

УДК: 619 : 084 / 615.371

РИЖЕНКО В.П., д-р вет. наук, професор, член-кор. НААН,
ГОРБАТЮК О.І., канд. вет наук,
РИЖЕНКО Г.Ф., канд. біол. аук,
АНДРІЯЩУК В.О., РУДОЙ О.В., канд. вет. наук, anaerob12@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН
ДИБКОВА С.М., РЕЗНІЧЕНКО Л.С., канд. біол. наук, sdybkova@gmail.com
Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України
ЖОВНІР О.М., ТЮТЮН С.М., КАМЕНЧУК П.П.
Інститут ветеринарної медицини НААН

КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТІ, НЕШКІДЛИВОСТІ, НЕТОКСИЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗРАЗКА ВАКЦИНИ «МУЛЬТИБОВІСАН»

Висвітлені результати досліджень in vitro генотоксичності експериментального зразка вакцини «Мультибовісан» за використання ДНК-методу для виявлення первинних пошкоджень ДНК живих клітин тест-культур IMR-32 та МДВК під дією вакцинного препарату. Наведений експериментально обґрунтований аналіз результатів досліджень з визначення нешкідливості, відсутності токсичності та негативного впливу дослідного зразка вакцини на гомеостаз організму щеплених кролів за клінічними обстеженнями, показниками пристосованості маси тіла у вакцинованих тварин та гематологічними даними.

***Ключові слова:** мультикомпонентна вакцина «Мультибовісан», генотоксичність, тест-культура, нешкідливість, гомеостаз.*

Вступ. Оскільки використання тваринницької продукції тісно пов'язане з безпекою людей, застосування з профілактичною метою асоційованих вакцин проти найпоширеніших бактеріозів для великої рогатої худоби, у технології її вирощування й експлуатації, створюють ризики негативного впливу вакцинного препарату на молекулярному рівні щодо генетичної стабільності клітин тканин організму, що може викликати пошкодження їх ДНК. Тестування вакцин *in vitro* за параметром генотоксичності є надзвичайно інформативним і високо прогностичним тестом, оскільки дозволяє швидко виявити злякисне переродження еукаріотичних клітин, особливо статевих, і запобігти виникненню негативних наслідків для здоров'я наступних поколінь [1].

За епізоотичним моніторингом найпоширеніших бактеріозів великої рогатої худоби на території України було встановлено, що асоціантами в різних варіаціях є 9 основних видів патогенних мікроорганізмів: *E. coli*, *S. enteritidis*, *St. aureus*, *P. multocida*, *Str. zooepidemicus*, *C. perfringens* типів А і С, *C. septicum*, *C. novyi*, які були ізольовані, ідентифіковані, визначені як перспективні та введені до складу експериментального зразка асоційованої вакцини «Мультибовісан» проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, некротичного гепатиту, злякисного набряку, колібактеріозу, сальмонельозу, пастерельозу великої та дрібної рогатої худоби [2].

Метою роботи було оцінити безпечність виготовленого дослідного зразка вакцини за її застосування тваринам, вивчити вплив препарату на метаболічні процеси в організмі та клініко-гематологічні показники в щеплених кролів.

Матеріал і методи. Дослідження проведені на базі експериментально-біологічної клініки ДУ Інституту кардіології ім. М.Д. Стражеско та в умовах лабораторії анаеробних інфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН.

Перед щепленням з метою визначення безпечності щодо застосування дослідного зразка вакцини «Мультибовісан» проводили оцінку її генотоксичності методом ДНК-комет (метод гелі-електрофорезу ізольованих клітин) із тестовими культурами IMR-32 і МДВК [3].

Для вивчення впливу вакцинного препарату на організм щеплених тварин за принципом пар-аналогів сформували групу кролів у кількості 5 гол., схожих за екстер'єрними даними, із середньою масою тіла $2,350 \pm 0,40$ кг [4].

