REFERENCES

1. Slepchenko, V.M., & Borodynya, V.I. (2009). Hipofunktsiya yayechnykiv: diahnostyka, likuvannya ta profilaktyka [Hypofunction ovaries: diagnosis, treatment and prevention]. *Naukovyy visnyk Natsional'noho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannya Ukrayiny – Scientific Bulletin of National Agricultural University of Ukraine, 136,* 215-221 [in Ukrainian].

2. Borodynya, V.I., & Slepchenko, V.M. (2003). Efektyvnist' deyakykh metodiv likuvannya koriv iz hipofunktsiyeyu yayechnykiv [The effectiveness of some treatments for cows with ovarian hypofunction]. *Visnyk BDAU – Bulletin BDAU, Vol. 25, Part 1,* 41-45 [in Ukrainian].

3. Belenichev, J.F., & Levitsky, E.L., & Gubsky, Y.I. et al. (2002). Antyoksydantna systema zakhystu orhanizmu (ohlyad) [The antioxidant defense system (review)]. *Sovremeппые problemы toksykolohyy – Modern problems of toxicology, 3,* 24-31 [in Ukrainian].

4. Zvereva, G.V., & Khomyn, S.P., & Oleskyv, V.N. et al. (1989). *Metodyka akusherskoy y hynekolohycheskoy dyspanseryzatsyy korov y telok [Methods of obstetric and gynecologic medical examination of cows and heifers]*. Lviv: Lviv zovet. Institute [in Ukrainian].

5. Levchenko, V.I., & Sudakov, N.A., & Haruta, G.G. et al. (1991). *Veterynarnaya dyspanseryzatsyya sel'skokhozyaystvennыkh zhyvotnыkh. Spravochnyk [Veterinary medical examination of farm animals. Directory]* Kiev: Harvest [in Russian].

6. Kondrahin, I.P., & Arhipov, A.V., & Levchenko, V.I. et al. (2004). *Metodы veterynarnoy klynycheskoy laboratornoy dyahnostyky [Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics]* Moscow: Kolos [in Russian].

7. Lakin, G.F. (1990). *Byometryya: Uchebnoe posobye dlya byolohycheskykh spetsyal'nostey vuzov [Biometrics: A manual for biological specialties universities]* Moscow: Higher School [in Russian].

8. Borisevich, V., & Borisevich, B., & Borisevich, B. (2006). Vil'ni radykaly i perekysne okysnennya lipidiv u patohenezi khvorob tvaryn [Free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of animal diseases]. *Veterynarna medytsyna Ukrayiny – Veterinary Medicine of Ukraine, 1,* 15-17 [in Ukrainian].

УДК 619:616.9:579.869

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., vet@ivm.kiev.ua
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук,
БАБКІНА М.М.,
ЗОЦЕНКО І.А.,
ТЕРЕЩЕНКО С.М.
Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ АНТИГЕНІВ, ЯКІ ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ У СКЛАДІ ЗАСОБІВ СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ БЕШИХИ СВИНЕЙ

Наведено результати вивчення антигенної активності сироваток, отриманих на вакцинні штами та комерційні вакцини проти бешихи свиней. Найвищу активність виявлено за використання лужних екстрактів антигенів у відношенні до 65–67 кДа та 39–40 кДа. Нормальна контрольна сироватка не реагувала з основним протективним білковим антигеном вагою 65–67 кДа. Гіперімунні сироватки та сироватки від тварин, імунізованих вакцинними штамами та комерційними вакцинами, реагували з білками з молекулярною вагою 94–92 кДа, 65–67кДа, 39–40 кДа та 20–24 кДа.

В серологічних тестах підтверджено антигенну специфічність загальноклітинного білка збудника бешихи свиней.

Встановлено, що максимальну активність сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген збудника бешихи свиней, проявляла у відношенні до білків з молекулярною вагою 250 кДа (титр 8,7 ± 0,4 $1og_2$), 65 кДа (титр 8,7 ± 0,3 $1og_2$), 300 кДа (титр 8,3 ± 0,3 $1og_2$). Найменша активність виявлена при реакції з білком вагою 12 кДа (титр 6,7 ± 0,2 $1og_2$) та 25 кДа (титр 5,0 ± 0,2 $1og_2$).

