

УДК: 619 : 084 / 615.371

РИЖЕНКО В.П., д-р вет. наук, проф., член-кореспондент НААН
НИЧИК С.А., д-р вет. наук,
РИЖЕНКО Г.Ф., ГОРБАТЮК О.І., канд. вет. наук, доценти
АНДРІЯЩУК В.О., канд. вет. наук, ст. наук. співробітник
ЖОВНІР О.М., ТЮТЮН С.М., РУДОЙ О.В., КАМЕНЧУК П.П.
Інститут ветеринарної медицини НААН

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ ДОСЛІДНОГО ЗРАЗКА МУЛЬТИКОМПОНЕНТНОЇ ВАКЦИНИ «МУЛЬТИБОВІСАН» ТА ЇЇ ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ

Представлені матеріали з підбору штамів патогенних збудників для конструювання експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, анаеробної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, зляккісного набряку, колібактеріозу, сальмонельозу, пастерельозу великої та дрібної рогатої худоби. Викладено результати лабораторного контролю дослідного зразка виготовленого препарату, за якими вакцинний препарат відповідає чинним вимогам до ВІЗ.

***Ключові слова:** штами, інактивація, концентрація мікробних клітин, антигенна активність, імуногенна ефективність.*

Вступ. Велику небезпеку для тваринництва створюють асоційовані інфекції, які у даний час складають більшу частину серед хвороб інфекційної патології. За порівняння із впливом монокультур збудників, викликають більш токсичну, некротичну та руйнівну дію в організмі тварин [1–3].

Патогенетичний синергізм, який проявляється у бактеріальних асоціаціях різних видів патогенів та їх негативний вплив на організм тварин, обумовлюють необхідність створення асоційованих вакцин, здатних забезпечувати несприйнятливості організму одночасно до кількох захворювань [4–6].

Метою роботи було провести підбір штамів патогенних збудників для конструювання мультикомпонентного вакцинного препарату та лабораторний контроль дослідного зразка вакцини «Мультибовісан» на повноту інактивації культур патогенів, що входять до складу вакцинного препарату, їх нетоксичність для білих мишей, визначення рівня рН, залишкової кількості вільного формальдегіду, відсутності бактеріальної та грибової контамінації, ступеню антигенної активності та імуногенної ефективності.

Матеріали і методи досліджень. Експериментальні дослідження були проведені в умовах лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН. Із музею

штамів мікроорганізмів лабораторії використано 9 штамів патогенних збудників, а саме: *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С, *C. novyi*, *C. septicum*, *S. enteritidis*, *P. multocida*, *S. aureus*, *Str. zooepidemicus*, *E. coli*.

Культивовані та інактивовані монокультури збудників, що входять до складу мультикомпонентної вакцини, задля подальшого конструювання вакцинного препарату, були перевірені на повноту інактивації і нетоксичність для білих мишей; визначена концентрація кожного із антигенів у 1 см³ препарату та загальна концентрація мікробних клітин у вакцинному препараті із урахуванням пропорцій кожного із антигенів у складі вакцини. За проведення досліджень були застосовані бактеріологічний, біологічний, біохімічний методи. Для експериментів використані 12 гол. кролів, 260 гол. інбредних білих мишей та 27 гол. морських свинок.

Результати досліджень та їх обговорення. Для конструювання мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» проти найпоширеніших бактеріозів великої та дрібної рогатої худоби нами були підібрані 9 штамів патогенних збудників із музею штамів мікроорганізмів лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН, які включали представників 5 аеробних і 4 анаеробних збудників: *Clostridium perfringens* тип А, *Clostridium perfringens* тип С, *Clostridium novyi* штам «Запорізький – 96», *Clostridium septicum* штам «Черкаський – 97», *Salmonella enteritidis* штам «Запорізький», *Pasteurella multocida* штам «Полонський», *Staphylococcus aureus* штам «Шахтарський», *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli* штам «Бердянський – 375». Усі дослідні культури були перевірені на чистоту росту та відповідність основним типовим властивостям, що підтверджено результатами досліджень морфологічних, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей, тому були відібрані для конструювання мультикомпонентного вакцинного препарату.

Крім того, за проведення культуральних та біологічних досліджень підтверджена повна інактивація монокультур *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С, *C. novyi*, *C. septicum*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *Str. zooepidemicus*, *P. multocida*, які входять до складу експериментального зразка вакцини, встановлена відсутність їх токсичності та нешкідливості для інбредних білих мишей і морських свинок, оскільки впродовж терміну експерименту не відмічали загибелі тварин та спостерігали у них приріст живої маси.