Експеримент складався із двох періодів – підготовчого та облікового. Всі тварини перебували в однакових умовах годівлі й утримання (згідно існуючих норм). У підготовчий період тривалістю 14 діб, проведено зважування кролів, клінічні спостереження за їхнім загальним станом (поведінкою, апетитом, тощо). Упродовж підготовчого періоду у тварин зберігався апетит, активність, тому всі кролі були допущені до експерименту.

В період експерименту дослідним тваринам були проведені щеплення вакциною «Мультибовісан» контроль № 1, серія № 1, дата виготовлення 06.2014 р. Вакцину вводили в ділянці лопатки в дозі по $3,0 \text{ см}^3$, підшкірно, дворазово з інтервалом 14 діб. Відбір зразків крові для отримання сироватки та її зразків зі стабілізуючою речовиною (гепарин із розрахунку кінцевої концентрації $25\text{--}30 \text{ ОД/см}^3$), проводили на початку експерименту, через 7, 14 після першого та 7, 14, 21 і 28 діб після повторного щеплень.

Упродовж облікового періоду (42 доби) нами проведений комплекс клінічних і гематологічних досліджень та здійснена статистична обробка одержаних результатів. Клінічні дослідження включали: оцінку загального стану вакцинованих кролів, щодобову термометрію тварин упродовж 5 діб після першого і повторного щеплень, спостереження за реакцією тканин на місці введення вакцинного препарату. Один раз на тиждень проводили зважування кролів.

У зразках крові дослідних тварин визначали кількість еритроцитів і лейкоцитів (в камері Горяєва), концентрацію гемоглобіну – геміглобінціанідним методом за загальноприйнятими методиками згідно опису В.І. Левченка зі співав. (2002) та І. Я. Коцюмбаса зі співав. (2009) [5, 6].

Результати власних досліджень. Оцінку генотоксичності нешкідливості, нетоксичності експериментального зразка вакцини «Мультибовісан» проводили за наступними критеріями. Зокрема, результати дослідження генотоксичності представлені на таблиці 1.

Враховуючи проблему збереження генофонду племінних тварин та отримання біобезпечної тваринницької продукції у разі застосування їм вакцинного препарату, нами проведені дослідження з оцінки генотоксичності

вакцини *in vitro* для виявлення первинних пошкоджень ДНК живих клітин під дією дослідного зразка вакцини. Аналіз результатів досліджень із залученням в якості тестових еукаріотичних клітин культур ліній IMR-32 і МДВК засвідчив, що показники ДНК-руйнуючої активності «I днк», за використання системи метаболічної активації S9, варіювали у межах, близьких до негативних контролів і були вірогідно нижчими (відповідно у 10,6 і 3,6 разів) порівняно з позитивними контролями для тестових культур IMR-32 та МДВК.

Таблиця 1

Результати оцінки генотоксичності дослідного зразка вакцини «Мультибовісан» для тестових культур IMR-32 та МДВК

Показники	Кількість життєздатних клітин, %	Показник ДНК-руйнуючої активності «I днк»	Показник ДНК-руйнуючої активності «I днк» за використання системи метаболічної активації S9
Для тестової культури IMR-32			
Вакцина «Мультибовісан»	90,0	0,23 ± 0,01	0,22±0,01 *
Негативний контроль	92,0	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Позитивний контроль	88,0	1,94 ± 0,11	2,34 ± 0,12
Для тестової культури МДВК			
Вакцина «Мультибовісан»	91,0	0,51 ± 0,02	0,76 ± 0,01 *
Негативний контроль	91,0	0,36 ± 0,01	0,56 ± 0,04
Позитивний контроль	90,0	2,28 ± 0,18	2,71 ± 0,15

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з показниками негативного контролю.

Отже, в експериментах, наближених до умов *in vivo*, за використання системи метаболічної активації S9, встановлена відсутність генотоксичної дії мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан» і підтверджена її біобезпечність для живих клітин.

З метою визначення нешкідливості та нетоксичності дослідного зразка мультикомпонентної вакцини нами проведені дослідження з визначення показників приросту маси тіла у вакцинованих кролів (табл. 2).