***Ключові слова**: бешиха свиней, антигенний склад, протективний антиген.*

Вступ. Бешиха свиней спричиняє значні збитки в Україні, країнах ЕС та інших країнах світу. Питання вивчення особливостей антигенного складу збудника бешихи, формування специфічного імунітету та його напруженості на сьогодні не втрачає актуальності, оскільки мінливість антигенного складу має прямий вплив на ефективність профілактичних щеплень [0, 2, 3, 7, 10].

Вперше протективний білок *E.rhusiopathiae* масою 65–67 кДа був виділений та описаний Makino *et al.* [12, 13] в 1998 році. Ген, що кодує цей протеїн отримав назву „*surface protective antigen A*" (*spa A*) після того, як численні досліди на лабораторних тваринах підтвердили, що саме цей протеїн є протективним та повністю захищає мишей при зараженні культурою патогенних штамів різних груп та походження. При вивченні гена *spa A* було встановлено можливість варіювання с-термінального кінця молекули відповідного білка, у той час як фрагмент від 266 до 1294 був консервативним у всіх досліджених штамів та ізолятів [15]. Також було встановлено, що найбільшу важливість має N-термінальний регіон та його епітопи [9].

Дослідження зарубіжних дослідників [6, 7, 9, 10, 14] із використанням рекомбінантного та нативного білка Spa A виявили значно більшу активність нативного білку, що пояснюється недосконалим рефолдінгом та процесом очищення цільового продукту. Це може ускладнювати виробництво рекомбінантної вакцини, оскільки активність препарату може значно варіювати в залежності від якості очищення та повноти рефолдінгу.

Останнім часом у літературі з'являється все більше повідомлень про результати вивчення генетичної та антигенної різноманітності серед штамів *E. rhusiopathiae* гену *spa A,* що робить актуальним вивчення нових ізолятів, які можуть мати значні відмінності в цьому гені і, відповідно, ефективність імунопрофілактики може бути недостатньою або незадовільною [6, 9, 10, 12, 15].

Таким чином, дослідження особливостей та антигенної варіабельності вакцинних штамів та патогенних польових ізолятів дозволить контролювати ефективність сучасних засобів специфічної профілактики бешихи свиней та прогнозувати зміни в популяції збудника бешихи для своєчасного удосконалення вакцинних препаратів.

Мета роботи: вивчити і охарактеризувати антигенні властивості та мінливість музейних, вакцинних штамів та польових ізолятів збудника бешихи свиней.

Матеріали і методи дослідження. В роботі були використані штами бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae*, що зберігаються та підтримуються в Інституті ветеринарної медицини.

Титрування антигенів та сироваток проводили за допомогою ІФА у непрямому варіанті проведення. Реакцію проводили на 96-лункових плашках (Sarstedt, Germany). В кожну лунку вносили по 100 μL протеїну або очищеного SpaA у розведеннях: 5 μg/mL, 7.5 μg/mL, 10 μg/mL та 15 μg/mL у 0.05 М карбонатно-бікарбонатному буфері (pH 9.6). Інкубували 1 годину за температури 37±0,3°С, потім три рази промивали 300 μL PBS-0.05% Tween 20 (PBST, pH=7,2). Кожну лунку блокували 100 μL 5% розчином сухого молока в PBS протягом однієї години за температури 37°С. Потім всі лунки промили 1:2 розведенням ERHU-B60-91 в 5% розчині сухого молока на PBST. Далі всі плашки інкубували протягом 60 хвилин за температури 37±0,3°С, промивали тричі PBST, за pH=7,2 та вносили 100 μL розведення 1:5,000 анти-мишиного кон'югату у 5% розчині сухого молока у PBST. Після інкубування протягом 60 хвилин та промивання, в кожну лунку вносили 100 μL TMB субстрату та зупиняли реакцію після 10 хвилин в темному місці додаванням 100 μL стоп-реактиву у кожну лунку. Урахування реакції проводили на рідері за довжиною хвилі 432 нм.

