

УДК 619: 616.98:579.869.2

А. Ф. ОБРАЖЕЙ кандидат ветеринарних наук, член кореспондент *НААН України*
І. І. МАТЯЖ

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ БЕШИХИ В ДОСЛІДАХ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ

У статті наведені матеріали досліджень з розробки і лабораторного випробування на мишах експериментальних віріантів поліштамних вакцин для профілактики бешихи свиней.

Ключові слова: бешиха свиней, протективна активність, вакцина

Імуногенність живих вакцин проти бешихи залежить від кількості бактерій бешихи в імунізуючій дозі, яка регламентується при випуску вакцин.

При проведенні досліджень встановлено, що в процесі зберігання рідкої та сухої живих вакцин проти бешихи свиней у флаконах значна частина бактерій бешихи поступово гине, тому після 3 і більше місяців зберігання імунізуюча доза, що визначається при виробництві вакцини в кількості мікробних клітин, буде змінюватись і імуногенність даної вакцини буде значно нижча [1].

Другим недоліком живих вакцин є те, що після введення в організм свиней живих бактерій бешихи відбувається бактеріоносійство та виділення бактерій в навколишнє середовище, де бактерії бешихи тривалий час зберігаються і навіть розмножуються в ґрунті, чим можна пояснити повторні спалахи в стаціонарно неблагополучних пунктах захворювання свиней на бешиху. Механізми відновлення вірулентності авірулентних штамів збудника бешихи свиней до цього часу лишаються невідомими.

Інактивовані вакцини, які не мають в своєму складі живих бактерій бешихи, не призводять до розповсюдження збудника і мають відносно стабільну імуногенність на протязі всього терміну зберігання.

За даними зарубіжних дослідників [2, 3], імуногенність інактивованих вакцин в значній мірі залежить від властивостей ад'юванта. При цьому, вакцини з ад'ювантами на основі мінеральних олій забезпечують вищу імуногенність в порівнянні з гідроксидом алюмінію та деякими іншими.

Матеріали і методи. В роботі використовували живильні середовища на основі первару Хотінгера (МПБХ).

Вакцинні культури готувались із штаму: М-2 ВК. Добові культури пересівали у флакони з 30 см³ МПБХ і періодично перемішуючи культивували при зазначених режимах протягом 24 годин.

По закінченню культивування вакцинну культуру після ретельного перемішування відібрали середній зразок культури об'ємом 10 см³ для досліджень на чистоту.

Інактивування бактерій проводили формаліном (Merck) з вмістом формальдегіду не менше 37%. Формалін додавали до культури в концентрації 0,1%. Перед додаванням його розводили стерильним фізіологічним розчином в співвідношенні 1:1. Формалізовану культуру витримували при кімнатній температурі протягом 3-х діб. Через кожні 1,5 – 2 години культуру ретельно перемішували.

По закінченню інактивування зразки вакцинної культури досліджували на стерильність в посівах в пробірки з МПБ, МПБХ, МППБ, середовищем Сабура, та на МПА і МПАХ в чашках Петрі на скошений МПАХ в пробірках, згідно ГОСТ 280 –85-89. Культивування посівів проводили при $(36,7 \pm 0,3)^{\circ}\text{C}$, а в середовищі Сабура при $(21 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом, відповідно, 7 і 14 діб. Після культивування визначали морфологію бактерій в мікроскопічних препаратах із культур, пофарбованих за Грамом

Для імунізації використовували лабораторних білих мишей вагою 16–18 г. Щеплення здійснювали шляхом підшкірного введення вакцин за допомогою шприца об'ємом 1 см^3 в дозі $0,2\text{ см}^3$ з вмістом 1 або 2 млрд бактерій бешихи до інактивування (згідно схеми досліду). Місце введення обробляли 70% етиловим спиртом.

Контрольне зараження мишей проводили шляхом підшкірного введення $0,2\text{ см}^3$ культури з вмістом 100 LD₅₀ бактерій бешихи (згідно схеми досліду). Заражаючу дозу контрольного штаму попередньо підтитрували на мишах.

