

**В. В. УХОВСЬКИЙ**, кандидат ветеринарних наук

**М. Л. СКАЛИГА**, аспірант

**А. В. ПИСКУН**, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

## РЕЗУЛЬТАТИ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ БІВАЛЕНТНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЛЕПТОСПІРОЗУ М'ЯСОЇДНИХ

У статті представлені результати дослідження трьох експериментальних серій інактивованої полівалентної вакцини проти лептоспірозу м'ясоїдних щодо: рН, стерильності, залишкової кількості інактиванту, повноти інактивації, нешкідливості та імуногенної активності.

*Ключові слова:* вакцина, лептоспіра, перебіг лептоспірозу, серогрупа, штам.

Лептоспіроз – зооантропонозна природно-вогнищева інфекція, яка характеризується короткочасною гарячкою, явищами анемії, жовтяничним забарвленням, некрозами на слизових оболонках і шкірі, кривавою сечею, атонією шлунково-кишкового тракту і схудненням тварин, абортми та народженням нежиттєздатного приплоду [1].

Лептоспіроз, який є однією з найбільш розповсюджених до цих пір антропозоонозних інфекцій в багатьох країнах світу та в Україні зокрема [2].

Одним із основних заходів боротьби з лептоспірозом є вакцинопрофілактика. Вакцину проти лептоспірозу використовують для активної імунізації тварин. Вона профілактує гострий перебіг хвороби, загибель тварин, аборти лептоспірозої етіології, лептоспіроносійство.

На сьогоднішній день нараховують більш ніж 250 сероварів лептоспір, об'єднаних у 26 серогруп [3].

Лептоспірозом хворіють тварини різних видів: впр, свині, коні, вівці, кози, олені, лисиці, пелі, норки, собаки та людина. [4–5].

Найбільш поширеними сероварами, що викликають лептоспіроз у собак є *Icterohaemorrhagiae Canicola*. Саме вони складають домінуючу частку серед сироварів лептоспір вже понад 30 років діагностики цього захворювання. Та з появою бівалентної вакцини, більшого поширення набули інші штами, включаючи *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Bratislava* і *Autumnalis* [6]. Це може бути результатом зростаючої кількості контактів між собаками і резервуарними господарями цих збудників [6]. Підбір сироварів лептоспір для виготовлення вакцин є дуже важливим етапом. Для найбільш ефективної профілактики потрібно використовувати лише ті серовари, які циркулюють у даному регіоні.

Біологічна промисловість України не випускає вітчизняну вакцину проти лептоспірозу м'ясоїдних, а застосовує для профілактики лише зарубіжні вакцини, тому нами були проведені наукові дослідження по удосконаленню та розробки нової технології виготовлення імунопрофілактичного препарату проти лептоспірозу м'ясоїдних.

Аналізуючи епізоотичну ситуацію, що склалася в Україні з лептоспірозу ІВМ НААН м'ясоїдних, співробітниками лабораторії лептоспірозу було розроблено та послідовно виготовлено три серії бівалентної інактивованої вакцини проти лептоспірозу м'ясоїдних з урахуванням етіологічної структури захворювання даного виду тварин.

Технічним результатом створеної вакцини є: підвищена імуногенна та антигенна активність відселекціонованих штамів (ресстраційні номери надані депозитарієм Державного наукового – контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів 354 та 360), які використовуються для виробництва вакцини; зменшена імунізуюча доза вакцини за рахунок сучасних методів концентрування за допомогою поліетиленгліколю.

**Мета роботи.** Вивчити властивості трьох, виготовлених, експериментальних серій полівалентних вакцин на лабораторних тваринах, за наступними показниками: рН, стерильність, залишкову кількість інактиванта, повноту інактивації, нешкідливість та імуногенну активність.

**Матеріали і методи дослідження.** При виготовленні трьох серій експериментальних бівалентних вакцин були використані два референтних штами лептоспір: *Icterohaemorrhagiae Canicola*. Перелік цих штамів наведений у таблиці 1. Усі серії цих вакцин була виготовлені з однієї серії штамів лептоспір та за тотожною технологією.

