

DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-03.21>

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОНТРОЛЯ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ
АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КЛОСТРИДИОЗОВ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MONITORING THE IMMUNOGENIC ACTIVITY
OF AN ASSOCIATED VACCINE AGAINST CATTLE CLOSTRIDIOSIS**

Капустин А.В.* , Лаишевцев А.И., научные сотрудники
Kapustin A.V., Laishevtcev A.I., Researchers

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**
All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Скляр О.Д., Абросимова Н.С., научные сотрудники
Sklyarov O.D., Abrosimova N.S., Researchers

**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Research Institute for Control Standardization and
Certification of Veterinary Preparations, Moscow, Russia

*E-mail: kapustin_andrei@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных, вызванные бактериями рода *Clostridium spp.*, ввиду своего стремительного течения, слабо поддаются лечению, именно поэтому данные инфекции целесообразнее предотвращать с использованием средств специфической профилактики. Поскольку различные виды клостридий являются возбудителями принципиально различных заболеваний, то наилучший профилактический эффект достигается с использованием ассоциированных препаратов. При этом для разработчиков ассоциированных препаратов остро встаёт вопрос контроля иммуногенной активности каждого из компонентов. В данной работе описаны апробированные методы качественного и количественного контроля иммуногенности компонентов ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота.

ABSTRACT

Infectious diseases of farm animals caused by *Clostridium spp.* bacteria, due to their rapid flow, are not amenable to treatment, which is why it is more appropriate to prevent these infections using specific prevention means. Since different types of clostridia are the causative agents of fundamentally different diseases, the best preventive effect is achieved with the use of associated drugs. At the same time for developers of associated drugs, the issue of controlling the immunogenic activity of each component is acute. In the present work, the approved methods of qualitative and quantitative control of the immunogenicity of the components of the associated vaccine against cattle clostridiosis are described.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Анаэробные инфекции, вакцинация, специфическая профилактика, контроль иммуногенной активности.

KEY WORDS

Anaerobic infections, vaccination, specific prevention, control of immunogenic activity.

Клостридии широко распространены в окружающей среде, так, в настоящее время известно более 180 видов бактерий данного рода, среди которых патогенностью и токсигенностью обладают лишь некоторые из них. К наиболее патогенным видам стоит относить *Clostridium botulinum*, *Cl.chauvoei*, *Cl.fallax*, *Cl.haemolyticum*, *Cl.oedematiens*, *Cl.perfringens*, *Cl.septicum*, *Cl.sordelli*, *Cl.sporogenes*, *Cl.tetani*, *Cl.histolyticum*, которые в свою очередь вызывают такие заболевания как ботулизм, столбняк, газовая гангрена, бродячий, некротический гепатит, анаэробная энтеротоксемия и т.д. [12, 14].

Основную роль в патогенезе клостридиозов играют высокоактивные экзотоксины, которые образуются в процессе размножения в организме животных, а также при росте на питательных средах [9, 17].

Воздействие этих экзотоксинов на организм происходит очень стремительно, и даже своевременно начатое лечение не всегда приводит к положительному результату. Единственным эффективным методом борьбы с клостридиозами является специфическая профилактика. Учитывая важность вакцин в борьбе с анаэробными инфекциями, особое внимание необходимо уделять контролю качества выпускаемых иммунобиологических препаратов [1, 6, 15, 18].

Все существующие в настоящее время методы контроля препаратов подразделяются на качественные и количественные. С помощью качественных методов можно определить только пригодность препарата к использованию на основании лимита минимальной активности. Количественные методы оценки иммунитета дают возможность определить не только качественный состав препарата, но и степень его специфической активности и спрогнозировать продолжительность иммунитета. Для воспроизведения количественных методов контроля вакцин против клостридиозов используют международные стандартные образцы токсинов и антитоксических сывороток [11, 16, 19, 20].

На момент начала исследований в 2009 году РФ не выпускались ассоциированные вакцины для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота (КРС), соответственно отсутствовали методы их контроля. Из всего арсенала вакцин против клостридиозов выпускались лишь вакцина против эмфизематозного карбункула и столбнячный анатоксин. Профилактика злокачественных отеков, некротического гепатита, анаэробной энтеротоксемии была не возможна из-за отсутствия препаратов. Это обстоятельство послужило толчком к тому, что на Российский рынок ветеринарных препаратов хлынул поток зарубежных лекарственных средств и средств специфической профилактики [4, 5, 7, 10].

