

УДК 619:616.986.7

**В. О. ВОЛИНЕЦЬ<sup>1</sup>**, аспірант

*Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи*

## **ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІВАЛЕНТНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЛЕПТОСПИРОЗУ КОНЕЙ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ**

*Представлено узагальнені результати досліджень трьох експериментальних серій полівалентної протилептоспірозої вакцини для коней на лабораторних тваринах на такі показники: рН, стерильність, залишкову кількість інактиванта, повноту інактивації, нешкідливість та антигенні властивості.*

*Ключові слова: коні, лептоспіроз, профілактика, вакцина.*

Питанню профілактики лептоспірозів у тварин приділяється багато уваги, існує велика кількість рекомендацій щодо діагностики цього захворювання, зоогігієнічних і санітарних норм у тваринництві та вакцинації, але лептоспіроз на території України залишається досить розповсюдженим.

За даними Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи з 2005 по 2009 рік інфікованість коней лептоспірами склала 14,51%, при цьому найчастіше інфікування відбувалося лептоспірами серогруп *Icterohaemorrhagiae* (15,3%), *Australis* (5,7%), *Canicola* (5,5%) та *Grippotyphosa* (4,4%) [1]. За результатами досліджень лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України з 1999 по 2006 роки серогрупа *Australis* в етіології лептоспірозу коней складає приблизно 40,5%, а за період з 2007 по 2012 роки відсоток інфікування коней цією серогрупою лептоспір зріс до 58% [2].

Однією з головних причин такої ситуації в Україні є недостатня кількість профілактичних препаратів проти лептоспірозу, що виробляються в Україні і те, що переважна їх більшість імпортується з Росії та інших країн, де при їх виготовленні не враховується епізоотична ситуація щодо лептоспірозу на території нашої країни.

Дослідниками різних країн встановлено, що для профілактики лептоспірозу необхідно виготовлення вакцинних препаратів з врахуванням етіологічної структури і епізоотології захворювання в певній природно-географічній зоні і у певного виду тварин [1,3,4].

Науковими співробітниками лабораторії лептоспірозу Інституту ветеринарної медицини було розроблено та виготовлено три експериментальних серії полівалентного вакцинного препарату для

---

<sup>1</sup> Науковий керівник – кандидат ветеринарних наук Уховський В.В.

профілактики лептоспірозу коней з врахуванням етіологічної структури лептоспірозу коней на території України за останні роки з еталонних штамів чотирьох серогруп лептоспір (табл.1).

**Мета роботи.** Перевірити три послідовно виготовлені, експериментальні серії полівалентної вакцини на такі показники: рН, стерильність, залишкову кількість інактиванта, повноту інактивації, нешкідливість та імуногенну активність.

**Матеріали і методи дослідження.** Було виготовлено за однаковою схемою три послідовні серії полівалентної протилептоспірознаї вакцини з використанням антигенів штамів чотирьох серогруп лептоспір: *Grippotyphosa*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Australis* (табл.1).

Таблиця 1.

**Перелік штамів лептоспір які використовували при виготовленні вакцинного препарату**

№п/п	Серогрупа	Серовар	Штам
1	<i>Grippotyphosa</i>	grippotyphosa	ВГНКИ-1
2	<i>Canicola</i>	canicola	ВГНКИ-3
3	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	icterohaemorrhagiae	ВГНКИ-2
4	<i>Australis</i>	bratislava	Yež bratislava

Штами лептоспір культивували на середовищі Кортгофа з додаванням 10 %-ів овечої сироватки крові за температури 27-28°C без доступу світла. Для виготовлення вакцинного препарату використовували 14 денну культуру з накопиченням 70-80 мільйонів лептоспір в одному см<sup>3</sup>, не менше 60 лептоспір у темному полі мікроскопа при збільшені 20×15. Отриману бактеріальну масу інактивували розчином фенолу в кількості 0,5% від загального об'єму взятої в роботу лептоспірознаї культури. Через 12 годин проводили візуальний контроль інактивації шляхом мікроскопії інактивованої культури. Концентрування проводили шляхом додавання розчину поліетиленгліколю в кількості 10-12 % від загальної кількості лептоспірознаго антигену. Після осадження бактеріальної маси 50 % надосадової рідини зливали і інактивували її шляхом автоклавування після чого утилізували.

Отриману вакцину перевіряли на стерильність за ДСТУ 4483:2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначання бактеріальної і грибкової контамінації».

Вимірювання концентрації водневих іонів проводились за допомогою рН-метра згідно з інструкцією, що додається до нього. РН вакцини повинен бути в межах від 7,2 до 7,4.

