

ВДОСКОНАЛЕННЯ ЗАСОБІВ СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ СТРЕПТОКОКОЗІВ ТА СТАФІЛОКОКОЗІВ ТВАРИН

Гадзевич О.В., м.н.с. лабораторії вивчення бактеріальних хвороб рогатої худоби Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У статті наведені результати дослідження дослідної серії вакцини проти стрептококових та стафілококових інфекцій тварин за показниками якості, антигенної та імуногенної активності. Дослідження показали, що вакцина має високу імуногенну та антигенну активність, нешкідлива, високоефективна для профілактики стрептококових та стафілококових інфекцій. Введення тваринам вакцини активізує як клітинний, так і гуморальний імунітет, про що свідчить збільшення популяції лімфоцитів, імуноглобулінів класу G, A і M та титрів аглютинуючих антитіл. Застосування вакцини викликає зростання лізоциму, загального білку, рівня ЦІК, при цьому не спричиняє пригнічення імунної системи у тварин.

Ключові слова: стрептококи, стафілококи, ентерококи, вакцина, імуногенна активність, імунітет.

Постановка проблеми. Одним з пріоритетних напрямів у сучасному тваринництві є вдосконалення і розробка нових засобів та заходів профілактики бактеріальних інфекційних захворювань, зокрема і стрептококової та стафілококової етіології. Засоби специфічної профілактики зазначених інфекцій не є досконалими.

Аналіз останніх публікацій. Стрептококози та стафілококози – інфекційні хвороби всіх видів сільськогосподарських, промислових, диких та лабораторних тварин, а також усіх видів птиць, бджіл, риб та плазунів. Стрептококози характеризуються сепсисом, пневмоніями, ентеритами, метритами, маститами, абортами, менінгітами, ураженням шкіри та суглобів. Збудниками інфекцій є патогенні види стрептококів, більшість з яких вражають і людей [1, 2, 3]. Основні прояви стафілококової інфекції - гнійні захворювання шкіри та підшкірної клітковини, стафілококовий сепсис, пневмонії, ентероколіт та ураження центральної нервової системи [2, 3].

В таблиці 1 представленні дані, щодо деяких патогенних видів стрептококів, зокрема *Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. agalaciae*, *Str. suis*, *Ent. faecalis* та стафілокока (*Staph. aureus*), що спричиняють інфекційні захворювання.

Представники родин Streptococcaceae, Enterococcaceae та Staphylococcaceae, що патогенні для тварин

Вид збудника	Форми клінічного прояву
Streptococcus pyogenes	у корів - мастит; у телят - ентерит у лошат - лімфангіт
Streptococcus pneumoniae	у телят, ягнят, рідше у поросят - септицемія, запалення суглобів, пневмонія, запалення кишечника
Streptococcus agalactiae	велика рогата худоба, вівці, кози, кішки - мастит; собаки - септицемія
Streptococcus suis	свині - септицемія, менінгіт, артрит
Enterococcus faecalis	птиці та різні види тварин - пневмонія, ентерит, менінгіт і артрит. Може бути причиною опортуністичних інфекцій та септицемії у курей, маститів у корів, інфекцій сечового тракту у собак, ендокардитів у ягнят і великої рогатої худоби
Staphylococcus aureus	рогата худоба та інші види тварин - пневмонії, мастити, ентерити та менінгіти.

За даними сучасної наукової літератури та за результатами власних досліджень, проведених з 2010 по 2012 р. серед мікроорганізмів, які отримали широке розповсюдження та спричиняли розвиток різних патологій були стрептококи. Застосування антибіотиків з профілактичною метою не захищає від захворювань цієї етіології, а їх масове, безсистемне використання приводить до поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Крім того, антибактеріальні засоби, які є імунодепресантами, знижують захисні сили організму, сприяючи активізації та колонізації умовно-патогенної мікрофлори. Таким чином, масове безконтрольне використання антибіотиків призводить до виникнення дисбактеріозу – головного патогенетичного чинника в активації стрептококів, стафілококів, сальмонел, кишкової палички та інших мікроорганізмів [1, 2, 3].