Штами лептоспір, використані для виготовлення вакцин, культивували на середовищі Кортгофа з додаванням 10 %-ної овечої сироватки крові та інкубацією у термостаті за температури 27–28°C.

Для виготовлення вакцин застосовували культури із накопиченням не менше 75 мільйонів лептоспір у одному сантиметрі кубічному, тобто не менше 60 лептоспір у полі зору мікроскопа, підрахунок клітин проводили за методом „вісяча крапля” у темному полі зору.

Таблиця 1

Перелік штамів, які використовували при виготовленні вакцини

№ з/п	серогрупа	серовар	штам	Ресстраційний номер
1.	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	ВГНКИ-2	354
2.	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	ВГНКИ-3	360

Кожну серогрупу лептоспір культивували окремо, потім їх зливали в одну ємкість та проводили інактивування розчином фенолу. Його додавали до культури у кількості 0,5% до об'єму вакцини. Консервовану культуру витримували за 27–28°C у термостаті 12 год, після чого проводили мікроскопію культури у темному полі мікроскопа.

Для концентрування вакцини суміш культур лептоспір у бутлі осаджували додаванням розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) 10–12% до об'єму препарату, попередньо приготувавши стерильний маточний розчин ПЕГ – 70%-ий. Після цього вакцину змішували магнітною мішалкою 10–15 хвилин.

Додатково концентрували препарат видаленням 50% надосадової рідини із суміші культур, які були інактивовані й осаджені.

Після внесення ПЕГ із бутля брали проби й перевіряли на стерильність.

Стерильність вакцини визначали за ГОСТом 28085 „Препарати біологічні. Метод бактеріологічного контролю стерильності.”

Концентрацію водневих іонів визначали рН-метром за інструкцією по його використанню. Визначення залишкової кількості інактиванта проводили згідно МУК 4. 1/4. 2. 588 – 96.

Для визначення повноти інактивації вакцини ми проводили три послідовних пасажі на середовищі Кортгофа з додаванням 10% кролячої сироватки крові. Для контролю використовували по три пробірки на кожний псаж із кожного флакону готової вакцини. Наявність живих лептоспір у полі зору мікроскопа визначали при мікроскопії в темному полі (збільшення 20×10×1,5 або 20×15).

Нешкідливість експериментальних серій вакцин визначали на лабораторних тваринах: безпородних білих мишах масою тіла 18 – 20 г., по 10 мишей на перевірку кожної серії.

Щеплення здійснювали шляхом підшкірного введення вакцин у дозі 0,3 см<sup>3</sup>. Місце введення обробляли 70%-м етиловим спиртом. Спостерігали за піддослідними тваринами 10 діб для визначення їх загального стану. Кожну тварину використовували один раз.

Антигенні властивості вакцини визначали на безпородних кролях масою тіла 3,0–3,5 кг, по п'ять тварин у групі для перевірки кожної серії вакцини.

З п'яти флаконів однієї серії вакцини після старанного збовтування відбирали стерильною піпеткою по 10 см<sup>3</sup> вакцини і переносили до стерильного флакону об'ємом 100 см<sup>3</sup>. Отриману середню пробу вакцини збовтували і вводили внутрішньовенно у дозі по 0,75 см<sup>3</sup> п'яти кроликам.

Через 25 днів у вакцинованих кролів відбирали кров і досліджували у реакції мікроаглотинації. Аналогічні дослідження провели з усіма трьома серіями вакцин. Тварини, що були задіяні у досліді промарковано до кожного досліді різним кольором.

Сироватку крові кролів досліджували в РМА із штамами відповідних сероварів лептоспір, що входили до складу випробованих серій вакцин.

Титри антигену у зазначеній реакції визначали у 6-ти розведеннях від 1:50 до 1:1600 (кратність 2). Розведення сироватки, в якому спостерігалась половина і більша аглотинація лептоспір, вважались за титр антигену.

Експериментальні дані обрахували статистично у програмі M.Exseel[7].