Визначення залишкової кількості інактиватора проводили згідно з МУК 4.1/ 4.2.588. Результати визначення не повинні перевищувати для фенолу – 0,5 % або формаліну – 0,25 %.

Для визначення ступеню інактивації досліджувані серії вакцин висівали на середовище Кортгофа з додаванням 10% кролячої сироватки крові. Посів проводився на три пробірки з живильним середовищем для кожної серії

вакцинного препарату. Через 14 діб проводили контроль ступеню інактивації шляхом мікроскопії у темному полі мікроскопа при збільшенні 20×15. Відсутність живих лептоспир при трикратному пасажуванні свідчить про повну інактивацію вакцинного препарату.

Нешкідливість досліджуваних серій вакцин визначали на білих мишах вагою 18-20 г., по 10 мишей для перевірки кожної експериментальної серії. Вакцинний препарат вводили підшкірно в дозі 0,3 см<sup>3</sup> і вели спостереження за піддослідними тваринами протягом 10 діб. Вакцину вважали нешкідливою, якщо за час спостереження всі тварини залишалися живими.

Визначення антигенних властивостей вакцин проводили на 15 кролях вагою 3,0-3,5 кг. Для проведення досліду тварин розділили на 3 групи по 5 тварин на кожну експериментальну серію вакцини. Перед початком імунізації від всіх трьох груп дослідних кролів відбирали кров, потім тваринам вводили внутрішньовенно середню пробу кожної експериментальної серії вакцини по 0,75 см<sup>3</sup>. На 7, 14, 21, 28 добу після вакцинації проводили відбір крові від кролів для дослідження.

Для оцінки імуногенності створених серій вакцин досліджували сироватку крові кролів в реакції мікроаглютинації (РМА), яку проводили починаючи з розведення 1:10 до 1:1280 (кратність 2). Для проведення РМА використовували антигени лептоспир, що входять до складу вакцинного препарату.

**Результати власних досліджень.** В результаті проведеної роботи ми отримали три зразки вакцинного препарату до складу якого входять антигени штамів лептоспир чотирьох серогруп (табл.1.).

Таблиця 2

**Результати визначення біологічних та фізичних властивостей експериментальних серій вакцин**

Показники	Серія №1	Серія №2	Серія №3
pH	7,25	7,32	7,23
Стерильність	Стерильна	Стерильна	Стерильна
Повнота інактивації	Відсутність живих лептоспир при трикратному пасажуванні на живильному серидовищі	Відсутність живих лептоспир при трикратному пасажуванні на живильному серидовищі	Відсутність живих лептоспир при трикратному пасажуванні на живильному серидовищі
Нешкідливість	Нешкідлива	Нешкідлива	Нешкідлива
Залишкова кількість інактиватора	0,41%	0,46%	0,43%

На вигляд всі три експериментальні зразки вакцин були однакові: мали сірувато-білий осад і прозору надосадову рідину. При струшуванні у всіх дослідних зразках вакцин осад легко розбивався до однорідної гомогенної суспензії.

Спочатку нами було проведено перевірку вакцин на pH, стерильність, залишкову кількість інактиватора, повноту інактивації, нешкідливість.

Виготовлені експериментальні серії вакцин відповідали установленим вимогам і виявились безпечними для введення тваринам. (табл. 2).

Результати визначення антигенної активності вакцинних препаратів на лабораторних тваринах подані в таблиці (табл 3.).

Таблиця 3

**Динаміка титрів антитіл при застосуванні на лабораторних тваринах трьох експериментальних серій протилептоспірної полівалентної вакцини для коней,  $M \pm m$ ,  $n = 5$**

Добова тривалість періодів експерименту	Титри антитіл до серогруп лептоспир в РМА*											
	Серія вакцини №1				Серія вакцини №2				Серія вакцини №3			
	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Canicola</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Australis</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Canicola</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Australis</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Canicola</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Australis</i>
до імунізації	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 доба після імунізації	1:128 ± 32,10	1:168 ± 50,83	1:16 ± 10,70	1:152 ± 30,77	1:112 ± 16,05	1:136 ± 34,78	1:24 ± 12,04	1:104 ± 18,73	1:128 ± 32,10	1:136 ± 34,78	1:32 ± 16,05	1:70 ± 14,86
14 доба після імунізації	1:340 ± 86,94	1:240 ± 26,75	1:220 ± 30,10	1:250 ± 50,16	1:340 ± 86,94	1:180 ± 13,38	1:320 ± 93,63	1:250 ± 50,16	1:340 ± 86,94	1:220 ± 30,09	1:260 ± 48,82	1:275 ± 90,57
21 доба після імунізації	1:520 ± 80,58	1:400 ± 66,88	1:310 ± 96,98	1:260 ± 46,82	1:480 ± 107,01	1:360 ± 26,75	1:270 ± 88,62	1:200 ± 33,44	1:440 ± 120,38	1:320 ± 40,13	1:290 ± 03,6	1:216 ± 51,09
28 доба після імунізації	1:60 ± 23,41	1:40 ± 13,38	1:50 ± 25,08	1:100 ± 51,6	1:90 ± 36,78	1:60 ± 13,38	1:90 ± 36,78	1:130 ± 56,85	1:70 ± 26,75	1:50 ± 3,36	1:90 ± 36,78	1:150 ± 69,67

\*РМА враховували з оцінкою не менше чим на два хреста.