Концентрація мікробних клітин у інактивованих монокультурах показана у таблиці 1.

З урахуванням концентрації кожного із антигенів були підібрані їх оптимальні співвідношення та сконструйований експериментальний зразок інактивованої мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, анаеробної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, злоякісного набряку, колибактеріозу, сальмонельозу, пастерельозу великої та дрібної рогатої худоби. До складу експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» увійшли різні пропорції інактивованих монокультур, а саме: 40,0 %

анаеробних монокультур; 20,0 % культури *E. coli*, по 10,0 % культур кокових, сальмонел та *P. multocida*. Таким чином, до складу дослідного зразка вакцинного препарату увійшли 9 інактивованих монокультур збудників із різною концентрацією і у різних пропорційних співвідношеннях, тому загальна концентрація мікробних клітин у вакцині складала $2,41 \times 10^9$ м.кл./см³.

Таблиця 1

Концентрація мікробних клітин в інактивованих монокультурах збудників, що входять до складу мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан»

№ п/п	Види монокультур аеробних збудників	Концентрація, м.к./см ³	№ п/п	Види монокультур анаеробних збудників	Концентрація, м.к./см ³
1.	<i>E. coli</i>	1,20 x 10 ⁹	6.	<i>C. perfringens</i> тип А	4,0 x 10 ⁹
2.	<i>S. enteritidis</i>	1,82 x 10 ⁹	7.	<i>C. perfringens</i> тип С	3,45 x 10 ⁹
3.	<i>S. aureus</i>	2,14 x 10 ⁹	8.	<i>C. novyi</i>	1,4 x 10 ⁹
4.	<i>Str. zooepidemicus</i>	1,43 x 10 ⁹	9.	<i>C. septicum</i>	3,3 x 10 ⁹
5.	<i>P. multocida</i>	1,83 x 10 ⁹			
10.	Виготовлений експериментальний зразок мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан»				2,41 x 10 ⁹

Зважаючи на пропорцію кожного антигену його концентрація у 1,0 см³ експериментального зразка вакцини складала: *C. perfringens* тип А – $0,44 \times 10^9$ м.к.; *C. perfringens* тип С – $0,38 \times 10^9$ м.к.; *C. novyi* – $0,15 \times 10^9$ м.к.; *C. septicum* – $0,36 \times 10^9$ м.к.; *E. coli* – $0,30 \times 10^9$ м.к.; *S. enteritidis* – $0,20 \times 10^9$ м.к.; *P. multocida* – $0,20 \times 10^9$ м.к.; *S. aureus* – $0,23 \times 10^9$ м.к.; *Str. zooepidemicus* – $0,15 \times 10^9$ м.к.

У складі дослідного зразка вакцини у відповідних пропорціях входили стерильний розчин агар-агару, імуномодулюючі та стабілізуючі засоби за прописом В. П. Риженка.

За результатами лабораторного контролю дослідного зразка мультикомпонентної вакцини визначена концентрація водневих іонів, яка знаходилась на рівні рН – 7,2; залишок вільного формальдегіду складав 0,010 %, що відповідає чинним вимогам до ВІЗ.

За результатами досліджень на бактеріальну та грибну контамінацію встановлена відсутність росту сторонньої мікрофлори та мікроскопічних грибів за десятидобового культивування зразків вакцини для аеробних мікроорганізмів на живильних середовищах МПА, МПБ, анаеробних – середовищі Кітта-Тароцці, грибів – середовищі Сабуро та універсальному середовищі – тіогліколевому упродовж 14 діб, що відповідає вимогам чинного ДСТУ 4483:2005 щодо відсутності контамінації вакцинного препарату живими мікроорганізмами та мікроскопічними грибами.

За лабораторного контролю дослідного зразка вакцини на антигенну активність, на початку експерименту до щеплення кролів проведено визначення рівня титрів специфічних антитіл до антигенів *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С та *E. coli*, які показали присутність специфічних аглютининів у недіагностичних титрах, зокрема титри специфічних антитіл до *C. perfringens* тип А на рівні $0,33 \log_2$ та *E. coli* – $0,67 \log_2$ (табл. 2). Дослідження експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» через 7 діб після дворазових щеплень засвідчили вірогідне зростання титрів специфічних аглютининів до *C. perfringens* тип А – у 8,0; до *C. perfringens* тип С – у 3,0; до *E. coli* – у 5,5 разів ($p < 0,001$).

