

УДК 613:619:578:083.825.1

**Керимбаев А.А., Копеев.С.К., Раметов Н.М., Рябинникова А.,
Кирикбаев С., Орынбаев М.Б.**

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК,
Казахский национальный аграрный университет МСХ РК,
Киргизский государственный университет им. И. Арабаева*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ 4 СЕРОТИПА

Аннотация

В работе представлены результаты по определению иммуногенности и сроков наступления иммунитета у лошадей, привитых экспериментальной серией инактивированной культуральной вакциной против герпесвируса лошадей. Исследования показали, что после однократного введения экспериментальной серии инактивированной вакцины на 7 сутки в организме привитых животных вырабатываются антитела в 4 и более раза выше, чем до вакцинации - достаточные для защиты животных от заболевания. На 21 сутки после двукратного применения экспериментальной серии вырабатывался напряженный иммунитет.

Ключевые слова: вакцина, герпесвирус, иммуногенность, культура клеток, антитела.

Введение

Ринопневмония лошадей широко распространена во многих странах Европы, Южной Азии, Африки и на обоих субконтинентах Америки. Значительная часть лошадей на всех континентах является носителями антител к вирусу болезни. В последние годы ринопневмонию диагностировали в ряде стран Европы, в том числе в странах СНГ [1, 2, 3, 4].

Возбудитель – ДНК-геномный вирус семейства Herpesviridae, подсемейства Alphaherpesvirinae. Вирус репродуцируется в слизистых оболочках органов дыхания, вызывая их воспаление, затем поступает в кровь и разносится по всему организму. У жеребых кобыл проникает через плаценту, размножается в тканях плода, вызывая его гибель и аборт. Болеют лошади всех возрастных групп, но наиболее восприимчив молодняк до 1 года. Источником возбудителя инфекции являются больные животные и вирусоносители, выделяющие вирус с секретами и экскретами, абортрованными плодами и плодовыми оболочками. Инкубационный период - до 10 дней [1, 3].

В настоящее время известны герпесвирусы лошадей 9 типов, представленные альфа - и гамма герпесвирусами. Из герпесвирусных болезней лошадей наибольшее экономическое значение имеют инфекции, возбудителями которых являются ВГЛ-1, вызывающий массовые аборты у кобыл, патологию органов дыхания у жеребят, спорадические случаи миелозэнцефалопатии у лошадей, независимо от возраста и физиологических особенностей; ВГЛ-4 - возбудитель ринопневмонии и спорадических абортов [5].

Для защиты от инфекции ВГЛ-1 необходимы иммунные реакции, связанные с функциями вируснейтрализующих антител и цитотоксических Т-лимфоцитов. В предотвращении абортов и миелозэнцефалопатии ВГЛ-1 важным этапом является контроль клеточно - ассоциированной виремии. Секреторные антитела класса IgA вероятно играют основную роль как первая линия защиты в ограничении инфекции респираторного тракта. Экспериментальное интраназальное заражение пони показало снижение выделения вируса из носоглотки в течение 3-13 недель после первичного заражения. Вакцинация может

усилить продолжительность секреции IgA. В этом направлении представляет интерес стратегия вакцинации с использованием внутримышечного способа иммунизации и аппликации антигена на слизистую оболочку носовой полости. Такая схема иммунизации позволяет снизить вирусовыделение из носоглотки и ограничить распространение инфекции во время вспышки РПЛ [6, 7].

В Казахстане встречаются возбудители двух иммунологически самостоятельных типов герпесвируса лошадей: герпесвирус лошадей 1 (ГВЛ-1) вирусного аборта, и герпесвирус лошадей 4 (ГВЛ-4) ринопневмонии, инфекция которого часто ассоциируется с респираторными заболеваниями жеребят [2].

Для многих инфекционных болезней вакцинация является основной и ведущей мерой профилактики. К их числу вполне обоснованно относится герпесвирусные заболевания. В Республике Казахстан решение о вакцинации принимается в зависимости от эпизоотической ситуации. Однако, владельцам спортивных животных, для участия в соревнованиях вакцинироваться все равно придется, независимо от их места жительства, иначе они могут быть не допущены к стартам. Вакцинацию также в обязательном порядке надо проводить и племенным животным, и особенно кобылам, так как ринопневмония - это одна из наиболее вероятных причин абортов на поздних сроках жеребости. Своевременная иммунизация в большинстве случаев позволяет предупредить клиническое проявление болезни и повышает сохранность жеребят.

Целью настоящей работы являлось определение сроков наступления иммунитета у лошадей, привитых экспериментальной серии инактивированной культуральной вакциной против ринопневмонии лошадей.

Материалы и методы исследований

В опытах использовали лошадей в возрасте 10-12 месяцев.

В работе использовали неконцентрированные и концентрированные экспериментальные серии инактивированной культуральной вакцины против герпесвируса лошадей.

Сыворотки крови животных на наличие противовирусных антител исследовали в реакции нейтрализации (РН). Постановку реакции проводили на культуре клеток RK-13 по общепринятой методике с постоянной дозой вируса и двойными разведениями сыворотки.

