body.

УДК 619:616.98:616-076

КОМІСІЙНІ ВИПРОБУВАННЯ НОВОЇ ТЕХНОЛОГІЇ КОМПЛЕМЕНТФІКСУЮЧОГО ТЕСТУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ЗБУДНИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ

Стегній Б.Т., Бабкін А.Ф., Вовк С.І., Близнацев О.Г., Данілова І.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Система епізоотологічного моніторингу небезпечних бактеріальних хвороб тварин (бруцельоз, інфекційний епідидиміт баранів, хламідіоз) в Україні та інших державах забезпечується серологічними скринінговими дослідженнями тварин традиційними (РБП, РЗК, РА, РТЗК, РІД) і альтернативними (ІФА, ПЛР та інші) методами [1, 2, 3, 4, 5, 6]. У статті наведено результати комісійного випробування оригінальної технології постановки і комп'ютерного обліку мікрометоду РЗК для виявлення антитіл при бактеріальних хворобах тварин.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено згідно затвердженої методичною комісією ННЦ «ІЕКВМ» методики випробування способу постановки і комп'ютерного обліку мікрометоду РЗК для виявлення антитіл при бактеріальних хворобах тварин, зокрема, бруцельоз, інфекційний епідидиміт баранів, хламідіоз. Для дослідження були використані комерційні діагностикуми: «Антиген бруцельозний єдиний для РА, РЗК, РТЗК», серія 1, 2009 р., робочий титр 1:75, виробник Херсонська біофабрика; «Набір позитивної бруцельозної і негативної контрольних сироваток для РБП, РА, РЗК (РТЗК)», три зразки, виготовлені упродовж 2004, 2009, 2010 рр., серія 1, робочий титр в РЗК 1:80-1:160, виробник ТОВ НДП «Ветеринарна медицина»; «Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК», серія 1, 2010 р., робочий титр антигену 1:50, позитивна бруцелаовісна сироватка, робочий титр в РДСК 1:40, виробник ТОВ НДП «Ветеринарна медицина»; «Набір для діагностики хламідіоза сільськогосподарських тварин в РСК і РДСК», серія №1 і №5 2009 р., робочий титр хламідійного антигену 1:32, позитивна сироватка робочий титр 1:10, виробник ГНУ ВНИТИБП м. Щолково, Росія.

Індикаторна гемолітична система: 2,5 % відмиті розчинником еритроцити барана, сенсibilізовані гемолізином, комерційний набір «Сироватка крові кроля гемолітична (гемолізін) для реакції зв'язування комплекменту (РЗК)», серія 1, робочий титр 1:600, 2010 р., ТОВ НДП «Ветеринарна медицина». У дослідженнях використали відтитровану дозу комплекменту (2 і 3 гемолітичні одиниці CH_{100}), комерційний набір «Комплемент сухий морської свинки» серія 1, 2010 р. виробник ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Компоненти реакції розводили розчинником (0,85 % розчин NaCl).

Обладнання для постановки і обліку мікрометоду РЗК: восьми- та одноканальні мікропіпетки, шейкер-термостат фірми ELMY Sky line, спектрофотометр «Sunrise» для ELISA, водяна баня, лабораторна центрифуга, 5000 об/хв. Реакцію ставили в об'ємі 100 мкл у мікро титрувальних плахах з U-образним дном фірми «Медполімер» (по 20 мкл кожного реагенту: сироватка, антиген, комплекмент, гемолізін, еритроцити).

Постановку і комп'ютерний облік результатів мікрометоду РЗК у імунологічних системах для виявлення антитіл проти збудників бруцельозу, інфекційного епідидиміту баранів та хламідіозу овець проводили за технологією, розробленою у відділі вивчення бактеріальних хвороб