Для отримання ультразвукового гомогенату суміші антигенів культури вакцинних штамів та патогенних контрольних штамів, а також польових ізолятів, нами був визначений оптимальний режим отримання гомогенату – 15 циклів по 10 секунд на лабораторному дезинтеграторі УЗДН-10.

Фракціонування УЗ-гомогенату бактерій бешихи свиней проводили за допомогою колонки, заповненої сефадексом G-200. Білки в хроматографічних фракціях розподілялись за порядком збільшення об'ємів елюції (V_e), та зменшення молекулярної маси білків.

Для отримання гіперімунної сироватки крові мишей імунізували суспензією живих бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Підшкірно, в ділянці спини, тваринам вводили суспензію в дозі 0,5 $см^3$, що містила $2,5\times10^6$ мікробних клітин з додаванням неповного ад'юванту Фрейнда до 20% від об'єму. Повторну імунізацію проводили через 14 днів у той же дозі. Через 21 добу після останнього щеплення тваринам вводили суспензію живих бактерій у дозі 5×10^6 КУО/1 $см^3$.

Для отримання імунних сироваток використовували також комерційні і вакцинні препарати, зареєстровані в Україні. Препарати застосовували згідно листівки-вкладки.

Сироватку отримували з крові мишей, яку відбирали на 20-ий день після останнього введення антигену з серця у кількості до 1 $см^3$.

Всі сироватки були підтитровані для визначення активності із застосуванням лізату цільноклітинного антигену, отриманого із музейних та вакцинних штамів збудника бешихи свиней. Антиген був підготовлений у вигляді бактерину, лужного екстракту антигену (із використанням 5% розчину натрію гідроокису). Для отримання екстрактів застосовувались детергенти

(ЕДТА). Використовували також антиген, отриманий із культурального супернатанту всіх досліджуваних штамів та ізолятів. Протеїнові фракції, розділені в білковому ПААГ електрофорезі були використані для вивчення антигенної активності та протективних властивостей.

Для отримання специфічних сироваток нами було відпрацьовані режими отримання ультразвукового гомогенату бактерій бешихи та лужного лізату, а також використаний цільноклітинний антиген у вигляді формалінізованої очищеної культури збудника бешихи.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті фракціонування лужного гідролізату було отримано два піки – один слабко виражений, елюював з колонки на об'ємі 55±6 $см^3$, складався з крупно молекулярних білків з м. м. 300 и 250 кДа. Другий, гострий та високий пік, що виходив з колонки в об'ємі 105±2 $см^3$ був представлений низькомолекулярним білком з м.м. 65–67 кДа. Відсотковий вихід білків в першому піку складав 7,2% від нанесеного у колонку препарату та 58% – у другому піку.

У порівняльному мікроскопічному дослідженні пофарбованих за Грамом препаратів з осаду культури, що підлягала лужному гідролізу та мазків з вихідної культури була встановлена ідентична картина: прямі грампозитивні палички, характерні для бешихи свиней.

Відсутність видимого порушення цілісності мікробних клітин, що були оброблені розчином лугу є свідоцтвом того, що при застосуванні даного методу можна отримати лише поверхневі білки, головним з яких є основний протективний антиген.

В результаті проведених досліджень встановлено, що при лужному гідролізі крупно молекулярні білки екстрагуються в незначній кількості, в процесі гідролізу основна маса крупномолекулярних білків розкладається на низькомолекулярні, і саме головне, значну кількість елюату представляє білок з м.м. 65–67 кДа, який є основним протективним (табл. 1).

На рис. 1 показана типова сигмоподібна крива, характерна для титрування в ІФА білкових антигенів збудника бешихи. Одне з головних пояснень такого характеру кривої титрування в ділянці високих концентрацій сорбованого білка – просторово ускладнена взаємодія біологічних компонентів реакції. У зв'язку з цим в подальшій роботі аналізували лише показники вимірювання поглинання за λ = 492 нм в лінійній ділянці сигмоподібного профілю кривої титрування білковомістимих препаратів.