Таблиця 2

Показники середньої живої маси у кролів за дворазового щеплення дослідним зразком вакцини «Мультибовісан», $M \pm m$, кг, $n=5$

Груп тварин	Початкові дані	Терміни зважування за щеплень, через діб					
		першого		повторного			
		7	14	7 (21)	14 (28)	21 (35)	28 (42)
Контрольна	2,330 ± 0,02	2,460 ± 0,003	2,510 ± 0,005	2,680 ± 0,003 *	2,790 ± 0,004 *	2,950 ± 0,0026	3,12 ± 0,043
Дослідна	2,350 ± 0,040	2,407 ± 0,004	2,513 ± 0,008	2,757 ± 0,022 *	2,858 ± 0,027 *	2,999 ± 0,044 *	3,138 ± 0,067 *

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно із початковими даними.

Аналіз результатів зважування щеплених кролів показав динамічне зростання їхньої маси тіла. Уже через 7 діб, за повторної вакцинації, середні показники приросту маси тіла у кролів вірогідно зростали на 14,8 % ($p < 0,05$), порівняно із початковими показниками. В кінці експерименту середня маса тіла в групі щеплених тварин вірогідно зростала в 1,3 рази (на 25,1 %), що свідчило про відсутність негативного впливу вакцинного препарату на метаболічні процеси в організмі щеплених кролів і підтверджувало його нешкідливість для тварин.

На початку експерименту була проведена термометрія кролів, яка показала, що середні показники загальної температури тіла у тварин склали $38,8 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Через 1 та 2 доби після першого щеплення температурні показники піднялися відповідно на 0,3 та 0,5 $^\circ \text{C}$, порівняно із початковими показниками, проте не виходили за межі норми. За повторного щеплення кролів дослідною вакциною упродовж 5 діб загальна температура тіла знаходилась в межах норми (табл. 3).

Таблиця 3

Результати клінічних досліджень у кролів, щеплених дослідним зразком вакцини «Мультибовісан», $M \pm m$, $n=5$

Терміни клінічних досліджень, діб	Показники після щеплень				Реакція тканин на місці введення			
	першого		повторного		першого		повторного	
	загальна температура тіла, $^\circ \text{C}$	% тварин з відхиленнями від норми	загальна температура тіла, $^\circ \text{C}$	% тварин з відхиленнями від норми	Виявлено зміни	% тварин із місцевою реакцією	Виявлено зміни	% тварин із місцевою реакцією
Початкові показники	$38,8 \pm 0,1$	–	$38,9 \pm 0,2$	–	Не виявлено	–	Не виявлено	–
Після щеплень через: 1	$39,1 \pm 0,2$	–	$38,9 \pm 0,2$	–	Незначний безболісний набряк	100,0	Незначний безболісний набряк	100,0
2	$39,3 \pm 0,2$	–	$38,7 \pm 0,3$	–	– " –	60,0	– " –	100,0
3	$38,9 \pm 0,2$	–	$39,1 \pm 0,1$	–	– " –	40,0	– " –	60,0
4	$38,9 \pm 0,2$	–	$39,0 \pm 0,2$	–	Не виявлено	–	– "	20,0
5	$39,1 \pm 0,1$	–	$38,9 \pm 0,2$	–	– " –	–	Не виявлено	–

Досліджуючи стан тканин на місці введення вакцини через 1 добу після першої та повторної вакцинацій кролів було виявлено місцеву реакцію тканин у вигляді незначного безболісного набряку в усіх щеплених тварин.

Розсмоктування набряку спостерігалось через 3–4 доби після щеплень без будь-яких зовнішніх втручань.

Гематологічні дослідження у щеплених тварин дають змогу оцінити характер впливу вакцини на їхній організм (табл. 4). Аналіз результатів досліджень показників крові підтвердив відсутність негативної дії на організм щеплених кролів, оскільки кількість еритроцитів і лейкоцитів не виходили за межі норми: еритроцити – від $5,503 \pm 0,242$ до $6,303 \pm 0,055$ Т/л та лейкоцити – від $6,300 \pm 0,130$ до $8,600 \pm 0,240$ Г/л.