Целью нашей работы было получение многокомпонентной ассоциированной поливалентной вакцины против наиболее клинически значимых клостридиозов крупного рогатого скота. Для осуществления поставленной цели была изучена этиологическая структура клостридиозов, подобраны высоко токсигенные штаммы, отработана современная технология культивирования и обработки антигенов. Большая часть компонентов вакцины стала изготавливаться в виде очищенных от балластных веществ и концентрированных токсидов, а не бактеринов, как было ранее. Эти изменения состава и технологии изготовления препарата позволили получить безопасный, высокоэффективный препарат широкого спектра действия, а также значительно увеличить длительность иммунитета с 6 до 12 месяцев.

Полученные экспериментальные образцы вакцины по своим характеристикам соответствовали зарубежным аналогам и были эффективны при профилактике анаэробных болезней у восприимчивых животных. Однако оставался не решенным вопрос контроля качества иммуногенной активности препарата на лабораторных животных. Существовавшие на территории Российской Федерации (РФ) методы контроля анаэробных препаратов, применяемых в ветеринарии, были устаревшими и не давали реального представления о качестве препарата [2, 3].

Еще раз оговариваясь, что вакцин против клостридиозов КРС не существовало, приводим в качестве примера описание методов контроля иммуногенности препаратов против клостридиозов овец, частично совпадающих по структуре с новым препаратом:

1. Вакцина против браздота, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят инактивированная концентрированная, состоит из инактивированных формалином антигенов *Cl.perfringens* типов В, С, D, *Cl.septicum*, *Cl.oedematiens*. Контроль иммуногенности компонентов *Cl.perfringens* типа В и С, а также *Cl.oedematiens* проводился путем прямого заражения трех дважды иммунизированных и двух контрольных кроликов активно растущими культурами указанных клостридий. Данный метод имел существенные недостатки:

- использовалось небольшое количество животных, что не позволяет достоверно подтвердить иммуногенность и статистически обработать полученные результаты;
- отсутствует возможность стандартизировать заражающую дозу контрольных штаммов, так как используются нативные активно растущие культуры;
- заражения штаммами, вызывающими гангренозное поражение мышц, не гуманно, так как, даже в случае выживания животных, что говорит о наличии иммунитета, вызванного введением испытуемого препарата, образуется гангренозное поражение конечности, что ведет к страданиям животного.

Компонент *Cl.perfringens* тип D в вакцине контролировался путем постановки реакции нейтрализации эpsilon-токсина сыворотками иммунизированных кроликов, что в принципе отвечало современным требованиям к контролю качества анаэробных препаратов, но используемый метод был качественным и не позволял оценить степень напряженности иммунитета.

2. Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец (состав идентичный предыдущей вакцине), имел более совершенный контроль, заключающийся в количественной оценке титра антител в крови иммунизированных животных в единицах связывания токсина. Однако огромным недостатком метода являлось высокая стоимость контроля, так как в качестве подопытных животных использовались взрослые овцы, а также в стране не выпускались стандартные антитоксические сыворотки, что делало этот метод контроля практически не воспроизводимым. Использование овец в опыте имело еще одну негативную сторону, так перед контролем приходилось проверить на наличие антител к клостридиям большое количество животных для выявления серонегативных особей, так как у многих имелись собственные антитела в высоком титре.

Таким образом, для всесторонней и количественной оценки качества нового ассоциированного препарата, существующие методы не подходили, и предстояло разработать современный и приемлемый способ контроля качества иммуногенности вновь разработанной вакцины. Учитывая отсутствие аналогов, был проведен ряд экспериментов по отработке методов контроля иммуногенной активности многокомпонентной вакцины.

Согласно литературным данным, контроль качества иммунитета осуществляется путем постановки реакции нейтрализации токсинов клостридий сыворотками крови кроликов, которых и было решено использовать для контроля иммуногенности большинства компонентов вакцины.

К основным преимуществам этих животных можно отнести удобство работы исследователя, возможность получения большого количества сыворотки крови от одного животного, а также отсутствие в популяции серопозитивных особей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко», а также в виварии Вышневолоцкого филиала ВИЭВ с опытной базой (о. Лисий).

Для определения иммуногенной активности поливалентной ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота использовались кролики

породы шиншилла массой 2,5-3,0 кг, беспородные белые мыши массой 16-18 гр, стандартизированные лиофильно высушенные токсины *Cl.perfringens* типов А, В, С, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi* т. В, физиологический раствор рН 7,2, шприцы, стандартные антитоксические сыворотки токсинам *Cl.perfringens* типов А, С, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi*.