Таблиця 1

Результати вивчення залежності отримання білків певної молекулярної маси від вихідного екстракту, що фракціонується гель-фільтрацією на хроматографічній колонці

№	Препарат	кількість білку (мг) на колонку з	Вихід білку													
			300 кДа		250 кДа		64-67 кДа		25кДа		12кДа		<12 кДа		загальний вихід білку	
			%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг
1	УЗ-гомогенат	7,2	17,4	1,25	16	1,15	**15**	**0,96**	5	0,36	3	0,22	0	0	56,9	4,1
2	Гідролизат	7,5	7,2	0,54	0	0	**58**	**4,35**	0	0	0	0	0	0	65,2	4,89

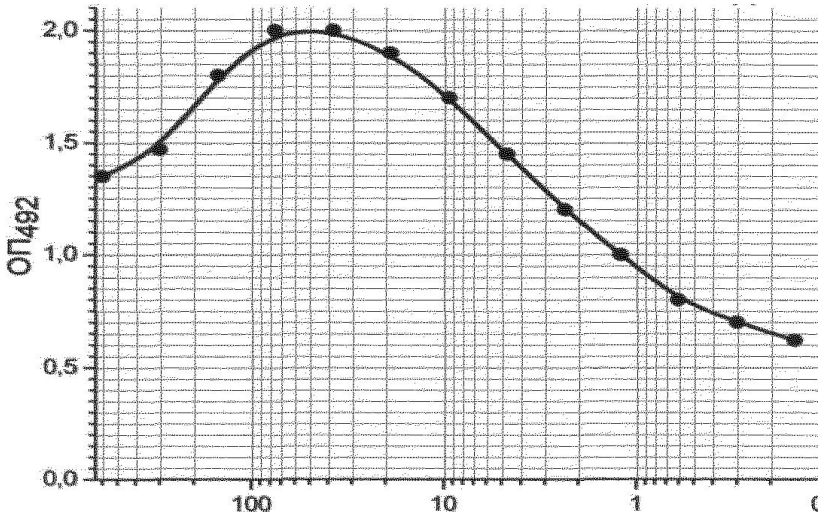

Рис. 1. Сигмоподібний профиль кривої титруваня в ІФА білкового антигену з м. м. 65 – 67 кДа в залежності від концентрації та чистоти білка, що сорбується на твердій фазі.

Аналіз результатів таблиці 2 свідчить про те, що білковий антиген з м. м. 300 кДа, розведений 1:1024 (до вмісту білка в пробі 1,17 мкг/мл) реагує з референт-сироваткою з достовірним значенням одиниць ІФА – 266. Для білкового антигену з м.м. 65–67 кДа позитивний показник виявлено за ще більш високого розведення – 1:2048, в якому вміст білка складає всього 0,59 мкг/мл. З представленого матеріалу також можна зробити висновок, що з

підвищенням ступеня чистоти сорбованого антигену в певних межах підвищується й ефективність аналізу.

Таблиця 2

Вивчення серологічної активності в ІФА білків з м.м. 250 та 65–67 кДа в залежності від сенсибілізуючої дози, n=3

Розведення антигену	Концентрація білка на твердій фазі, (мкг/см^3)	Імунна сироватка[д]			
		250 кДа		65 – 67 кДа	
		оптична густина при λ=492 нм, о.о.[в]	одиниць ІФА	оптична густина при λ=492 нм, о.о.[в]	одиниць ІФА
1:128С	9,4	1,436*	468	1,684	614
1:256	4,7	1,200	383	1,440	496
1:512	2,34	0,987	324	1,170	391
1:1024	1,17	0,832	266	0,984	326
1:2048	0,59	0,691	220	0,817	275
1:4096	0,30	0,563	182	0,686	231

Примітка: А – в якості антитіл використана сироватка в розведенні 1:1000; В – вимірювання поглинання за λ=492 нм; о.о. – оптичні одиниці; С–D – лінійна ділянка кривої титрування профілю антигена в ІФА. Цифрові дані представляють середньоарифметичну величину для n=3 з похибкою (Т) в межах ± 3-8%.