Мета досліджень: розробка та випробування у виробництві нешкідливої, високоімуногенної інактивованої вакцини проти стрептококових та стафілококових інфекцій сільськогосподарських тварин.

Матеріали і методи. За розробленою співробітниками ННЦ «ІЕКВМ» технологією були виготовлені дослідні серії вакцини. До складу вакцини входили комплекс анатоксинів та соматичних антигенів штамів Enterococcus faecalis №1, Streptococcus pneumoniae №2, Streptococcus pyogenes № 3 та Staphylococcus aureus № 44. Зразки вакцини були досліджені на предмет відсутності контамінації бактеріальної і грибною мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 [4] та мікоплазмами згідно ДСТУ 4613 [5]. Культуральними і біологічними методами було визначена повнота інактивації вакцинного препарату. У випадку відсутності росту мікроорганізмів на поживних середовищах та ознак захворювання і загибелі імунізованих мишей, вакцину вважали повністю інактивованою. Для визначення нешкідливості,

імуногенної та антигенної активності біопрепарату використовували лабораторних тварин. Для проведення досліджень за принципів аналогів було сформовано шість груп лабораторних тварин.

Нешкідливість та реактогенність визначали на лабораторних тваринах (білих мишах, кролях). Для визначення нешкідливості тваринам дослідної групи (n-15) вводили інактивовану вакцину. Контрольну групу (n-15) залишали неімунізованою. За тваринами спостерігали впродовж 10 діб. Під час досліду у тварин реєстрували зміни загального стану, реактивні зміни в місцях введення препарату. Для визначення імуногенності вакцини дослідним тваринам вводили препарат дворазово з інтервалом 14 діб (білим мишам підшкірно у дозі $0,5 \text{ см}^3$, кролям $1,5 \text{ см}^3$). Контрольна група лабораторних тварин залишалась інтактною. Через 14 діб після другого щеплення дослідних тварин (дослідної та контрольної групи) заражали внутрішньоперитонеально культурами стрептококів, ентерококів та стафілококів у летальних дозах (2×10^8 м.к.). Ефективність щеплення визначали рівнем антитіл у сироватці крові та стійкістю тварин до контрольного зараження. Від дослідних тварин через 7, 15, 30 і 45 діб після імунізації відбирали кров і визначали рівень антитіл в РНГА.

Вакцину вважали нешкідливою якщо за час спостереження всі дослідні тварини залишилися живими без будь-яких місцевих та симптоматичних проявів, спричинених вакциною.

Для визначення імунологічної дії та виключення імуносупресивних властивостей інактивованої вакцини на макроорганізм було сформовано дві групи тварин великої рогатої худоби (20 корів у віці 2-4 роки та 20 телят віком 1-4 місяців). Вакцину вводили внутрішньом'язово в дозі 4 см^3 дорослим тваринам та 2 см^3 телятам двократно з інтервалом 14 діб. За тваринами вели спостереження з визначенням загального клінічного стану, якісних та кількісних змін у сироватці крові. Проби крові у експериментальних тварин відбирали до щеплення, через 7 діб після першого введення вакцини та 7 діб після другого введення препарату. В сироватці крові визначали рівень антитіл до антигенів, що входять у склад вакцини. З метою виключення імуносупресивних властивостей у тварин визначали рівень загального білка, лейкоцитів, моноцитів загальноприйнятими в клінічній діагностиці методами [6]. Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦК) визначали за допомоги реакції преципітації з поліетиленгліколем [7]. Рівень імуноглобуліни класів G, A, M визначали методом радіальної імунодифузії в агаровому гелі [7]. Лізоциму активність сироватки крові оцінювали нефелометричним методом, а концентрацію лізоциму – за методом Укр.НДІЕВ [7,8].

Усі експериментальні дослідження на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики. Утримання, догляд за тваринами та їх годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду тварин.

