

www.document.ua. Retrieved from: <http://document.ua/obovjakovii-minimalnii-perelik-doslidzhen-sirovini-produkciy-nor8259.html> [in Ukrainian].

11. Gondova, Zuzana (2012). The NAT test – screening for antibiotic residues in the tissues of food-producing animals – Institute of Meat Hygiene and Technology University of Veterinary Medicine and Pharmacy Kosice, Slovak Republic. *www.maso-international.cz*. Retrieved from: <http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-095-100.pdf>.

12. Nico, Coppens (2012). Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies – Ghent university veterinary faculty. *www.lib.ugent.be*. Retrieved from: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf.

13. Commission Regulation (EU) № 37/2010. (2010). *Official journal of the European Commission*, 15, 72.

14. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Commission*, L 221, 8-28.

УДК 619:616.98:579

АКИМЕНКО Л.І., канд. біол. наук, e-mail: larisa_akimenko@mail.ru

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

НИЧИК С.А., д-р вет. наук, професор, чл-кор., e-mail: ivm_naan@ukr.net,

БОЙКО П.К., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: pkboyko@ukr.net

Інституту ветеринарної медицини НААН

БОЙКО О.П., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: 1bor_ua@rambler.ru

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН

АССОПІ О.Ю., директор, e-mail: sgbiofabrika@gmail.com

Державне підприємство «Сумська біологічна фабрика»

ПЕРЕВІРКА ТИПОВОСТІ ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ *CLOSTRIDIUM CHAUVOEII* R-15 ЗА МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ

Наведено результати аналізу міжнародної нормативної бази щодо підготовки штамів мікроорганізмів для впровадження у виробництво, контролю стабільності їхніх властивостей у разі довготривалого зберігання відповідно до паспортних характеристик з метою виготовлення ветеринарних імунобіологічних засобів, а також проміжного та кінцевого контролю якості готового препарату.

*Показано найважливіші етапи стандартизації основних показників якості гідроксид алюмінієвої формолвакцини проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби та овець на прикладі вакцинного штаму *Clostridium chauvoeii* R-15, зокрема результати перевірки типовості за морфологічними ознаками, тинкторіальними, культуральними, біохімічними, імунологічними та вірулентними показниками.*

Ключові слова: *Clostridium chauvoeii*, емфізематозний карбункул, стандартизація, якість вакцини.

Вступ. Емфізематозний карбункул (емкар) – *Gangraena emphysematosa* – інфекційне захворювання великої рогатої худоби та овець з гострим перебігом, що характеризується появою крепітувальних запальних набряків у мускулатурі.

Збудник інфекції має панзоотичне розповсюдження у світі, а сама інфекція характеризується спорадичністю, ензоотичністю та нерівномірним проявом на території п'яти континентів світу. Територія України є місцем постійного прояву епізоотичного процесу емкару [1]. З огляду на те, що з'явилися випадки інфікування людей *Cl. chauvoei* та з новими підходами щодо вакцинації тварин в умовах ведення органічного господарства, необхідно звернути особливу увагу на найважливіші вектори контролю епізоотичного процесу, зокрема діагностику хвороби, стандартизацію розробки, виготовлення та контролю якості імунобіологічних засобів у відповідності до міжнародних вимог [2–4]. Це дозволить оптимізувати показники якості вакцини, поставити препарат на рівень світових стандартів.

Вакцину проти емфізематозного карбункулу запропонували в 1925 р. Лекленш і Валле [5]. В Єврофармакопеї восьмого видання вакцині проти емфізематозного карбункулу присвячено статтю № 361, де описано вимоги до вакцини та біотехнологічні аспекти її виготовлення [6]. Документами FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) визначено вимоги щодо ідентифікації виробничих штамів, створення зразків довготермінового зберігання, процесу виробництва та контролю показників якості вакцини [7].

В колишньому Радянському Союзі технологію промислового виробництва концентрованої гідроокис алюмінієвої формолвакцини проти емкару розробили Ф. И. Каган і А. И. Колесова [8, 9]. Всі технологічні моменти та контроль якості вакцини на сьогодні відображено в ГОСТ 32732-2014 [10].