Таблиця 4

Гематологічні показники у кролів, дворазово щеплених вакциною «Мультибовісан», $M \pm m$, $n=5$

Показники	Початко ві дані	Терміни досліджень за щеплень, через діб:					
		першого		повторного			
		7	14	7 (21)	14 (28)	21 (35)	28 (42)
Кількість еритроцитів, Т/л	$5,503 \pm 0,242$	$5,340 \pm 0,260$	$5,433 \pm 0,220$	$5,500 \pm 0,220$	$4,540 \pm 0,290$	$6,303 \pm 0,055$	$5,133 \pm 0,176$
Концентрація гемоглобіну, г/л	$112,50 \pm 1,00$	$113,70 \pm 0,70$	$134,70 \pm 2,40$ *	$130,00 \pm 1,00$ *	$132,70 \pm 1,10$ *	$134,30 \pm 3,80$ *	$138,30 \pm 3,60$ *
Еритроцитарні індекси: КП	$1,13 \pm 0,05$	$1,19 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,08$	$1,28 \pm 0,02$	$1,56 \pm 0,11$	$1,12 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,05$
ВГЕ	$11,25 \pm 0,10$	$11,37 \pm 0,07$	$13,47 \pm 0,24$	$13,00 \pm 0,10$	$13,27 \pm 0,11$	$13,43 \pm 0,38$	$13,83 \pm 0,36$
Кількість лейкоцитів, Г/л	$7,902 \pm 0,250$	$7,933 \pm 0,240$	$8,117 \pm 0,190$	$8,600 \pm 0,240$	$7,973 \pm 0,280$	$6,300 \pm 0,130$	$7,150 \pm 0,400$

Примітки: 1) * – $p < 0,05$, порівняно із початковими показниками.

2) В дужках вказано добу після першої вакцинації.

Важливе значення в забезпеченні фізіологічного протікання енергетичних і метаболічних процесів, підтриманні стабільного гомеостазу організму тварин має рівень гемоглобіну. За результатами досліджень концентрація гемоглобіну у кролів до щеплення складала $112,50 \pm 1,00$ г/л, що відповідало нормі (рис. 1).

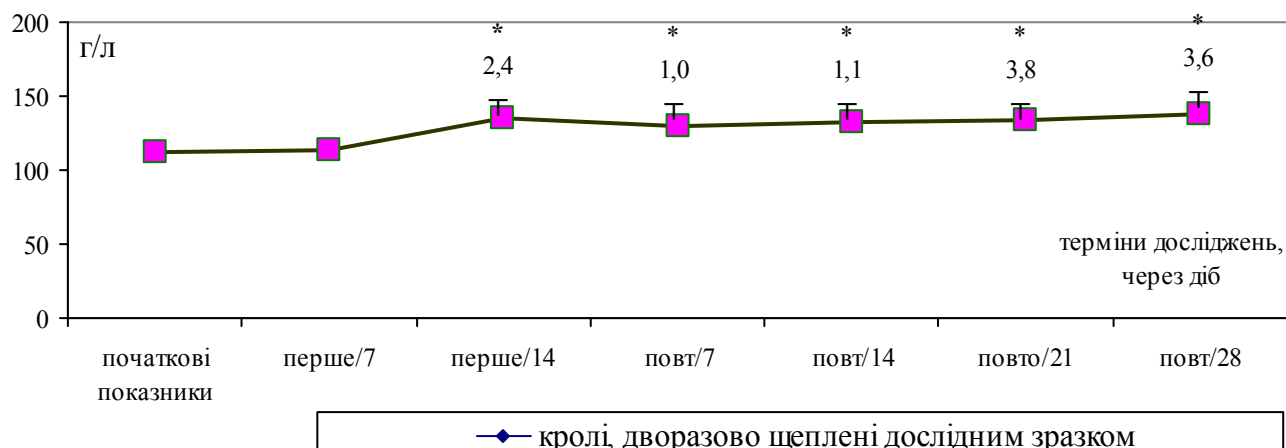


Рис. 1. Концентрація гемоглобіну у кролів за застосування дослідної вакцини «Мультибовісан»: * – $p < 0,05$ порівняно із початковими показниками.