Таблиця 2

**Результати обліку РА сироваток крові у дворазово щеплених кролів,
M ± m, log₂, n = 3**

Вид антигену	Середні титри специфічних аглютининів:				
	Початкові дані	Після дворазового щеплення кролів, через діб:			
		7	14	Показники зростання рівня титрів специфічних аглютининів, у рази	
				7	14
<i>C. perfringens</i> тип А	$0,33 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	8,0	13,0
<i>C. perfringens</i> тип С	–	$3,0 \pm 0,0$	$5,0 \pm 0,7$	3,0	5,0
<i>E. coli</i>	$0,67 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,3$	5,5	7,0

Через 14 діб після повторного щеплення рівень специфічних аглютининів до *C. perfringens* тип А вірогідно зростав у 13,0; до *C. perfringens* тип С – у 5, та до *E. coli* – у 7,0 разів, що свідчило про антигенну активність дослідної вакцини та відповідність чинним вимогам до вакцинних препаратів.

Контроль імуногенної ефективності (активності) експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» проведений на дворазово щеплених дослідних групах інбредних білих мишах та не щеплених контрольних групах, яким були інокульовані завчасно підтитровані мінімальні летальні дози (DLM) добових культур патогенів (табл. 3), які входять до складу вакцинного препарату. Зокрема, DLM культури *Cl. perfringens* тип А штам «Запорізький» складала $1,0 \times 10^7$ м.к./см³; *Cl. perfringens* тип С штам «Славутський – 97» – $3,0 \times 10^7$ м.к./см³; культури *E. coli* штам «Бердянський – 375» – $1,0 \times 10^8$ м.к./см³.

Таблиця 3

Результати лабораторного контролю імуногенної ефективності мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан», $M \pm m, \%$, $n_{1-12} = 10$

Імунний статус	Вид тварин	Жива маса, г	Кіл-ть, гол	Доза, см ³	Метод введення	Щеплення дослідних білих мишей та поствакцинальний період	Вид культури та штам	Доза, см ³	Концентрація в мікробних клітин (DLM)	Метод введення	Дата обліку результату	Результати інфікування		Імуногенна ефективність препарату, %
												всього	загибло	
дослідна група (щеплені)	Білі миші	18-20	10	0,5	підшкірно	Проведено перше щеплення дослідної групи мишей; проведено повторне щеплення дослідної групи мишей; поствакцинальний період складає 16 діб до зараження відповідними культурами патогенів у концентрації DLM	<i>Cl. perfringens</i> тип А	0,5	1,0 x 10 ⁷	підшкірно	Через 10 діб після зараження патогенними культурами збудників	9	1	збереженість щеплених мишей складала 90,0 %
	Білі миші	18-20	10				<i>Cl. perfringens</i> тип С		3,0 x 10 ⁷			8	2	збереженість щеплених мишей складала 80,0 %
	Білі миші	18-20	10				<i>E. coli</i> штам «Бердянський – 375»		1,0 x 10 ⁸			9	1	збереженість щеплених мишей складала 90,0 %
	Всього імунізовано		30									26	4	Середня збереженість серед щепленого поголів'я мишей складала 86,7 %
	Білі миші	18-20	10				<i>Cl. perfringens</i> тип А		1,0 x 10 ⁷			2	8	Загибель серед нещеплених мишей складала 80,0 %
	Білі миші	18-20	10				<i>Cl. perfringens</i> тип С		3,0 x 10 ⁷			1	9	Загибель серед нещеплених мишей складала 90,0 %
контрольна група (нещеплені)	Білі миші	18-20	10	0,5	підшкірно	Контрольна група мишей утримувалась у однакових умовах із тваринами дослідної групи. Інфікування мишей контрольної групи проведено через 30 діб від початку дослідження, одночасно із зараженням дослідної групи тварин у таких же концентраціях.	<i>E. coli</i> штам «Бердянський – 375»	0,5	1,0 x 10 ⁸	підшкірно	Через 10 діб після зараження патогенними культурами збудників	2	8	Загибель серед нещеплених мишей складала 80,0 %
	Білі миші	18-20	10									1	9	Загибель серед нещеплених мишей складала 90,0 %
	Білі миші	18-20	10									2	8	Загибель серед нещеплених мишей складала 80,0 %
Всього в контролі			30									5	25	Середній показник загибелі серед нещеплених мишей складає 83,3 %

Після 10 добового спостереження результати досліджень показали, що за інокуляції лабораторним тваринам збудника *Cl. perfringens* тип А збереженість серед щеплених мишей складала 90,0 % за загибелі серед нещепленого поголів'я 80,0 % білих мишей; *Cl. perfringens* тип С – 80,0 % збереженості за загибелі 90,0 % невакцинованих тварин; *E. coli* – 90,0 % збереженості за 80,0 % загибелі у групі нещеплених білих мишей. Таким чином, імуногенна ефективність експериментального зразка вакцини «Мультибовісан» складала 86,7 % збереженості щепленого поголів'я білих мишей за 83,3 % загибелі серед невакцинованих лабораторних тварин.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. За застосування розроблених технологічних прийомів при виготовленні експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» підтверджено повну інактивацію монокультур *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С, *C. novyi*, *C. septicum*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *Str. zooepidemicus*, *P. multocida*.