Результати досліджень. Результати дослідження свідчать, що дослідні зразки вакцини відповідають вимогам ДСТУ 4483 та ДСТУ 4613. Відсутня контамінація бактеріальної та грибною мікрофлори, зразки вакцини є повністю інактивованими та нешкідливими для лабораторних тварин, під час спостереження при внутрішньочеревному та підшкірному введенні вакцини мишам в дозі $0,5 \text{ см}^3$ та кролям в дозі $1,5 \text{ см}^3$ не реєстрували випадків захворювань, загибелі тварин та запальних реакцій на місці ін'єкції.

Представлені в таблиці 2 дані свідчать про те, що дворазове щеплення білих мишей забезпечує формування стану несприйнятливості до зараження летальними дозами збудників інфекцій стрептококової, ентерококової та стафілококової етіології.

Застосування вакцини стимулює напрацювання імунітету у тварин до стрептококових антигенів, які входять до складу вакцини. Захист тварин дослідних груп від експериментальної інфекції, зумовлених різними збудниками, був в межах від 93,4 до 100 % (табл. 2).

Таблиця 2

Імуногенні властивості вакцини в досліді на лабораторних тваринах

Штам для зараження	Доза зараження	Групи тварин			
		дослідні		контрольні	
		заражено, гол	% захисту	заражено, гол	% захисту
Streptococcus pneumoniae №2	5 ЛД ₁₀₀	30	93,4	30	0
Streptococcus pyogenes № 3	5 ЛД ₁₀₀	30	100	30	0
Enterococcus faecalis №1	5 ЛД ₁₀₀	30	100	30	0
Staphylococcus aureus № 44	5 ЛД ₁₀₀	30	93,4	30	0

З таблиці 2 видно, що щеплення білих мишей вакциною створювало стійкість до зараження штамми Streptococcus pneumoniae №2 у 93,4 %, Streptococcus pyogenes № 3 – 100 %, Enterococcus faecalis №1 – 100 %, Staphylococcus aureus № 44 – 93,4 % тварин.

Результати серологічних досліджень свідчать про те, що у тварин імунізованими зразками вакцини напрацьовуються високі титри специфічних антитіл. З 7-ї доби після вакцинації рівень специфічних антитіл до антигенів різко підвищувався ($2,2 \log_2 \pm 0,6$). На 22 добу рівень антитіл максимально збільшувався і становив $7,6 \log_2$. Так, титр антитіл до антигену Streptococcus pyogenes № 3 до застосування препарату складав $2,8 \log_2 \pm 3,4$, тоді як після щеплення зростав до $7,6 \log_2 \pm 0,2$ у дослідних тварин, що в 3 рази вище в порівнянні з контрольною групою.

При визначенні нешкідливості та імуногенності дослідної серії вакцини було встановлено, що після імунізації через 14 діб формується напружений імунітет, що забезпечує захист тварин від збудників цієї інфекції.

Встановлено, що при застосуванні вакцинного препарату у тварин не спостерігається поствакцинальних ускладнень, а через 14 діб після ревакцинації формується напружений імунітет.

Після імунізації великої рогатої худоби за тваринами вели спостереження впродовж 6 місяців, фіксуючі зміни загального стану тварин, біохімічних показників крові, порівнюючи показники вакцинованих тварин з контрольною групою. Під час дослідів у вакцинованих тварин не було зафіксовано жодного випадку поствакцинальних ускладнень. Клінічні спостереження за щепленими тваринами свідчать про те, що експериментальні зразки вакцини є нешкідливими, застосування препарату не викликає негативних наслідків. А саме, у дослідних тварин не реєстрували набряки та абсцеси у місці введення, підвищення місцевої температури та температури тіла, погіршення загального стану тварин. Під час спостереження у тварин не було зареєстровано ніяких побічних реакцій та відхилень від фізіологічних норм, характерних для даного виду тварин.