Через 14 діб після першої вакцинації в дослідних тварин показники концентрації гемоглобіну вірогідно зростали на 16,5 % ($p < 0,05$), порівняно із початковими, а в кінці експерименту – вірогідно збільшувалися на 18,6 % ($p < 0,05$).

Одержані дані свідчать про позитивний вплив дослідного зразка вакцини на організм щеплених кролів, оскільки рівень еритроцитарних індексів – колірного показника та ВГЕ, варіював у межах норми.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлена відсутність генотоксичної дії експериментального зразка мультикомпонентної вакцини «Мультибовісан», за використання системи метаболічної активації S9 для тест-культур IMR – 32 та МДВК, що свідчило про цілісність ДНК у клітинах і біобезпечність дослідного препарату для тварин.

2. Підтверджена нетоксичність, нешкідливість та відсутність негативної дії дослідного зразка вакцини «Мультибовісан» на гомеостаз організму, оскільки упродовж експерименту в групі щеплених кролів не виявлено загибелі тварин; зростала їх середня маса тіла у 1,3 рази (на 25,1 %), порівняно із початковими показниками ($p < 0,05$); місцева реакція тканин за введення препарату була незначною, локальною і самостійно зникала упродовж 4–5 діб.

3. Після застосування дослідного зразка асоційованої вакцини «Мультибовісан» гематологічні показники упродовж експерименту варіювали у межах норми: кількість еритроцитів від $5,503 \pm 0,242$ до $6,303 \pm 0,055$ Т/л; кількість лейкоцитів – від $6,300 \pm 0,130$ до $8,600 \pm 0,240$ Г/л; концентрація гемоглобіну вірогідно зростала на 18,6 % ($p < 0,05$), порівняно з початковими показниками, що підтверджує безпечність вакцинного препарату для тварин.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Оцінка генотоксичності препаратів ветеринарних вакцин «Колисан», «Колисан + AgNP», «Актиноколисан Надія», «Актиноколисан + AgNP», «Вельшиколисан», «Вельшиколисан + AgNP», «Актиносан», «Актиносан + AgNP», «Мультибовісан», «Мультибовісан + AgNP (1,0 %)», «Мультибовісан + AgNP (0,5 %)» / Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк, В.О. Андріяшук та ін. // Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – Вип. 26. – К., 2015. – С. 237–244.

2. Патент на корисну модель № 75659 вакцина «Мультибовісан» асоційована інактивована концентрована проти пневмоентеритів, ендометритів, маститів, анаеробної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, злоякісного набряку, колібактеріозу, сальмонельозу, пастерельозу великої та дрібної рогатої худоби. – (21) у 2012 06192; (22) 23.05.2012; (24) 10.12.2012; (46) 10.12.2012. – Бюлетень № 23. – (72) Розробники: Риженко В.П., Ничик С.А., Риженко Г.Ф., Горбатюк О.І., Андріяшук В.О., Галка І.В., Жовнір О.М., Рудой О.В., Тютюн С.М., Мазигула Т.М. – (73) Власник: Інститут ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України.

3. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної і неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних

клітин: Методичні рекомендації / С.М. Дибкова, М.Є. Романько, Т.Г. Грузіна та ін. – Київ, 2010. – 24 с.

4. Методические рекомендации по планированию и проведению научно-хозяйственных опытов: Методические рекомендации / Н.С. Гавриленко, К.А. Власова, З.А. Леонтьева. – Харьков, 1988. – С. 8–16.

5. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів: Методичні рекомендації / В.І. Левченко, В.М. Соколюк, В.М. Безух та ін. – Біла Церква, 2002. – С. 27–31.