Результати Із ліофілізованих культур вакцинного штаму М-2 ВК, культуральні і морфологічні властивості якого було підтверджено дослідженнями, отримували бульйонну культуру для виготовлення інактивованих емульсин-вакцин.

Добову культуру бактерій бешихи зазначеного штаму, вирощеного в МПБХ з вмістом 8-20 млрд мікробних клітин в 1 см^3 піддавали інактивуванню формаліном. Інактивовані культури досліджували на ростові та морфологічні властивості в посівах в МПБ, МПБХ, середовища –тіюгліколеве та Сабура, на скошений МПАХ в пробірках. Після культивування посівів при $(36,7 \pm 0,3)^{\circ}\text{C}$, а посівів в середовищі Сабура при $(21 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ протягом, відповідно, 7 і 14 діб росту забруднення їх бактеріями або грибами не виявлено.

При мікроскопічному дослідженні препаратів із культур інактивованих бактерій бешихи всіх вказаних штамів, пофарбованих за Грамом спостерігались тонкі, прямі грампозитивні палички, розташовані поодинокі та парно, характерні для бактерій бешихи. Інволюційних форм та ланцюжків бактерій не виявлено.

При дослідженні масляного ад'юванту Montanide ISA 25 (Seppic, France), встановлено, що після додавання до інактивованої бульйонної культури 25% данного ад'юванту і перемішування протягом 2-3 хвилин утворюється стійка емульсія білого кольору, яка при стоянні більше 12 місяців не розшаровується.

Після підшкірного та внутрішньом'язового введення емульсин-вакцини з ад'ювантом Montanide ISA 25 мишам і тваринам в дозах від $0,2$ до 2 см^3 в місці введення утворюється незначна припухлість (обумовлюється створенням депо антигену та місцевою запальною реакцією), яка поступово протягом 10-14 діб (термін спостереження) повністю розсмоктується.

Слід зазначити, що у більшості тварин, щеплених інактивованою емульсин-вакциною з ад'ювантом маркол + ланолін на місці введення утворюються стерильні абсцеси, які не розсмоктовуються.

Середня кількість клітин бактерій бешихи в 1 см^3 вакцинної культури різних штамів коливалась в межах від 6765 до 10340 млн..

До нерозбавленої вакцинної культури в об'ємі 500 см^3 і розведеної вакцинної культури в об'ємі 400 см^3 додавали 0,3% формаліну та інактивували. В

висівах інактивованої вакцинної культури на живильні середовища росту бактерій і грибів не було, а в мікроскопічних препаратах спостерігались лише тонкі, прямі палички, розташовані поодинокі або парно, характерні для збудника бешихи.

Після доведення рН до 7,5 – 7,6 обидва варіанти культури в стерильних умовах розфасували по 50 см³ в стерильні флакони об'ємом 100 см³, укупорювали вакуумними пробками, закатували алюмінієвими ковпачкам, етикетували і поміщали в холодильник для зберігання при 4-8°C до використання.

Для одержання різних варіантів інактивованої емульсин-вакцини були виготовлені наступні ад'юванти :

- 83 % вазелінової олії + 17% ланоліну;
- 70 % марколу + 30 % ланоліну;
- 50 % ад'юванта Montanide ISA 25;

Із одержаної інактивованої вакцинної культури з вмістом 22600 млн бактерій бешихи в 1 см³ в стерильних умовах виготовили три варіанти інактивованої концентрованої емульсин-вакцини з вмістом 11300 млн бактерій бешихи в 1 см³ за рецептами:

I варіант – 50 см³ вакцинної культури + 50 см³ ад'юванта (суміші 83 відсотка вазелінової олії + 17 відсотків ланоліну) - одержали 100 см³ емульсин - вакцини;

II варіант – 50 см³ вакцинної культури + 40 см³ ад'юванта (суміші 70 відсотків марколу + 30 відсотків ланоліну) + 10 см³ МПБХ - одержали 100 см³ емульсин - вакцини;

III варіант – 50 см³ вакцинної культури + 25 см³ ад'юванта Montanide ISA-25. + 25 см³ стерильного МПБХ - одержали 100 см³ емульсин - вакцини.