2. Установлено, що введені до складу експериментального зразка мультикомпонентної вакцини 9 інактивованих монокультур збудників із різною концентрацією та у різних пропорціях склали загальну концентрацію мікробних клітин у препараті – $2,41 \times 10^9$ м.к./см³. Кількісний вміст бактеріальних клітин у 1,0 см³ дослідного зразка препарату складав: *C. perfringens* тип А був на рівні $0,44 \times 10^9$ м.к.; *C. perfringens* тип С – $0,38 \times 10^9$ м.к.; *C. novyi* – $0,15 \times 10^9$ м.к.; *C. septicum* – $0,36 \times 10^9$ м.к.; *E. coli* – $0,30 \times 10^9$ м.к.; *S. enteritidis* – $0,20 \times 10^9$ м.к.; *P. multocida* – $0,20 \times 10^9$ м.к.; *S. aureus* – $0,23 \times 10^9$ м.к.; *Str. zooepidemicus* – $0,15 \times 10^9$ м.к.

3. Установлена відсутність контамінації дослідного зразка вакцинного препарату живими мікроорганізмами та мікроскопічними грибами, його нетоксичність, нешкідливість для тварин за результатами бактеріологічних та біологічних досліджень.

4. Установлено, що дослідний зразок вакцини «Мультибовісан» є антигенно активним, оскільки через 14 діб за повторного щеплення вірогідно зростали титри специфічних аглютининів до *C. perfringens* тип А – у 13,0; до *C. perfringens* тип С – у 5,0 та до *E. coli* – у 7,0 разів, що відповідає чинним вимогам до ВІЗ.

5. Встановлено, що експериментальний зразок мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» має високу імуногенну ефективність, оскільки після інфікування вакцинованих білих мишей добовими культурами збудників *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С та *E. coli* в об'ємах DLM їх збереженість складала 86,7 % за загибелі 83,3 % невакцинованого поголів'я лабораторних тварин, що відповідає чинним вимогам до ВІЗ та може бути застосована у виробничих умовах.

Перспективи подальших досліджень будуть спрямовані на вивчення показників імунобіологічної реактивності організму за застосування експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» у виробничих умовах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мищенко В.А. Ассоциативное течение респираторных инфекций у молодняка КРС / В.А. Мищенко, А.М. Рахманов, В.С. Русалеев и др. // Зб. наук. праць Луганського держ. аграр. ун-ту. – 2003. – № 27/39. – С. 374–378.
2. Шкиль Н.А. Экология условно-патогенной микрофлоры, циркулирующей в популяции животных / Н.А. Шкиль, Н.Н. Шкиль, М.Н. Шадрина // Сиб. вестник с.-х. науки. – 2003. – № 3. – С. 163–164.
3. Кассич В.Ю. Ассоциации патогенной, условно-патогенной и оппортунистической микрофлоры при пневмоэнтеритах молодняка / В.Ю. Кассич, Е.В. Волосянко // тез. докл. VI съезда паразитологов Украины. – Харьков, 1995. – С. 62–65.
4. Риженко В.П. Теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки нових вакцин / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк та ін. // Біологія тварин. – Том 12. – № 2. – 2008. – С. 51–62.
5. Риженко В.П. Наукові здобутки лабораторії анаеробних інфекцій / В.П. Риженко // Ветеринарна біотехнологія. – Бюл. № 2. – 2002. – С. 205–211.
6. Труш В.М. Удосконалення системи ветеринарних заходів на комплексі з вирощування великої рогатої худоби / В.М. Труш, В.А. Хохлов // Ветеринарна біотехнологія. – Бюл. № 8. – 2006. – С. 284–288.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА МУЛЬТИКОМПОНЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ «МУЛЬТИБОВИСАН» И ЕЕ ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ / [Рыженко В.П.], Нычик С.А., Рыженко Г.Ф., Горбатюк О.И., Андрияшук В.А., Жовнир А.М., Тютюн С.Н., Рудой А.В., Каменчук П.П.