В ходе работы применяли эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуногенную активность вакцины по отношению к *Cl.perfringens* типов А, В, С, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi*, оценивают путем постановки реакции нейтрализации токсинов указанных видов клостридий антителами сыворотки крови вакцинированных кроликов.

Для этого проводили иммунизацию 6 кроликов массой 2,5–3,0 кг. Вакцину вводили двукратно внутримышечно с интервалом 28 дней в объеме 1,5 см³, что составляло половину дозы для восприимчивых животных. Через 14 дней после второй вакцинации у подопытных кроликов брали кровь и получали сыворотки. Сыворотку крови каждого животного в группе объединяли в стерильном флаконе в равных объемах, перемешивали и использовали для постановки реакции нейтрализации на белых мышах.

Для проведения реакции нейтрализации (РН) использовали стандартизированные токсины *Cl.perfringens* типов А, В, С, D, *Cl.novyi* с различной активностью. Стандартизацию указанных токсинов проводили с использованием международных антитоксических сывороток, приобретенных в ГИСК им. Тарасевича. Всего было использовано пять разведений токсинов с активностью 10, 15, 20, 25, 30 Dlm/мл для белых мышей массой 16–18 г и токсин *Cl.tetani* в разведениях 50, 100 и 200 Dlm/мл.

Общую пробу сыворотки разливали в 6 пробирок по 1,5 см³, после чего в них вносили рабочие растворы токсинов клостридий в объеме 1,5 см³: в 1 –ую - *Cl.perfringens* тип А, во 2 –ую - *Cl.perfringens* тип В, в 3 – ю - *Cl.perfringens* тип С, в 4 –ую - *Cl.perfringens* тип D, в 5 –ую - *Cl.novyi* тип В, в 6 –ую - *Cl.tetani*.

Смесь токсинов с сывороткой перемешивали, стараясь не допускать образования пузырьков воздуха, и помещали в термостат на 45 мин при температуре 37 °С. Этого времени было достаточно для нейтрализации токсинов клостридий имеющимися в сыворотке крови антителами. Затем каждую пробу смеси токсин/сыворотка вводили 5 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 см³.

Для контроля активности токсинов каждый из них разводили так, чтобы в 1,0 см³ раствора содержалось 2 Dlm/мл для белых мышей указанной массы. Растворы токсинов перемешивали, прогревали в термостате 45 мин при 37 °С и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 мышей на каждую пробу, токсин *Cl.tetani* вводили внутримышечно в области корня хвоста.

После проведения инъекций за животными устанавливали наблюдение в течение 72 часов. Серию вакцины считали активной, если после введения белым мышам смеси токсина с сывороткой живыми остаются не менее 4 из 5 использованных животных при гибели не менее 4 контрольных белых мышей (Таблиц 1).

Таблица 1 – Определение дозы токсинов клостридий, нейтрализуемых антитоксическими сыворотками

Контролируемый компонент	Дозы							
	10 Dlm/мл	15 Dlm/мл	20 Dlm/мл	25 Dlm/мл	30 lm/мл	50 lm/мл	100 Dlm/мл	200 lm/мл
Cl. Perf. Тип А	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	-	-	-
Cl. Perf. Тип В	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	-	-	-
Cl. Perf. Тип С	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	-	-	-
Cl. Perf. Тип D	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
Cl. Novyi	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
Cl. Tetani	-	-	-	-	-	5/5	5/5	5/5

В результате проведенной работы было установлено, что мыши, которым вводили смесь токсин/сыворотка с содержанием токсинов *Cl.perfringens* и *Cl.novyi* активностью 10, 15 и 20 Dlm/мл оставались живы в 100 % случаев при проверке активности компонентов *Cl.perfringens* тип В, С и *Cl.novyi* и в 80 % случаев по компонентам *Cl.perfringens* тип А и D. Также вакцина обеспечивала накопление антител у вакцинированных кроликов, позволяющих нейтрализовать токсин *Cl.tetani* с активностью 100 и 200 Dlm/мл.

Помимо разработки методов контроля иммуногенной активности перечисленных компонентов, проведены опыты по оценке активности компонентов *Cl.chauvoei* и *Cl.septicum*.

Оценку проводили существующими методами, предусматривающими заражение предварительно двукратно иммунизированных животных. Для определения иммуногенной активности компонента *Cl.chauvoei* вакцины использовались морские свинки, а для *Cl.septicum* – белые мыши.

Для контроля активности компонента *Cl.chauvoei* вакцину вводили 10 морским свинкам двукратно подкожно в области холки интервалом 21 день в дозе 1,0 см³. Через 14 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных морских свинок заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *Cl.chauvoei* - R₁₅ в дозе 20 LD₅₀, которую предварительно устанавливали на животных-аналогах. Заражающую культуру вводили внутримышечно в дозе 0,1 см³ с добавлением 0,2 см³ 10 % раствора хлористого кальция. Срок наблюдения за животными устанавливали 5 суток.