Перед початком імунізації сироватку крові всіх піддослідних тварин перевіряли в РМА на наявність протилептоспірних антитіл до лептоспир серогруп *Grippotyphosa*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* та *Australis*, які входять до складу вакцинних препаратів. В результаті проведених досліджень у кролів до вакцинації не відмічали наявності титрів антитіл до лептоспир даних серогруп.

На 7 добу після імунізації в сироватці крові піддослідних тварин відмічали в середньому відносно низькі титри антитіл до антигену лептоспир серогрупи *Icterohaemorrhagiae* в середньому від 1:16 у тварин вакцинованих першою серією експериментального вакцинного препарату до 1:32 третьою серією. До антигенів лептоспир інших серогруп вже на 7 добу досліджень відмічали досить значний рівень титрів антитіл, так до лептоспир серогрупи *Canicola* - від 1:136 в середньому для дослідних вакцин серій №2 та №3 до 1:168 у серії №1. До антигенів лептоспир серогрупи *Grippotyphosa*

спостерігали титри від 1: 112 у вакцинного препарату серії №2 до 1:128 у серій №1 та №3, до лептоспир серогрупи Australis - від 1:70 у серії №3 до 1:152 у серії №2 (табл.3).

Максимальне накопичення антитіл в сироватці крові імунізованих тварин відмічали в РМА на 14-21 добу досліджень.

Антитіла до лептоспир серогрупи Grippotyphosa відмічали в особливо високих титрах на 21 добу у тварин вакцинованих першою серією експериментального вакцинного препарату - в середньому 1:520. Дві інші серії показали дещо нижчий результат: №2 - 1: 480 і №3 - 1: 440.

Рівень титрів антитіл до лептоспир серогрупи Canicola на 14 добу коливався в межах від 1:180 у вакцинного препарату серії №2 та до 1:240- у серії №1. На 21 добу спостерігали підвищення титрів антитіл до 1:400 у вакцинного препарату серії №1, до 1:360 – у серії №2 і до 1:320– у серії № 3.

Дещо нижчий рівень антитіл визначали до лептоспир серогруп Icterohaemorrhagiae, Australis. Зростання титрів аглютинації на 21 добу експерименту для лептоспир серогрупи Icterohaemorrhagiae спостерігали до 1:310 у вакцинного препарату серії №1, 1:270 - у серії №2 і 1:290 - у серії №3.

Лептоспіри серогрупи Australis аглютинували з сироваткою крові тварин імунізованих вакцинними препаратами серій №2 і №3 на 14 добу досліду в більших титрах - 1:250 і 1:275 відповідно ніж на 21 добу експерименту, коли ми спостерігали незначне зниження титрів антитіл до 1:200 і 1:216 відповідно. Перша серія вакцинного препарату показала рівень антитілоутворення майже такий самий, що і на 14 добу експерименту - 1:250 та 1:260 відповідно.

На 28 добу титри антитіл в сироватці крові імунізованих тварин значно знизились. Так до антигену серогрупи Icterohaemorrhagiae спостерігали титри 1:50 в середньому у кролів вакцинованих препаратом першої серії та 1:90 другої і третьої серії відповідно, до антигену серогрупи Canicola 1:40, 1:60, 1:90 відповідно, до антигену серогрупи Grippotyphosa 1:60, 1:90, 1:70 відповідно. Найбільші аглютинуючі титри відмічали до лептоспир серогрупи Australis, що становили для першої серії вакцинного препарату 1:100, для другої - 1:130, для третьої - 1:150.

Таким чином при імунізації лабораторних тварин дослідними серіями вакцини отримано достатньо високу антигенну активність всіх трьох експериментальних зразків вакцинних препаратів.

### **Висновки:**

1. У результаті проведених нами досліджень встановлено, що всі три зразки експериментального вакцинного препарату відповідали установленим вимогам та були безпечними для введення тваринам.

2. Отримані дані свідчать, що всі три експериментальні зразки вакцини при одноразовій імунізації лабораторних тварин (кролів) забезпечують високий рівень антитілоутворення до антигенів лептоспир серогрупи яких включені до складу імунізуючого препарату.