Представлены материалы по подбору штаммов патогенных возбудителей для конструирования экспериментального образца мультикомпонентной вакцины «Мультибовисан» против пневмоэнтеритов, эндометритов, маститов, анаэробной энтеротоксемии, некротического гепатита, злокачественного отека, колибактериоза, сальмонеллеза, пастереллеза крупного и мелкого рогатого скота. Изложены результаты лабораторного контроля испытуемого образца изготовленного препарата, по которым вакцинный препарат соответствует действующим требованиям к ВИС.

Ключевые слова: штаммы, инактивация, концентрация микробных клеток, антигенная активность, иммуногенная эффективность.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE TECHNOLOGY OF THE MULTICOMPONENT VACCINE «MULTIBOVISAN» TEST SAMPLE AND ITS LABORATORY CONTROL / [Ryzhenko V.P.], Nychyk S.A., Ryzhenko G.F., Gorbatiuk O.I., Andriyashchuk V.A., Zhovnir O.M., Tiutiun S.N., Rudoy O.V., Kamenchiuk P.P.

It was selected epizootic strains of pathogens for the construction of an experimental multicomponent vaccine «Multibovisan» against pneumoenteritis, endometritis, mastitis, anaerobic enterotoxaemia, necrotic hepatitis, malignant edema, colibacillosis, salmonellosis, pasteurellosis of cattle and small ruminants. Before the production of the vaccine prototype cultures strains were checked for purity growth and conformity with the essential properties of typical morphological, cultural, biochemical and biological parameters.

Pathogens monocultures of C. perfringens type A, C. perfringens type C, C. novyi, C. septicum, E. coli, S. enteritidis, S. aureus, Str. zooepidemicus, P. multocida included in the vaccine have been inactivated and tested for microbiological and biological methods to be complete inactivated and non-toxic for white mice.

Experimental multicomponent inactivated vaccine «Multibovisan» designed with regard to the concentration of microbial cells of 9 inactivated monocultures and the selection of the optimal proportions of relevant antigens of pathogens. The total concentration of the microbial cells in the vaccine was $2.41 \cdot 10^9$ m.c./cm³.

The article presents the results of the laboratory control for bacterial and fungal contamination which established the absence of foreign microflora and fungi growth in the series # 1 of experimental vaccine «Multibovisan».

*The results of studies which demonstrated that the experimental vaccine «Multibovisan» is antigenically active as in 14 days after revaccination the level of specific agglutinins against *C. perfringens* type A increased significantly in 13.0 times, against *C. perfringens* Type C in 5.0 times, and against *E. coli* in 7.0 times that complies with the requirements for vaccines preparations.*

*Constructed experimental vaccine has highly immunogenic effectiveness as the average survivability of white mice inoculated with daily pathogens cultures of *C. perfringens* type A, *C. perfringens* type C and *E. coli* in amounts corresponding to the DLM regarding certain pathogen was 86.7 % compared to 83.3 % mortality rate after infection of unvaccinated laboratory animals.*

Keywords: *strains inactivation, the concentration of microbial cells, antigenic activity, immunogenic efficacy.*

УДК 619:579.834.115:502.501(285)(477-25)

СТЕПНА О.О., e-mail: stepnahelen@mail.ru
 Інститут ветеринарної медицини НААН

ІНДИКАЦІЯ ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР У ВОДОЙМАХ ГОЛОСІЇВСЬКОГО ТА ОБОЛОНЬСЬКОГО РАЙОНІВ МІСТА КИЄВА

*Лептоспіроз залишається гострою проблемою для лікарів ветеринарної та гуманної медицини міста Києва. У місті основним носієм інфекції є дикі гризуни, які є позитивними лептоспіроносіями і своєю сечею інфікують водойми, в яких тварини та людина заражаються при купанні. Метою цього дослідження було провести індикацію патогенних лептоспір серед водойм у місті Києві. Досліджували водойми в місцях масового відпочинку та в паркових зонах Голосіївського та Оболонського районів. Зразки води перевіряли на ростові якості та проводили біологічну пробу на золотистих хом'яках. В результаті перевірки зразків води на ростові якості було виявлено, що найкращий ріст дали серогрупи *Grippotyphosa* та *Icterohaemorrhagiae*. Біологічна проба на золотистих хом'яках показала наявність антитіл до серогруп *Icterohaemorrhagiae* та *Australis* в титрах 1:50.*

Ключові слова: *лептоспіроз, гризуни, хом'яки, реакція мікроаглютинації.*

Вступ. Лептоспіроз (лат. *Leptospirosis*) – це інфекційна природно-вогнищева хвороба багатьох видів тварин, яка проявляється короткочасною