**Результати досліджень.** Усі серії препарату за зовнішнім виглядом і кольором представляли собою гомогенну сировату – білу рідину з незначним осадом, який при струшуванні легко розбивається до утворення гомогенної суспензії. Результати дослідження серій вакцини за показниками стерильності, повноти інактивації, залишкової кількості інактиванта (фенолу), нешкідливості та концентрації водневих іонів представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

**Фізичні та біологічні показники експериментальних серій вакцини проти лептоспірозу м'ясоїдних.**

Показники	Серія № 1	Серія № 2	Серія № 3
Концентрація водневих іонів (рН вакцини)	7,24	7,36	7,28
Стерильність	стерильна	стерильна	стерильна
Повнота інактивації	При триразовому пасажуванні вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспір	При триразовому пасажуванні вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспір	При триразовому пасажуванні вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспір
Нешкідливість	нешкідлива	нешкідлива	нешкідлива
Залишкова кількість інактиванта (фенолу)	0,48 %	0,41 %	0,47 %

Згідно вимог нормативної документації концентрація водневих іонів у готовому препараті повинна бути у межах 7,2–7,4. Якщо видно з даних таблиці 2 концентрація водневих іонів при дослідженні коливалась у діапазоні 7,24–7,36, що відповідає нормі. Перевірка препаратів на стерильність, згідно діючого ДСТУ, показала, що всі серії вакцин були стерильними.

У процесі триразового пасажування вакцини на живильне середовище для культивування лептоспір росту живих спірохет не реєстрували, що свідчить про повну інактивацію лептоспір у складі вакцини, які досліджували.

Залишкова кількість інактиванта у складі вакцини коливалась у діапазоні 0,41–0,48, тобто в межах допустимих концентрацій, яка не повинна перевищувати 0,5% згідно норми.

При визначенні нешкідливості вакцини, шляхом введення препарату лабораторним тваринам, встановлено, що за час спостереження усі тварини залишилися живими без будь-яких місцевих та симптоматичних проявів, спричинених вакциною. Вакцину вважали нешкідливою.

Таким чином за показниками стерильності, повноти інактивації, залишкової кількості інактиванта, нешкідливості та концентрації водневих іонів усі три серії вакцини відповідали вимогам та нормам нормативної документації.

При визначенні показників імуногенності вироблених препаратів, нами за принципом аналогів було сформовано три групи кролів (по 5 тварин у групі), дослідні зразки вакцини вводили внутрішньовенно у дозі по 0,75 см<sup>3</sup>. На 25-ту добу у вакцинованих кролів відбирали з вени кров і досліджували РМА. Отримані результати наведені в таблиці 3.

Перед проведення дослідження імуногенності вакцини у всіх піддослідних кролів була відібрана кров і дослідження в РМА на наявність лептоспірних антигенів. При постановці реакції використовували вісім діагностичних штабів лептоспір, вони належать до восьми серологічних груп *Icterohaemorrhagiae*, *Australis*, *Pomona*, *Canicola*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Grippotiphosa*, *Tarassovi*. У всіх кролів реакція була негативною.

За вимогами нормативно-технологічної документації вакцину вважають активною, якщо не менш, як у чотирьох із п'яти вакцинованих кролів, титр антигену до сироватки до таких серогруп лептоспір: *Icterohaemorrhagiae*, *Australis*, *Pomona*, *Tarassovi* буде нижче 1:00.

Результати досліджень свідчать про те, що усі серії експериментальних вакцин були імуногенними і відповідали показникам норм імуногенності, закладені в технічних умовах даного препарату. Титри приведені у таблиці 3.