Для визначення реактогенності, нешкідливості і імуногенності експериментальної інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней різних варіантів було підібрано 3 дослідних і 2 контрольних груп мишей живою масою 16 – 18 г за схемою:

- 1 дослідна група – одноразове щеплення інактивованою емульсин-вакциною з 25 % ад'юванта Montanide ISA-25 з вмістом в імунізуючій дозі 0,2 см³ – 2 260 млн бактерій бешихи (до інактивування)

- 2 дослідна група – одноразове щеплення інактивованою емульсин-вакциною з 50 % ад'юванта (суміші 83 відсотка вазелінової олії + 17 відсотків ланоліну) з вмістом в імунізуючій дозі 0,2 см³ – 2 260 млн бактерій бешихи (до інактивування)

- 3 дослідна група – одноразове щеплення інактивованою емульсин-вакциною з 40 % ад'юванта (суміші 70 відсотків марколу + 30 відсотків ланоліну) з вмістом в імунізуючій дозі 0,2 см³ – 2 260 млн бактерій бешихи (до інактивування)

- 4 контрольна група – одноразове щеплення стерильним МПБХ з ад'ювантом (вазелінова олія + ланолін) в дозі 0,2 см³;

- 5 контрольна група – інтактний контроль.

Через 13 днів після одноразової вакцинації було проведено зараження контрольним штамом 149 підшкірно в дозі 0,2 см³ з вмістом 100 LD₅₀ – 500 тисяч бактерій бешихи. Спостереження за зараженими мишами вели 10 днів.

Найвищий захист від загибелі мишей – 73,3-80% забезпечила інактивована емульсин - вакцина з ад'ювантом – Montanide ISA-25 з вмістом в імунізуючій дозі

0,2 см³ – 2260 млн бактерій бешихи (до інактивування) ; 66,7 % захисту забезпечила інактивована емульсин - вакцина з ад'ювантом – вазелінова олія + ланолін з вмістом в імунізуючій дозі 0,2 см³ – 2260 млн бактерій бешихи.

Висновки.

1. Дослідні зразки інактивованих емульсин-вакцин проти бешихи свиней з ад'ювантами Montanide ISA 25, суміші вазелінової олії з ланоліном при одноразовому та двохразовому щепленні мишей підшкірно в дозі 0,2 см³ з вмістом один і два мільярди бактерій бешихи були нешкідливі і неореактогенні.

3. Захист від загибелі мишей, одноразово щеплених підшкірно емульсин-вакциною в дозі 0,2 см³ з вмістом один і два мільярди бактерій бешихи з різними ад'ювантами складав: з Montanide ISA 25, відповідно, - 73,3 – 80 %; суміші вазелінової олії з ланоліном – 64 - 66,7 %.

Перспектива подальших досліджень. Результати будуть використані для удосконалення існуючих засобів специфічної профілактики бешихи свиней.

1. Горбань М. І. Специфічна профілактика інфекційних хвороб тварин. – Київ, 1973. – С. 84 –93.

2. Shimoji, Y. Pathogenicity of Erysipelothrix rhusiopathiae: virulence factors and protective immunity. //Microbes Infect. – 2000. – № 2. – P. 965–972.

3. Sato H., Miyazaki H., Sakakura H. Isolation and purification of a protective protein antigen of Er. Rhusiopathiae.// Zentralbil. Veterinarmed. - 1999. - №2. - P. 47 - 55

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ В ОПЫТАХ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ/ Образжей А. Ф., Матяж И. И.

В статье приведены материалы исследований по разработке и лабораторным испытаниям на мышах экспериментальных вариантов вакцин для профилактики рожи свиней.

Ключевые слова: рожа свиней, протективная активность, вакцина

STUDYING OF PROTECTIVE EFFECIASY OF THE EXPERIMENTAL INACTIVATED VACCINES AGAINST ERYSIPELAS IN EXPERIMENTS, CURRIED ON LABORATORY ANIMALS/Obrazhey A. F., Matiaj I. I.

Investigations on development and testing experimental polistrain vaccines against erysipelas on laboratory conditions are shown in the title.

Key words: swine erysipelas, protective activity, vaccine

Рецензент – кандидат ветеринарних наук, О. А. Тарасов