Таким чином, підбір оптимальної сенсибілізуючої дози на лунку мікропланшету дозволив встановити, що максимальна інтенсивність ІФА реєструвалась при застосуванні антигену в концентрації 5–10 мкг/см^3, яка формувала високий рівень оптичної густини (1,3–1,6) та достовірну різницю результатів між контрольними позитивними та негативними сироватками.

Згідно даних, викладених у таблиці 3, нами було встановлено, що максимальну активність сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген проявляла у відношенні до білків з м.м. 250 кДа (титри 8,7±0,4 $1og_2$), 65 кДа (титр 8,7±0,3 $1og_2$), 300 кДа (титр 8,3±0,3 $1og_2$. Найменша активність виявлена при реакції з білком з м. м. 12 кДа (титр 6,7±0,2 $1og_2$) та 25 кДа (титр 5,0±0,2 $1og_2$).

Таблиця 3

Результати вивчення антигенної активності сироваток мишей, отриманих на білкові антигени збудника бешихи свиней в ІФА, M±m, n=3

Білковий антиген, м. м. (кДа)	Сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген (зворотні титри log_2)	сироватка отримана на білок з м. м., кДа (зворотні титри log_2)				
		300	250	65	25	12
300	8,3 ± 0,3	10,7 ± 0,3	5,7 ± 0,3	0	0	0
250	8,7 ± 0,4	7,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2	0	0	0
65 -67	8,7 ± 0,3	0	0	11,7± 0,2	0	0
25	5,0 ± 0,2	0	0	0	10,5 ±0,1	0
12	6,7 ± 0,2	0	0	0	0	9,7± 0,3

Щодо сироваток, отриманих на білки з м. м. 300, 250, 65, 25 и 12 кДа, то вони активно реагували лише з гомологічними білками. Так, сироватка мишей, отримана на білок з м. м. 12 кДа, реагувала лише з білком м. м. 12 кДа у титрах 9,7±0,3 $1og_2$, сироватка мишей до білку з м. м. 25 кДа реагувала лише з білком м. м. 25 кДа у титрах 10,5±0,1 $1og_2$, а сироватка мишей до білка з м. м. 65 кДа реагувала лише з білком з м. м. 65 кДа у титрах 11,7±0,2 $1og_2$.

Встановлено також, що невеликі перехресні реакції були відмічені при дослідженні сироваток, отриманих на білки з молекулярною масою 300 та 250 кДа. Так, сироватка мишей до білка з м. м. 300 кДа реагувала не лише з гомологічним білком в титрах 10,7±0,3 $1og_2$, але й з білком м. м. 250 кДа, але в значно менших титрах (5,7±0,3 1og), а сироватка мишей до білку з м.м. 250 кДа реагувала з даним білком у титрах 7,2±0,2 $1og_2$, а також з м. м. 300 кДа у титрах 5,3±0,2 $1og_2$.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Найвища активність сироваток, отриманих на вакцинні штами та комерційні вакцини проти бешихи свиней зафіксована при використанні лужних екстрактів антигенів у відношенні до 65–67 кДа та 39–40 кДа антигенів. Нормальна контрольна сироватка не реагувала з основним протективним білком вагою 65–67 кДа. Гіперімунні сироватки та сироватки від тварин, імунізованих вакцинними штамами та комерційними вакцинами, реагували з білками молекулярною вагою 94–92 кДа, 65–67кДа, 39–40 кДа та 20–24 кДа.

2. В серологічних тестах підтверджена антигенна специфічність загальноклітинного білка збудника бешихи.

3. Встановлено, що максимальну активність сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген збудника бешихи свиней, проявляла у відношенні до білків з м. м. 250 кДа (титри 8,7±0,4 $1og_2$), 65 кДа (титр 8,7±0,3 $1og_2$), 300 кДа (титр 8,3±0,3 $1og_2$). Найменша активність виявлена при реакції з білком з м. м. 12 кДа (титр 6,7±0,2 $1og_2$) та 25 кДа (титр 5,0±0,2 $1og_2$).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воронин Е.С.Рожа свиней: профилактика и меры борьбы / Е.С. Воронин, М.В. Романова. – М.: ННИИТЭагропром, 1987. – 44 с.