В Україні гідроксид алюмінієву формолвакцину проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби і овець на основі вакцинного штаму *Cl. chauvoei R-15* за технологію, розробленою в кінці 50-х років минулого століття, випускають на ДП «Сумська біологічна фабрика».

Зважаючи на те, що в сучасних умовах конкурентоспроможність препарату визначається його якістю та ефективністю, забезпечення яких досягається на основі стандартизації процесів на всіх етапах виробництва у відповідності до міжнародних вимог, виникла необхідність у висвітленні найважливіших етапів виготовлення вакцини проти емкару, що мають визначальний вплив на її якість.

Мета роботи дослідити властивості виробничого штаму *Cl. chauvoei R-15* за показниками, визначеними у вітчизняній нормативній документації, порівняти міжнародні вимоги щодо якості вакцини проти емкару з вітчизняними та визначити напрямки удосконалення вакцини з метою створення інноваційного, імпортозаміщуючого препарату.

Матеріали і методи досліджень. В роботі використано бактеріологічні, біологічні та біохімічні методи досліджень. Досліджували морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні та біохімічні властивості виробничого штаму *Cl. chauvoei R-15* згідно з ДСТУ ISO 7218:2008 [10], ДСТУ 7963:2015 [11], ДСТУ

8535:2015 [12]. Для вивчення біохімічних властивостей штаму використано мозкове середовище, молоко, середовище Гісса із моноцукрами і середовище токсинакопичення [13].

Патогенність виробничого штаму *Cl. chauvoei R-15* вивчали на морських свинках масою 400 ± 50 г з використанням добової культури *Cl. chauvoei R-15* в дозі $0,5 \text{ см}^3$ за СОУ 85.20-37-408 [14].

Освіження патогенних властивостей виробничого штаму проводили крізь організм теляти віком 4 міс., нещепленого проти будь-якого захворювання. Для цього суміш 5 см^3 24-годинної культури *Cl. chauvoei R-15* і

1 см^3 стерильного 5% розчину кальцію хлориду вводили підшкірно в ділянці лівого паху. Впродовж першої години після смерті тварини відбирали патологічний матеріал (серце, селезінка, печінка, нирки, уражена м'язова тканина) для бактеріологічного дослідження з метою вивчення типовості виділеної культури *Cl. chauvoei R-15* за морфологічними ознаками і культурально-біохімічними властивостями, виділення виробничої культури (master-seed) і відбору патологічного матеріалу для тривалого зберігання.

Бактеріологічне дослідження патологічного матеріалу зводилося до вивчення морфологічних ознак і тинкторіальних властивостей *Cl. chauvoei R-15* у мазках-відбитках із патологічного матеріалу і препаратах, пофарбованих за Грамом, і «роздушена крапля» із культур, отриманих шляхом висіву всіх органів і тканин в середовище Кітта-Тароцці (СКТ), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) і на м'ясо-пептонний агар (МПА) (контроль на присутність аеробної мікрофлори) і тверді живильні середовища – кров'яний глюкозний м'ясо-пептонний агар (КГМПА). Посіви інкубували за температури $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ протягом 24–48 год. Методологія проведених досліджень базується на вимогах ДСТУ 7198:2010 [15], ДСТУ 7199:2010 [16], ДСТУ 8164:2015 [17].

Результати досліджень та їх обговорення. Процедуру депонування виробничого штаму *Cl. chauvoei R-15* проведено у відповідності до Інструкції [18] у 1997 році. Інструкція надає право депозитарію на уточнення або/і доповнення наукового опису штаму мікроорганізмів, що депонуються. Вітчизняними нормативними документами визначено, що ДНКІБШМ проводить забезпечення біологічних фабрик України виробничими штамми і контролює якість вакцинних препаратів [19].

В процесі освіження виробничого штаму крізь організм теляти (1997, 2004 та 2005 рр.) нами було проведено уточнення характеристик виробничого штаму та створення розгорнутого паспорту *Cl. chauvoei R-15*.