Результати клініко-біохімічних досліджень проб сироваток крові тварин, що підлягали щепленню, свідчать про те, що препарат не спричиняє імуносупресивної дії на організм корів та телят. Реєстрували зростання рівня ЦІК в сироватці крові телят дослідної групи після щеплення вакциною відносно початкових значень, та у порівнянні з тваринами контрольної групи, зниження рівня мукопротеїнів після двократного введення біопрепарату. Все вищевказане свідчить про відсутність імуносупресивної дії вакцини на організм тварин. Мукопротеїни – білки-імуносупресори, які здатні гальмувати процеси перетворення Т- та В-лімфоцитів в антитілоутворюючі клітини, що призводить до зниження імунного статусу та розвитку імунодепресії в організмі тварин. Тому, зниження рівня мукопротеїнів після двократного введення біопрепарату дає можливість стверджувати про те, що вакцина не впливає негативно на імунокомпетентні клітини.

Таким чином, після застосування вакцини були отримані наступні результати (табл. 3).

Як видно з таблиці 3, у тварин після імунізації в порівнянні з тваринами контрольної групи реєстрували підвищення кількості загального білка та лейкоцитів, зокрема палочкоядерних та сегментоядерних субпопуляцій, що свідчить про активізацію клітинного імунітету. У сироватках крові щеплених тварин збільшувався рівень імуноглобулінів G, A і M у порівнянні з такими показниками до щеплення в контрольній групі, що свідчить про активізацію не тільки клітинного, але і гуморального імунітету. Застосування даного біопрепарату сприяє зростанню лізоциму, загального білку, рівня ЦІК, при цьому не спричиняє пригнічення імунної системи, про що свідчать показники рівня білків-імуносупресорів в сироватці крові та стабільний приріст лейкоцитів і відсутність інших нехарактерних змін показників сироватки крові та загально-клінічного стану тварин.

**Показники імунного статусу телят до та після застосування
вакцини**

Показники		До введення		Після ревакцинації	
		Дослідна група тварин (n=10)	Контрольна група (n=10)	Дослідна група тварин (n=10)	Контрольна група (n=10)
Кількість клітин	Лейкоцити, Г/л	9,0±0,26	8,8±0,34	11,8±0,28	9,2±0,43
	Лімфоцити, %	56,6±0,75	55,6±0,23	65,8±0,38	56,4±0,44
	Моноцити, %	2,9±0,12	3,2±0,12	5,2±0,23	3,6±0,16
	Нейтрофіли сегментоядерні, %	3,1 ±0,35	3,8 ±0,56	5,4±0,52	3,4 ±0,62
	Нейтрофіли паличкоядерні, %	23,6±0,67	22,4±0,28	34,8±0,56	22,2±0,23
Рівень специфічних антитіл, log ₂		2,2±0,25 ¹	3,0±0,32 ¹	6,6±0,51 ¹	3,6±0,60 ¹
		1,8±2,13 ²	1,7±0,15 ²	7,4±0,23 ²	1,9±1,10 ²
		2,2±0,34 ³	1,7±0,15 ³	7,6±0,20 ³	2,2±3,11 ³
		2,2±1,23 ⁴	2,0±0,12 ⁴	7,6±0,20 ⁴	2,1±0,10 ⁴
Загальний білок, г/л	64,8±1,56	66,08±2,25	80,45±1,62	65,64±1,24	
ЦіК, мг/мл	0,18±0,01	0,21±0,09	0,33±0,07	0,20±0,09	
Лізоцим, мкг/мл	46,51±0,44	45,57±0,52	91,14±0,47	45,60±0,60	
Ig G	15,56±0,12	16,26±0,16	23,2±0,18	16,46±0,12	
Ig M	1,67±0,02	1,76±0,02	2,86±0,06	1,86±0,02	
Ig A	1,48±0,06	1,36±0,16	2,48±0,04	1,38±0,16	
Примітка: ¹ Streptococcus pneumoniae №2; ² Streptococcus pyogenes № 3; ³ Enterococcus faecalis №1; ⁴ Staphylococcus aureus № 44					

Висновки. 1. Дослідження показали, що вакцина має високу імуногенну та антигенну активність, нешкідлива, високоефективна для профілактики стрептококових та стафілококових інфекцій. Щеплення тварин викликає стимуляцію імунітету до усіх видів мікроорганізмів, антигени яких входять до складу вакцини. Захист тварин дослідних груп від експериментальної інфекції, зумовленої різними сероварами збудників, коливався в межах від 93,4 % до 100%.