6. Комплексна оцінка впливу ветеринарних препаратів на морфофункціональний стан імунної системи: Методичні рекомендації / І.Я. Коцюмбас, Г.І. Коцюмбас, Є.М. Голубій та ін. – Львів, 2009. – С. 13–23, 40–46.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ, БЕЗВРЕДНОСТИ, ОТСУТСТВИЯ ТОКСИЧНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ВАКЦИНЫ «МУЛЬТИБОВИСАН» / Рыженко В.П., Горбатюк О.И., Рыженко Г.Ф., Андрияшук В.А., Рудой А.В., Дыбкова С.Н., Резниченко Л.С., Жовнир А.М., Тютюн С.Н., Каменчук П.П.

Представлены результаты исследований in vitro генотоксичности экспериментального образца вакцины «Мультибовисан» при использовании ДНК-метода для выявления первичных повреждений ДНК живых клеток тест-культур IMR – 32 и МДБК под воздействием вакцинного препарата. Приведен экспериментально обоснованный анализ результатов исследований по определению безвредности, отсутствия токсичности и отрицательного влияния исследуемого образца вакцины на гомеостаз организма привитых кролей по клиническим обследованиям, показателям прироста живой массы у вакцинированных животных и гематологическим данным.

Ключевые слова: мультикомпонентная вакцина «Мультибовисан», генотоксичность, тест-культура, безвредность, гомеостаз.

CRITERIA FOR EVALUATION OF GENOTOXICITY, SAFETY, NON-TOXICITY OF THE EXPERIMENTAL SAMPLE OF THE VACCINE “MULTIBOVISAN” AND CLINICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS WHEN APPLIED TO RABBITS / Ryzhenko V.P., Gorbatiuk O.I., Ryzhenko G.F., Andriiaschuk V.O., Rudoi O.V., Dybkova S.M., Reznichenko L.S., Zhovnir O.M., Tiutiun S.M., Kamenchuk P.P.

Introduction. Application of multicomponent vaccines as a prophylactic measure for cattle during its maintenance creates a risk for people biosafety because of the influence of vaccines on animals' organism and the quality and safety of animal products. In order to prevent such effects it is necessary to assess the vaccine in vitro regarding genotoxicity and in vivo to determine its safety, non-toxicity and absence of negative influence on the homeostasis of vaccinated animals' organism.

The goal of the work. To evaluate biosafety of vaccine sample in vitro for genotoxicity, to study its effect for in vivo metabolic processes in the organism and clinical and hematological parameters in vaccinated rabbits.

Materials and methods of research. Evaluation of genotoxicity of experimental vaccine sample “Multibovisan” was performed in vitro by DNA comet assay with IMR-32 and МДБК test cultures. To study vaccine sample effect in vivo on the organism of vaccinated animals it was formed a group of 5 rabbits that were vaccinated with 3.0 cm³ of vaccine “Multibovisan” twice subcutaneously in the bladebone area. During clinical studies the overall physiological state was evaluated, as well as thermometry of animals within 5 days after vaccination, tissue reaction at the injection site and live weight of animals.

Hematologic studies included determination of the total number of red blood cells, white blood cells by standard methods.

Results of research and discussion. During *in vitro* studies of vaccine “Multibovisan” sample genotoxic effect of the preparation by DNA-degrading activity «I_{DNA}» for the IMR-32 and МДБК test culture was not confirmed, indicating preparation biosafety for live cells. Studying live weight parameters of vaccinated rabbits it was found that at the end of the experiment the average body weight was significantly increased by 1.3 times (25.1%), indicating no negative effect of the vaccine on the metabolic processes in animals’ body after vaccination and confirmed its safety. During the experiment no deaths have been registered among vaccinated rabbits which confirms non-toxicity of the vaccine sample. Clinical studies have shown that the overall body temperature of vaccinated animals was normal. At the injection site painless local tissue swelling was observed, which resorbed within 4–5 days by itself. The results of hematological studies showed that the quantitative content of red and white blood cells varied slightly within the normal range. The level of hemoglobin increased by 18.6% ($p < 0.05$) compared to the initial data, which contributed to the improvement of erythrocyte indexes and indicated a positive effect of the preparation on the vaccinated animals’ organism.