**Перспективи подальших досліджень.** На основі результатів проведених досліджень, які свідчать про отримання безпечного і

імуноактивного профілактичного препарату, рекомендовано провести його випробування на конях.

### **Список використаної літератури**

1. *Меженський А. О.* Ретроспективний епізоотологічний аналіз поширення лептоспірозу коней в Україні./ А. О. Меженський //Ветеринарна медицина України. – № 8.– 2010.– С.13 - 16.
2. *Волинець В. О.* Епізоотичне значення лептоспір серогрупи Australis серовару bratislava в етіології лептоспірозу коней в Україні/ В. О.Волинець // Науковий вісник ЛНАВМ ім.Гжицького. – Том 9. – №29(33). – Ч.1. –2007. – С.25-29.
3. *Піотрович В. А. L. interrogans* серовар bratislava- серологічний аналіз циркуляції збудника на території України./ В. А.Піотрович, О-р О. Кучерявенко, О-й О. Кучерявенко //Ветеринарна медицина України. – № 8.– 2010.– С.13 - 16.
4. *Малахов Ю. А.* Лептоспіроз животных./ Ю. А.Малахов, А. Н.Панин, Г. Л.Соболева. – Ярославль: Диа-прес, 2000. –548 с.

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА ЛОШАДЕЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ/ В. А. Волинец**

*Представлены обобщенные результаты исследований трех экспериментальных серий поливалентной противолептоспирозной вакцины для лошадей на лабораторных животных на такие показатели: рН, стерильность, остаточное количество инактиванта, полноту инактивации, безвредность и антигенные свойства.*

*Ключевые слова: кони, лептоспироз, профилактика, вакцина.*

### **IDENTIFICATION OF THE ANTIGENIC ACTIVITY OF THE POLYVALENT VACCINE AGAINST LEPTOSPIROSIS ON LABORATORY ANIMALS / V.O. Volinets**

*The results of the investigation of three experimental batches of polyvalent vaccine against leptospirosis of horse on laboratory animals with some indexes: pH, sterility, the quantity of residual inactivants, completeness of inactivation, safety and antigenic properties of vaccine were presented in the title.*

*Key words: horse, leptospirosis, prophylaxis, vaccine*

**Рецензент** – кандидат ветеринарних наук **О. А. Тарасов**  
Рукопис надійшов 30. 07. 2013р

**УДК 619:616.98**

**О. С. ГАЙДЕЙ**, кандидат ветеринарних наук

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ*

**А. В. ЄВТУШЕНКО**, кандидат ветеринарних наук

*Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН, м. Харків*

**О. М. ДЕРЯБІН**

*Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ*

**О. В. КРУШЕЛЬНИЦЬКА**, пошукач

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З.Гжицького, м. Львів*

### **ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕФЕРЕНТНОГО ШТАМУ DN4p101 ТА ІЗОЛЯТУ PL-1 ВІРУСУ ГЕМОРАГІЧНОЇ СЕПТИЦЕМІЇ ФОРЕЛІ (ВГС)**

*Проведені дослідження з вивчення біологічних властивостей референтного штаму DN4p101 та ізоляту PL-1 вірусної геморагічної септицемії форелі (ВГС) та відтворення клінічних ознак захворювання.*

*Ключові слова: форель, вірусна геморагічна септицемія, біопроба, референтний штам, ізолят.*

**Вірусна геморагічна септицемія** – гостре висококонтагіозне захворювання прісноводних та морських видів риб, що спричиняє вірус геморагічної септицемії — VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) [1]. Вірусна геморагічна септицемія характеризується надзвичайно широкими межами поширення у світі та завдає значних економічних збитків рибним господарствам багатьох країн [2-5]. Наразі нараховують близько 50 прісноводних та морських видів риб, чутливих до даного захворювання.

Вірусна геморагічна септицемія повсюдно поширена на території континентальної Європи (особливо в Данії) [4]. У 2007 році згідно з офіційними даними МЄБ захворювання вперше зареєстровано у Фінляндії, Швеції, Норвегії, хоча раніше ці території вважались благополучними щодо ВГС [5]. Поширення збудника даного захворювання до берегів Північної Америки спричинило значну смертність великого ромбу в аквакультурах, а також тихоокеанського оселедця та сардин у прибережних водах Тихого океану [2]. Одним з останніх спалахів захворювання була епізоотія в районі Великих Озер США та Канади [3]. Крім того, збудника було виявлено у несправжнього палтуса або японської камбали (*Paralichthys olivaceus*) в Японії [1, 4]. Припускають можливість поширення інфекції до берегів Австралії, де захворюваність може сягнути величезних масштабів.