2. Застосування даного біопрепарату сприяє зростанню лізоциму, загального білку, рівня ЦіК, при цьому не спричиняє пригнічення імунної системи, про що свідчать показники рівня білків-імуносупресорів в сироватці крові та стабільний приріст лейкоцитів і відсутність інших нехарактерних змін показників сироватки крові та загально-клінічного стану тварин.

3. Введення тваринам експериментальних зразків вакцин в дозі 4 см³ активізує як клітинний, так і гуморальний імунітет, про що свідчить збільшення популяції лімфоцитів, імуноглобулінів класу G, A і M та титрів аглютинуючих антитіл.

Список використаних джерел:

1. Покровський В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Подеев. – М: ГОЭТАР, Медицина. – 1999. – 120с.

2. Прискока В.А. Паразитоценози як етіологічний фактор змішаних інфекцій / В.А. Прискока, П.П. Достоєвський, А.Т. Борзяк. - К.:, 1995.- 20 с.
3. Кузьменко О.М. Иммунопрофилактика и иммунотерапия стафилококковых инфекций бактериальными вакцинами / И.М. Грубер, Р.Г. Прияткин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. № 5. - С. 106-112.
4. ДСТУ 4483:2005. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначання бактеріальної і грибної контамінації
5. ДСТУ 4613:2006 Препарати біологічні для ветеринарної медицини. Метод визначення контамінації мікоплазми.
6. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін [та ін.]. - Біла Церква, 2004. – 608 с.
7. Методичні рекомендації для оцінки та контролю імунного статусу тварин / Р.П. Маслянюк, І.І. Олесюк, А.І. Падовський [та ін.]. – Львів, 2001. – 87 с.
8. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В.Г. Передерий, А.М. Земсков, Г. Бычкова, В.М. Земсков – Х.: УНДИИЭВ, 1995. – 210 с.

Гадзевич О.В. Совершенствования средств специфической профилактики стрептококкозов и стафилококкозов у животных

В статье представлены результаты исследования опытной серии вакцины против стрептококковых и стафилококковых инфекций животных по показателям качества, антигенной и иммуногенной активности. Исследования показали, что вакцина обладает высокой иммуногенной и антигенной активностью, безвредна, высокоэффективна для профилактики стрептококковых и стафилококковых инфекций. Введение животным вакцины активизировало как клеточный, так и гуморальный иммунитет, о чем свидетельствовало увеличение популяции лимфоцитов, иммуноглобулинов класса G, A и M и титров агглютинирующих антител. Применение вакцины способствовало увеличению лизоцима, общего белка, уровня ЦИК, при этом не вызывало угнетение иммунной системы у животных.

Ключевые слова: стрептококки, стафилококки, энтерококки, вакцина, иммуногенная активность, иммунитет.

Gadzevych O.V. Improvement of specific prevention streptococcal and staphylococcal disease in animals

The paper presents the results of a series of experimental vaccines against streptococcal and staphylococcal infections of animals in terms of quality, antigenic and immunogenic activity. Studies have shown that the vaccine is highly immunogenic and antigenic activity, harmless, highly effective for the prevention of streptococcal and staphylococcal infections. Introduction animal vaccine activated both cellular and humoral immunity, as evidenced by an increase in population of lymphocytes, immunoglobulin G, A and M and antibody titers. The use of the vaccine led to increased lysozyme, total protein level of immune complexesis, while not caused suppression of the immune system in animals.

Keywords: streptococci, staphylococci, enterococci, vaccine immunogenic activity, immunity.