## Титри антитіл у РМА щодо різних серогруп лептоспір у сироватці крові вакцинованих кролів на 25-ту добу після вакцинації

№ серії	Порядкові номери кролів	Титри антитіл до серогруп лептоспір	
		Icterohaemorrhagiae	Canicola
Серія №1	Кріль № 1	1:1600	1:1600
	Кріль № 2	1:800	1:200
	Кріль № 3	1:800	1:800
	Кріль № 4	1:1600	1:800
	Кріль № 5	1:800	1:800
	<b>Середній титр</b>	1:1120±384	1:840±304
Серія №2	Кріль № 1	1:600	1:800
	Кріль № 2	1:200	1:800
	Кріль № 3	1:600	1:600
	Кріль № 4	1:800	1:200
	Кріль № 5	1:600	1:200
	<b>Середній титр</b>	1:580±206	1:520±190
Серія №3	Кріль № 1	1:1600	1:1600
	Кріль № 2	1:800	1:200
	Кріль № 3	1:200	1:800
	Кріль № 4	1:1600	1:200
	Кріль № 5	1:1600	1:200
	<b>Середній титр</b>	1:1160±390	1:600±195

Як видно з таблиці введення усіх трьох експериментальних серій вакцини піддослідним кролям забезпечувало утворення специфічних протилептоспірозових антитіл. Це свідчить, що виготовлені препарати є імуногенними і відповідають вимогам технічних умов даного імунобіологічного препарату.

За результатами проведених досліджень колективом лабораторії лептоспірозу ІВМ НААН до ДНКІБШМ було подано «Сертифікат аналізу послідовно вироблених 3-х серій вакцини»

**Висновки.**

1. При дослідженні трьох експериментальних досліджень серій бивалентної інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин (варіант *canis*) встановлено, вони були нешкідливими для мишей при одноразовому підшкірному введенні у дозі 0,3 см<sup>3</sup>.
2. Титри антитіл вакцинованих експериментальними серіями вакцини відповідали вимогам технічних умов даного препарату.
3. За результатами досліджень встановлено, що усі три серії вакцини відповідали необхідним вимогам, і дана вакцина може бути випробувана на м'ясоїдних тваринах.

**Список використаної літератури**

1. Ленартович Л. С. Ранняя диагностика лептоспироза/ Л.С.Ленартович// Тез. докл. научн. – практ. конф. по борьбе с зоонозными инфекциями. – Черновцы. – 1985. – С. 53–54.
2. Ellis W. A. Diseases of swine / W. A. Ellis, London, – 1992. – 271 p.
3. Report of Taxonomic Subcommittee on leptospira of the International Cjmmettee on Systematic Bacteriology. – Munich, – 1978. – 214 p.
4. Terpstra W. J. Human leptospirosis, constraints in diagnosis and research. Leptospirosis on the African continent / W. J. Terpstra // Proceedigs of a CEC/STD3 Research meeting. Harare, – Zimbabwe. – 1992. – P. 12–18.
5. Baranton G. Control and prevention of Leptospirosis. Leptospirosis on the African continent. Proceed in gsofa CEC/STD 3 Research meeting / G. Baranton Harare // – Zimbabwe. – 1992. – P. 49 – 53.
6. Paster B. J., Dewhirst F. E. Phylogenetic foundation of spirochetes / B. J. Paster, F. E. Dewhirst // – J. M. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – P. 341–344.
7. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И. П. Ашмарин, – 1962. – С. 34–46.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА ПЛОТОЯДНЫХ / В. В. Уховский, В. В. Пискун, М. Л. Скалыга**

*В статье представлены результаты исследования трёх экспериментальных серий инактивированной поливалентной вакцины против лептоспироза плотоядных на: рН, стерильность, остаточное количества инактиватора, полноты инактивации, безвредности и иммуногенной активности.*

*Ключевые слова: вакцина, лептоспира, течение лептоспироза, серогруппа, штамм.*

**THE CONDUCT OF THE LABORATORY RESEARCHES OF BIVALENT INACTIVATED VACCINE AGAINST LEPTOSPIROSIS OF CARNIVORES / Ukhovskiy V. V., Pyskun A. V., Skalyga M. L.**

*The results of the researches on the three experimental series of the inactivated vaccine against leptospirosis of carnivores (variant *canis*) are presented on pH, sterility, residual quantity of the inactivator, completeness of inactivation, safety and immunogenic activity.*

**Рецензент** – кандидат ветеринарних наук **О. А. Тарасов**