Серия вакцины считается активной, если после заражения выживали не менее 80 % иммунизированных морских свинок при гибели 80–100 % контрольных животных.

Оценку иммуногенности компонента *Cl.septicum* проводили путем заражения вакцинированных белых мышей контрольным штаммом *Cl.septicum* № 1098.

Вакцину вводили 10 белым мышам массой 16–18 г двукратно подкожно с интервалом 21 день в области холки в дозе по 0,5 см³. Через 14-16 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных белых мышей заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *Cl.septicum* №1098 в дозе 3 LD₅₀. Заражающую культуру вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 см³.

Учет результатов проводили через 72 часа. Серия вакцины считается активной, если после заражения выживают не менее 80 % иммунизированных белых мышей при гибели 80–100 % контрольных животных.

Проведенное исследование показало, что использование предложенного метода позволяет получить результаты, подтверждающие эффективность вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из представленных данных, в результате проведенных опытов был отработан метод контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. В полученных от кроликов, дважды иммунизированных испытуемым препаратом, сыворотках крови титры антитоксических антител в отношении альфа, бета и эпсилон токсинов *Cl.perfringens* и токсина *Cl.novyi* позволяли нейтрализовать 20 Dlm/мл, а *Cl.tetani* – 100 Dlm/мл. Также получено подтверждение иммуногенности компонентов против эмфизематозного карбункула и браздота в ранее описанном варианте, несмотря на большее количество компонентов в препарате.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kapustin A.V. The study of immunogenic activity of anaerobic infection's experimental vaccine caused by *Clostridium sordellii* of cattle // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 60. № 12. С. 241-246.

2. Kolesnikova Yu. N. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of clostridium//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Vol. 56. №8. pp. 39-48.
3. Kolesnikova Yu. Etiology and clinico-morphological manifestation of anaerobic enterotoxaemia of young cattle // International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. Vol. 7. №S2. Pp. 228-231.
4. Kovaleva E. Phage detection of pathogen microorganisms in agricultural ecosystems monitoring as part of sectoral foresight // International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. T. 7. №S2. C. 247-249
5. Laishevtcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by Mannheimia haemolytica // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 52. №4. C. 3-12.
6. Verkhovsky O.A. Structural composition of the bacterial and fungal microflora in the eyes of cattle with an infectious keratoconjunctivitis // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 57. № 9. C. 97-104.
7. Василевич Ф.И. Практическое руководство по борьбе с кровепаразитарными болезнями домашних животных. – М.: ЗооВетКнига. – 2015. – 86 С.
8. Гулюкин, М.И. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий против инфекционных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах российской Федерации/М.И. Гулюкин, К.П. Юров, Ю.Д. Караваев и соавт. // ГНУ ВИЭВ, ФГУ «Центр ветеринарии». - М. - 2007.-С.14.
9. Капустин А.В. Питательная среда, обеспечивающая стабильное накопление токсинов при культивировании некоторых штаммов клостридий//В сборнике: Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011. С. 54-56.
10. Капустин А.В. Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «кlostбовак-8» на неблагоприятном по злокачественному отёку, браздзоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №11. С. 33-40.
11. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота // В сборнике: Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество), 2011. С. 53-54.
12. Куриленко А. Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных: учебное пособие. М., 2005.
13. Максимович В.В. Эпизоотология и инфекционные болезни//Минск: ИВЦ Минфина, 2012. 775 с.
14. Моторыгин А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота // Вестник ветеринарии, №1(64), 2013 г. Стр. 71-73
15. Сляров О.Д. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота // Российский ветеринарный журнал. 2017. № 1. С. 20-23.
16. Сляров О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. 2016. №4. С. 15-17.
17. Сляров О.Д. Эффективность применения вакцины «кlostбовак-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами Clostridium spp. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №9. С. 6-11.
18. Скородумов, Д.И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. /Д.И. Скородумов. -М.: ИзографЪ, 2005. -С. 344-346.
19. Сидорчук А.А. и др. Клостридиозы животных // учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности 310800 - Ветеринария. Москва, 2004.
20. Сидорчук А.А. Значение анаэробных микроорганизмов и их ассоциаций в норме и при патологии у сельскохозяйственных животных. //В сборнике: Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней животных Межвузовский сборник научных трудов. Москва, 1996. С. 177-181.