2. Геведзе В.И. Рожа / Профилактика болезней свиней на комплексах. / Геведзе В.И., Андросик Н.Н., Ленькова В.А. – Минск, 1982. – С. 30–34.

3. Маниатис Т. Молекулярное клонирование. / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // М. – Мир, 1984. – С. 240 – 241.

4. Ображей А.Ф. Вивчення антигенних властивостей Erysipelothrix rhusiopathiae різних штамів/ Ображей А.Ф, Тарасов О.А., Дерябін О.М. // Наук. вісник ЛНАВМ імені С.З. Гжицького, Львів, 2007. – Том 9, № 1 (32). – С. 114–119.

5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M.M. – Analyt. biochemistry, 1976. – T.72. – P.248 – 254.

6. Brooke C.J. Erysipelothrix rhusiopathiae: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen / C.J. Brooke., T.V. Riley – J. Med. Microbiol., 1999. – Vol. 48 – № 9. – P. 789–799.

7. Fidalgo S.G. Detection of Erysipelothrix rhusiopathiae in clinical and environmental samples / S.G. Fidalgo, T.V. Riley – Methods Mol. Biol., 2004. – Vol. 268 – P. 199–205.

8. Galan J.E. Cloning and expression in Escherichia coli of a protective antigen of

Erysipelothrix rhusiopathiae / Galan J.E., Timoney J.F. – Infect. Immun., 1990. – Vol. 58 – № 9 – P. 3116–3121.

9. Imada Y. Truncated surface protective antigen (SpaA) of Erysipelothrix rhusiopathiae serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs / Imada Y., Goji N., Ishikawa H. – Infect. Immun., 1999. – Vol. 67 – № 9 – P. 4376–4382.

10. Kitajima T. Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of Erysipelothrix rhusiopathiae and its implication in protective immune response. / Kitajima T., Oishi E., Amimoto K. – J. Vet. Med. Sci., 2000. – Vol. 62 – No. 10. – P. 1073–1077.

11. Laemmli U.K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. – Nature, 1970. – V. 227– N. 4 – P. 680.

12. Makino S.I. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of Erysipelothrix rhusiopathiae / Makino S.I., Yamamoto K., Murakami S. – Microb. Pathog., 1998. – Vol. 25 – № 6. – P. 101–109.

13. Makino S.I. Surface antigen, SpaA, of Erysipelothrix rhusiopathiae binds to Gram-positive bacterial cell surfaces / Makino S.I., Yamamoto K., Asakura H. – FEMS Microbiol. Lett., 2000. – Vol. 186 – № 2 – P. 313–317.

14. Sato H. Isolation and purification of a protective protein antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae / Sato H., Miyazaki H., Sakakura H. – Zen. Fur Vet. Reihe B., 1999. – Vol. 46 – № 2. – P. 73–84.

15. Shimoji Y. Presence of a capsule in Erysipelothrix rhusiopathiae and its relationship to virulence for mice / Shimoji Y., Yokomizo Y, Sekizaki T. – Infect. Immun., 1994. – Vol. 62. – P. 2806–2810.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНТИГЕНОВ, КОТОРЫЕ ПРИМЕНЯЮТСЯ В СОСТАВЕ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ РОЖИ СВИНЕЙ / Тарасов А.А., Сапейко В.П., Бабкина М.М., Зоценко І.А., Терещенко С.М.

Приведены результаты изучения антигенной активности сывороток, полученных на вакцинные штаммы и коммерческие вакцины против рожи свиней при использовании щелочных экстрактов антигенов в отношении 65–67 кДа и 39–40 кДа антигенов. Нормальная контрольная сыворотка не реагировала с основным протективным белком весом 65–67 кДа. Гипериммунные сыворотки и сыворотки от животных, иммунизированных вакцинными штаммами и коммерческими вакцинами, реагировали с белками молекулярным весом 94–92 кДа, 65–67кДа, 39–40 кДа и 20–24 кДа.

В серологических тестах подтверждена антигенная специфичность цельноклеточного белка возбудителя рожи свиней.