Контрольное заражение иммунизированных лошадей вирулентным вирусом герпесвируса лошадей штамм Equid herpesvirus 4/KZ/2015 проводили на 21 сутки после ревакцинации.

В качестве контроля использовали не вакцинированных против герпесвируса двух лошадей.

Результаты исследований и их обсуждение

Для определения иммуногенных свойств инактивированной культуральной вакцины против герпесвируса лошадей вводили экспериментальные серии вакцин. Опыт проводили на 2 группах лошадей по две лошади в каждой и одно животное в качестве контрольной.

Первая подопытная группа: двум лошадям вводили вакцину внутримышечно по 2 см³ в область верхней трети шеи образец вакцины серия №1.

Вторая подопытная группа: двум жеребяткам вводили внутримышечно аналогично первой группе образец вакцины серия №2.

Ежедневно проводили термометрию вакцинированных животных и осматривали место инъекции на развитие поствакцинальных осложнений.

На 7, 14 и 21 сутки после вакцинации отбирали сыворотки крови, которые исследовали в реакции нейтрализации (РН) на наличие вирусоспецифических антител против герпесвируса лошадей. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Уровень антител у лошадей, привитых экспериментальными сериями вакцин

Вакцина	Номер животного	Титр ВНА после вакцинации (log2)			
		0	7	14	21
Неконцентрированная (№1)	Лошадь 1	0	6,25±0,06	8,25±0,06	10,25±0,06
	Лошадь 2	0	8,25±0,06	8,75±0,06	10,75±0,06
Концентрированная (№2)	Лошадь 3	0	7,25±0,06	8,25±0,06	10,5±0,08
	Лошадь 4	0	7±0,16	8,25±0,06	10,25±0,06

Из данных представленных в таблице 1 видно, что уже на 7 сутки введения экспериментальных серий инактивированной вакцины против герпесвируса лошадей в организме привитых животных вырабатывались антитела в 4 и более раза выше, чем до вакцинации. Согласно рекомендациям экспертов МЭБ увеличение титра вируснейтрализующих антител у привитых лошадей в сравнении с контрольными в 4 и более раз свидетельствуют о достаточной иммуногенности вакцины.

Таким образом полученные результаты свидетельствуют, что напряжённый иммунитет в организме лошадей наступает уже на 7 сутки после применения экспериментальной серии вакцины против герпесвируса лошадей. При этом высокие титры антител были отмечены у животных, привитых как неконцентрированной, так и концентрированной вакциной.

Однако эксперты МЭБ отмечают, что для оценки эффективности вакцин серологических исследований недостаточно, и рекомендуют проводить контрольное заражение всех вакцинированных и контрольных животных вирулентным штаммом герпесвируса лошадей. В связи, с чем на 21 сутки после первого введения вакцины мы проводили ревакцинацию животных соответствующей серией вакцины в дозе 2 см³ в область верхней трети шеи внутримышечно. Напряженность иммунитета определяли по уровню специфических антител в сыворотках крови, отобранные через 14 и 21 день после ревакцинации в РН. На 21 сутки после ревакцинации проводили контрольное заражение вирулентным вирусом. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты изучения иммуногенности после ревакцинации экспериментальными сериями вакцин

Вакцина	Номер животного	Титр ВНА после ревакцинации (log2)		Результаты контрольного заражения
		14 сут	21 сут	
Неконцентрированная	Лошадь 1	10,5±0,06	11,25±0,08	-
	Лошадь 2	10,25±0,02	11,5±0,06	-
Концентрированная	Лошадь 3	10,5±0,06	11,25±0,08	-
	Лошадь 4	10,25±0,02	11,0±0,02	-
Контроль	Лошадь 5	Н.и.	Н.и.	+
Примечания: «-» - животное не заболело «+» - животное заболело с клиническими признаками болезни				

Из данных представленных в таблице 2 видно, что на 21 сутки после двукратного применения концентрированной и неконцентрированной вакцин у привитых животных вырабатывался напряженный иммунитет. Все вакцинированные животные после контрольного заражения оставались клинически здоровыми в течение 14 суток, в то время

как контрольное животное заболело с проявлением клинических признаков болезни (повышение температуры тела, истечения из носа).

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что уже на 7 сутки введения экспериментальных серий инактивированной вакцины против герпесвируса лошадей в организме привитых животных вырабатывались антитела в 4 и более раза выше, чем до вакцинации, а также на 21 сутки после двукратного с интервалом в 21 день применения концентрированной и неконцентрированной вакцин у привитых животных вырабатывался напряженный иммунитет.