Актом від 24.06.2005 р. про науковий супровід виробництва концентрованої гідроксид алюмінієвої формолвакцини проти емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби і овець на Сумській біологічній фабриці задокументовано хід проведення робіт з освіження вакцинного штаму *Cl. chauvoei R-15* через організм чутливої тварини (теля).

Інфікування теляти проводили сумішшю 5 см^3 24-годинної культури *Cl. chauvoei R-15* з 1 см^3 5 % розчину кальцію хлориду, яку вводили підшкірно в

ділянці колінної складки. Після введення цієї суміші за твариною вели спостереження, відмічаючи зміни клінічного стану (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1

Показники клінічного стану теляти зараженого *Cl. chauvoei* R-15

Час реєстрації показника / температура тіла, в °С	Показники клінічного стану теляти
16 ⁰⁰ / 38,9	Зараження теляти було проведено з використанням 5 см ³ 24-годинної культури <i>Cl. chauvoei</i> R-15 в суміші з 1 см ³ кальцію хлориду шляхом підшкірного введення.
23 ⁰⁰ / 38,5	Теля пригнічене, труситься, важко встає; наявні ознаки кульгавості та утрудненого пересування задньої кінцівки, в яку було зроблено введення культури.
04 ⁰⁰ / 38,7	Теля лежить, не їсть; навколо місця уведення культури (ділянка стегна) з'явилася різко окреслена розлита припухлість, що швидко (протягом кількох годин) збільшувалася; шкіра натягнута гаряча болюча, а в разі натискання на неї відчувається крепітація. Пульс ниткоподібний –120 уд./хв. Дихання сповільнене.
12 ⁰⁰ / 37,9	Тварина лежить на здоровій кінцівці; пухлина холодна безболісна, виступає над маклоком, перкутуючи, створює тимпанічний звук; очі закриті; не реагує на подразнення; пульс не прощупується; дихання поверхневе сповільнене.
15 ²⁰ / 35,8	Теля лежить на правому боці, голова закинута вгору; очний рефлекс відсутній; скрегіт зубами; дихання важке прискорене; пульс нитковидний, не підраховується.
16 ⁰⁰	Загибель теляти наступила через 24 години після зараження.



Рис. 1. Вимушено лежаче положення зараженого збудником емкару теляти, набряк у ділянці тазостегнової групи м'язів різко виступає над маклоком.

Після загибелі теляти відібрано патологічний матеріал: кров з серця, селезінка, печінка, нирки, некротизовані тканини з місця введення культури. У

мазках-відбитках із патологічного матеріалу виявлено грампозитивні палички із заокругленими кінцями, що розміщувалися поодиноці або ланцюжками по 2–4, поліморфні (веретеноподібні, грушеподібні); спори овальні, розміщуються центрально, субтермінально або лежать вільно, капсул не утворюють. У мазках-відбитках із печінки та з її діафрагмальної поверхні виявлено короткі грампозитивні із заокругленими кінцями палички, які розташовуються поодиноці або попарно (рис. 2), що вважають однією із найважливіших диференційних відмінностей за морфологічною ознакою між видами кластридій *Cl. chauvoei* і *Cl. septicum*. Останній в печінці утворює довгі нитковидні форми.



Рис. 2. Грампозитивні короткі, із заокругленими кінцями палички, розташовані поодиноці або попарно, у препараті з діафрагмальної поверхні печінки трупа теляти за експериментального емкару, спричиненого *Cl. chauvoei* R-15.

Із всіх відібраних зразків патологічного матеріалу отримано чисті (росту на МПБ і МПА не відмічено у жодній пробі) культури, характерні для *Cl. chauvoei* (на СКТ легку каламуть відмічали вже на 12–14-у годину, на 18-у годину – газоутворення; після 24-ї години на дні пробірки формувався білий рихлий осад мікробної маси; на 28–30-у годину бульйон просвітлюється).

Посіви на КГМПА інкубували в анаеростаті в умовах високого (– 0,9 атм) розрідження за 37 °С протягом 40–46 год. Колонії на кров'яному агарі дрібні круглі блискучі з рівними краями і підвищеним центром, що мали вигляд перламутрових гудзиків (рис. 3). Культура повільно звурджувала молоко, ферментувала глюкозу, сахарозу, лактозу, маніт та дульцит, не розщеплювала ізодульцит і саліцин, повільно розріджувала желатину, не викликала почорніння мозкового середовища.