Установлено, что максимальную активность сыворотка крови мышей, полученная на цельноклеточный антиген возбудителя рожи свиней, проявляла в отношении белков с массой 250 кДа (титры 8,7±0,4 $1og_2$), 65 кДа (титр 8,7±0,3 $1og_2$), 300 кДа (титр 8,3±0,3 $1og_2$). Наименьшая активность выявлена при реакции с белком массой 12 кДа (титр 6,7±0,2 $1og_2$) и 25 кДа (титр 5,0±0,2 $1og_2$).

***Ключевые слова**: рожа свиней, антигенный состав, протективний антиген.*

STUDY OF ANTIGEN PECULIARITIES WHICH WERE USED IN VACCINES FOR SWINE ERYSIPELAS CONTROL / Tarasov O.A., Sapeyko V.P., Babkina M.M., Zotsenko I.A., Tereshchenko S.M.

***Introduction**. Erysipelothrix rhusiopathiae causes significant losses in Ukraine, EU and other countries. The study of antigenic characteristics of erysipelas causative agent, the formation of specific immunity and its intensity do not lose relevance today because of antigenic variation and due to the direct impact on the effectiveness of preventive vaccination.*

The goal of the work *was to study and characterized antigenic properties and variability of the museum, vaccine strains and field isolates of the swine erysipelas causative agent.*

Materials and methods. *It was used the standart approaches for preparing antigens, obtaining hyperimmune serum and indirect variant of ELISA. It was used an alcaline extract of whole-cell antigen and obtained with ultrasonic desintegrator.*

Results of research and discussion. *The results of the study of the antigenic activity of sera to the vaccine strains and a commercial vaccine against swine erysipelas when using alkaline extract antigens against 65–67 kDa and 39–40 kDa. The serological tests confirmed the antigenic specificity of corpuscular pathogen protein. It was detected the maximum activity of mice serum obtained for whole cell antigen of swine erysipelas with a mass of 250 kDa , 65 kDa, 300 kDa, the lowest activity detected by reaction with a protein of 12 kDa and 25 kDa.*

Conclusions and prospects for further research:

1. The antigenic activity of sera to the vaccine strains and a commercial vaccine against swine erysipelas using alkaline extract antigens was the most revealed against 65–67 kDa and 39–40 kDa antigens. Normal control sera did not react with the protective protein 65–67 kDa. Hyperimmune sera and sera from animals immunized with the vaccine strains and commercial available vaccines reacted with proteins of molecular weight 94–92 kDa, 65–67kDa, 39–40 kDa and 20–24 kDa.

2. The serological tests confirmed the antigenic specificity of corpuscular pathogen protein and recombinant protein Spa A with m.w.65–67 kDa.

3. It was detected that the maximum activity of mice serum obtained with whole-pathogen antigen for proteins with a mass of 250 kDa (titre 8.7±0.4 $1og_2$), 65 kDa (titre 8.7±0.3 $1og_2$), 300 kDa (titre 8.3±0.3 $1og_2$). Lowest activity detected by using the protein of 12 kDa (titre 6.7±0.,2 $1og_2$) and 25 kDa (titre 5.0±0.2 $1og_2$).

Keywords*: swine erysipelas, an antigenic composition, protective antigens*

REFERENCES

1. Voronin, E.C. (1987). Roja Sviney [Swine erysipelas]. M. : NNIITEagroprom [in Russian].

2. Gevedze, V.I., Androsik, N.N., & Lenkova, V.A. (1982). Prophylaktyka bolezney sviney na kompleksah [The prophylaxis of swine deseases on pig complexes]. Minsk [in Russian]

3. Maniatis, T., Frich, E., & Sambrook, D.M. (1984). Molekuliarnoe klonirovanie [Molecular clonning]. Moskow: Mir [in Russian].

4. Obrazhey, A.F., Tarasov, O.A., & Deriabin, O.M. (2007). Vivchennia antigennih vlastivostey Erysipelothrix rhusiopathiae riznih shtammiv [Investigation of antigenic properties of Erysipelothrix rhusiopathiae different strains]. Lviv [in Ukrainian].