Литература

1. OIE – World organization for animal health / World Animal Health Information Database (WAHID) Interface //
2. *Patel J.R., Heldens J.* Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review // *Vet J.* – 2005. – Vol. 170, – 1. – P. 14-23.
3. *Taouji S., Collobert C., Gicquel B., Sailleau C., Brisseau N., Moussu C., Breuil M.F., Pronost S., Borchers K., Zientara S.* Detection and isolation of equine herpesviruses 1 and 4 from horses in Normandy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2002. – Vol. 49, – 8. – P. 394-399.
4. *Gur S., Yapici O.* Equine Herpesvirus type 1 and 4 in Individually Reared Horses in Central and Western // *Acta Vet. Brno.* – 2008. – Vol. 77. – P. 609-613.
5. *Юров К.П.* Инфекционные болезни лошадей // Изд-во «Грааль». - 2000. - С. 19-36
6. *Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D., Smith K.C.* Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion // In: *Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.-R., Equine Infectious Diseases VIII.* R&W Publications, Newmarket, UK. – 1999. – P. 129–146.
7. *Breathnach C., Yeargan M.R., Sheoran A.S., Allen G.P.* The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens // *Equine Vet. J.* – 2001. – 33: 651 - 657.

Керимбаев А.А., Копеев С.К., Раметов Н.М., Рябинникова А.И.,
Кирикбаев С.Т., Орынбаев М.Б.

ЖЫЛҚЫНЫҢ 4-ШІ СЕРОТИПІНІҢ ГЕРПЕСВИРУСЫНА ҚАРСЫ БЕЙБЕЛСЕНДІРІЛГЕН ВАКЦИНАНЫҢ ИММУНОГЕНДІЛІГІН АНЫҚТАУ

Аңдатпа

Бұл жұмыста жылқы иммунитетінің қалыптасу мерзімін және иммунногенділігін анықтау бойынша жылқының герпесвирусына қарсы тәжірибелік топтамасын бейбелсендірілген өсінділі вакцинаға енгізілген нәтижелері көрсетілген. Зерттеулер көрсеткендей бейбелсендірілген вакцинаның тәжірибелік топтамасын бір реттік енгізгеннен кейін 7-ші тәулікке қарай енгізілген жануардың ағзасында вакцинациялауға дейінгі жағдайға қарағанда антидене 4 және одан да жоғары есе өндіріледі– бұл жануарды аурудан қорғауға жеткілікті. Тәжірибелік топтаманы екі реттік қолдануынан кейін 21-ші тәулікке қарай үстемелі иммунитет өндірілді.

Кілт сөздер: вакцина, герпесвирус, иммунногенділік, торша өсінділері, антидене.

Kerimbayev A.A., Kopeyev S.K., Rametov N.M., Ryabinnikova A.I.,
Kirikbayev S.T., Orynbaev M.B.

DEFINITION OF IMMUNOGENICITY OF INACTIVATED CULTURAL VACCINE FOR EQUINE HERPES VIRUS SEROTYPE 4

Annotation

The results on definition of immunogenicity and immunity terms of horses which are vaccinated by experimental batch of the inactivated cultural vaccine for equine herpes virus are presented in this work. The researches had been shown that in the organism of the animals on 7 days after introduction of experimental batch is developed antibodies in 4 and more times higher than before vaccination (sufficient for animals protection). High-level immunity was developed for 21 days after double application of experimental batch.

Key words: vaccine, herpes, immunogenicity, cell culture, antibodies.

УДК 636.2:612.621

Кузьмина Т.И., Усенбеков Е.С., Бименова Ж.Ж.

ФГБНУ «ВНИИ генетики и разведения», Санкт-Петербург-Пушкин, Россия
НАО «Казахский национальный аграрный университет», Республика Казахстан

О РЕЗУЛЬТАТАХ (BRILLIANT CRESYL BLUE) BCB ТЕСТИРОВАНИЯ ООЦИТОВ КОРОВ, ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА IN VIVO ИЛИ IN VITRO

Аннотация

В статье приводятся результаты исследования функционального состояния ооцитов коров (завершенности фазы роста) с использованием прижизненного бриллиантового кристаллического красителя (brilliant cresyl blue - BCB) – индикатора активности фермента глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста - снижается. Использование в качестве диагностического теста для прижизненного тестирования ооцитов позволяет вести селекцию компетентных ооцитов, пригодных для экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: донорские ооциты, brilliant cresyl blue (BCB - тест), культивирование ооцит-кумулясного комплекса, фолликулогенез, мейоз.

Введение

Исследованиями установлено, что у коров в течение полового цикла происходят три волны роста фолликулов, в зависимости от диаметра фолликулы различаются: фолликулы на стадии роста с диаметром 2-5 мм, фолликулы, которые подвергаются атрезии, диаметром 5-8 мм, доминантный фолликул с диаметром более 8 мм. Обычно, количество фолликулов на стадии роста достигает 10-15, фолликулы, подвергающиеся к атрезии 4-5 и один фолликул становится доминантным и подвергается овуляции. Ооциты коров - источник получения нативных и реконструированных эмбрионов с использованием инновационных клеточных репродуктивных технологий (трансвагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением и культивированием эмбрионов, клонирование, трансгенез), позволяющих решать важные для разведения крупного рогатого скота проблемы воспроизводства и моделирование стад высокопродуктивных животных. Основные показатели таких технологий (процент трансферабельных эмбрионов, получение, жизнеспособного потомства) в настоящее время недостаточно высоки [1].