Conclusions and prospects for further research. Developed experimental vaccine “Multibovisan” sample does not cause DNA damage in IMR-32 and МДБК test cultures, is harmless, non-toxic, does not show negative effect on homeostasis of vaccinated animals.

Keywords: multicomponent vaccine “Multibovisan”, genotoxicity, test culture, safety, homeostasis

REFERENCES

1. Rizhenko, G.F., Gorbatjuk, O.I., Andrijashhuk, V.O. et al. (2015). Ocinka genotoksichnosti preparativ veterinarних vakcin «Kolisan», «Kolisan + AgNP», «Aktinokolisan Nadija», «Aktinokolisan + AgNP», «Vel'shikolisan», «Vel'shikolisan + AgNP», «Aktinosan», «Aktinosan + AgNP», «Mul'tibovisan», «Mul'tibovisan + AgNP (1,0 %)», «Mul'tibovisan + AgNP (0,5 %)» [Assessment of genotoxicity of veterinary vaccines preparations "Kolysan", "Kolysan + AgNP", "Aktynokolysan Hope", "Aktynokolysan + AgNP", "Velshykolysan", "Velshykolysan + AgNP", "Aktynosan", "Aktynosan + AgNP", "Multybovisan" "Multybovisan + AgNP (1,0%)», «Multybovisan + AgNP (0,5%)»]. *Bjuleten' «Veterynarna biotekhnologija» – Bulletin “Veterinary Biotechnology”*, 26, 237-244 [in Ukrainian].
2. Rizhenko V.P., Nichik S.A., Rizhenko G.F. et al. Vakcina «Mul'tibovisan» asocijovana inaktivovana koncentrovana proti pnevmoenteritiv, endometritiv, mastitiv, anaerobnoi enterotoksemii, nekrotichnogo gepatitu, zlojakisnogo nabrjaku, kolibakteriozu, sal'monel'ozu, pasterel'ozu velikoi ta dribnoi rogatoi hudobi [Vaccine "Multybovisan" associated inactivated concentrated against pnevmoenterytiv, endometritis, mastitis, anaerobic enterotoxemia necrotic hepatitis, malignant edema, colibacillosis, salmonellosis, pasteurellosis cattle and small cattle]. Patent UA, no. 75659 2012.
3. Dibkova, S.M., Roman'ko, M.E., Gruzina, T.G. et al. (2010). Ocinka biobezpeki nanomaterialiv organichnoi i neorganichnoi prirodi metodom viznachennja genotoksichnosti luzhnim gel'-elektroforezom izol'ovanih eukariotichnih klitin: Metodichni rekomendacii [Evaluation of nanomaterials biosafety organic and inorganic nature by definition genotoxicity alkaline gel electrophoresis of isolated eukaryotic cells: Guidelines]. Kyiv [in Ukrainian].
4. Gavrilenko, N.S., Vlasova, K.A., Leont'eva, Z.A. (1988). Metodicheskie rekomendacii po planirovaniju i provedeniju nauchno-hozjajstvennyh opytov: Metodicheskie rekomendacii [Guidelines for planning and conducting scientific and economic experience]. Har'kov [in Ukrainian].
5. Levchenko, V.I., Sokoljuk, V.M., Bezuh, V.M. et al. (2002). Doslidzhennja krovi tvarin ta klinichna interpretacija otrimanih rezul'tativ: Metodichni rekomendacii [Studies of animal blood and clinical interpretation of the results: Guidelines]. Bila Cerkva [in Ukrainian].
6. Kocjumbas, I.J., Kocjumbas, G.I., Golubij, E.M. et al. (2009). Kompleksna ocinka vplivu veterinarних preparativ na morfofunkcional'nij stan imunnoi sistemi: Metodichni rekomendacii [Comprehensive assessment of the impact of veterinary products on morphofunctional immune system: Guidelines]. L'viv [in Ukrainian].