5. Bradford, M.M. (1987). A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt.biochemistry, 72,* 248-254.

6. Brooke, C.J., & Riley, T.V. (1999). Erysipelothrix rhusiopathiae: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J. Med. Microbiol., 48, (9),* 789-799.

7. Fidalgo, S.G., & Riley, T.V. (2004). Detection of Erysipelothrix rhusiopathiae in clinical and environmental samples. *Methods Mol. Biol., 268,* 199-205.

8. Galan, J.E. & Timoney, J.F. (1990). Cloning and expression in Escherichia coli of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Infect. Immun., 58, (9),* 3116-3121.

9. Imada, Y., Goji, N., & Ishikawa, H. (1999). Truncated surface protective antigen (SpaA) of Erysipelothrix rhusiopathiae serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect. Immun., 67, (9),* 4376-4382.

10. Kitajima, T., Oishi, E., & Amimoto, K. (2000). Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of Erysipelothrix rhusiopathiae and its implication in protective immune response. *J. Vet. Med. Sci., 62, (10),* 1073-1077.

11. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227, (4),* 680.

12. Makino, S.I., Yamamoto, K., & Murakami, S. (1998). Properties of repeat domain found

in a novel protective antigen, SpaA, of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Microb. Pathog., 25, (6),* 101-109.

13. Makino, S.I., Yamamoto, K., & Asakura, H. (2000). Surface antigen, SpaA, of Erysipelothrix rhusiopathiae binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. *FEMS Microbiol. Lett., 186, (2),* 313-317.

14. Sato, H., Miyazaki, H., & Sakakura, H. (1999). Isolation and purification of a protective protein antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. *Zen. Fur Vet. Reihe B., 46, (2),* 73-84.

15. Shimoji, Y., Yokomizo, Y, & Sekizaki, T. (1994). Presence of a capsule in Erysipelothrix rhusiopathiae and its relationship to virulence for mice. *Infect. Immun. 62,* 2806-2810.

УДК 616.94-022.7-092-053.2

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст.наук.сп., vet@ivm.kiev.ua,
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук,
ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, ст.наук.сп.,
БАБКІНА М.М.
Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА СТРЕПТОКОКОЗУ СВИНЕЙ (*S. SUIS*) В УКРАЇНІ

Проведені моніторингові дослідження щодо розповсюдження стрептококозів свиней та виділено 34 ізоляти збудника стрептококозу з різних регіонів України із урахуванням особливостей перебігу хвороби. Ізоляти охарактеризовано за біологічними властивостями. За культурально-морфологічними та ферментативними властивостями відмінностей між досліджуваними ізолятами встановлено не було.

Досліджено відмінності щодо чутливості ізолятів збудників стрептококозу у відношенні до антибіотичних субстанцій: фторхінолонової групи – енрофлоксацин, ципрофлоксацин; цефалоспоринів – цефтріаксон, цефалексин; тетрациклінів – тетрациклін, доксициклін; аміноглікозідів – гентаміцин; пеніцилінової групи – амоксіцилін, пеніцилін; макролідів – еритроміцин, кліндаміцин. В результаті досліджень була встановлена їх підвищена чутливість до пеніциліну та амоксициліну, які проявляли бактеріостатичну та бактеріцидну дію в концентрації 0,01–0,06 μg/см^3, а також до фтористих хінолонів (енрофлоксацину та ципрофлоксацину) у концентрації

0,05–0,1 μg/см^3. Ізоляти були дещо менш чутливими до цефазоліну – 0,25 μg/см^3. Всі штами були резистенті до триметоприму, сульфадиметоксину та канаміцину.

***Ключові слова**: стрептококоз свиней, біологічні властивості, клініко–епізоотичні особливості, антибіотикочутливість.*

Вступ. Збудник стрептококозів свиней є одним із найпоширеніших патогенів в промисловому свинарстві [0–3].

Збудниками стрептококових захворювань поросят є стрептококи серогруп S та R (тип 2) [4]. *S. suis* викликає ряд тяжких захворювань у свиней: артрити, менінгіти, септицемії, пневмонії, що призводить до значних економічних втрат в галузі промислового свинарства [5].