Поставлена біологічна проба на морських свинках. Морські свинки після підшкірного введення культури в дозі 0,5 см³ загинули упродовж 18–28 годин з моменту зараження.

На довготермінове зберігання було закладено зразки патологічного матеріалу в гліцерині та ліофілізовану культуру *Cl. chauvoei* R-15 з наступним періодичним визначенням паспортних характеристик штаму.

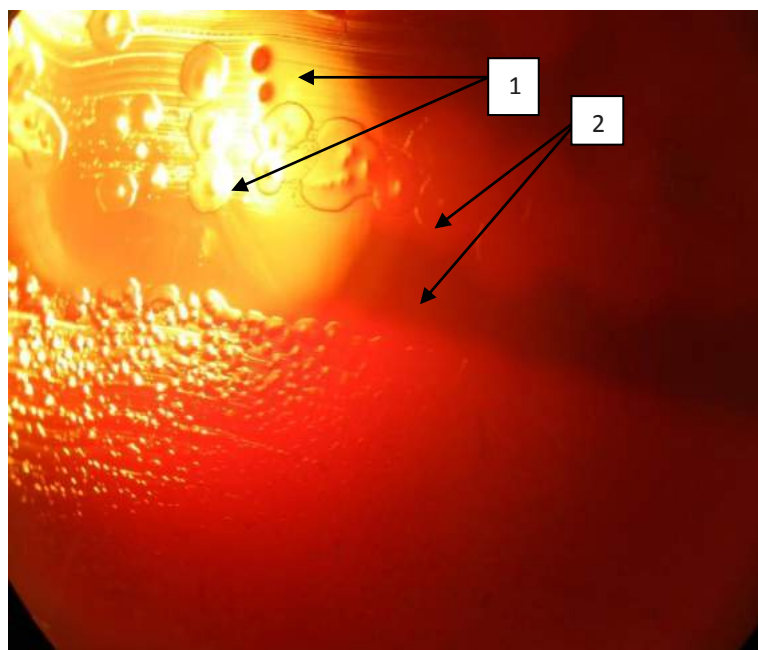


Рис. 3. Ріст *Cl. chauvoei* R-15 на КГМПА: 1 – колонії, що мають вигляд перламутрових гудзиків; 2 – зони β-гемолізу.

У відповідності до вимог FAO процедура створення партії вихідного матеріалу для виготовлення вакцини (seed-lot) поетапно має таку послідовність:

- пасаж виробничого штаму через організм чутливих тварин, в якому мікроорганізм набуває повного складу антигенів;
- рівень протективних антигенів треба підтримувати в культурі, яка використовується для виробництва вакцини;
- повторне пасажування мікроорганізмів в штучних живильних середовищах призводить до втрати як вірулентності, так і антигенної активності [7].

Тому, культури виробничого штаму *Cl. chauvoei* можна використовувати в межах не більше трьох пасажів на штучних живильних середовищах після виділення їх із патологічного матеріалу, отриманого від зараженої великої рогатої худоби, вівці або морської свинки;

- велика партія замороженого матеріалу (seed-lots) повинна зберігатися за температури -20°C або нижче;
- «seed-lots» повинні надаватися для повного діапазону контрольних випробувань препарату, тобто його ідентичності, безпечності та імуногенності вакцини.

Два типи «seed-lots» повинні бути в наявності для забезпечення виробництва вакцини, а саме – головна або матрова (master-seed) та (work-seed) робоча культура. Ця система гарантує, що впродовж періоду зберігання

фізіологічна активність штаму не зміниться так, як це може статися при постійному культивуванні його на штучних середовищах.

В 2016 році нами проведено дослідження життєздатності, активності та стабільності паспортних характеристик освіженого штаму, що зберігався у глибоко замороженому стані впродовж 11 років (консервант 30% розчин гліцерину) та ліофілізованої культури *Cl. chauvoei* R-15. Проведені дослідження засвідчили, що виробничий штам *Cl. chauvoei* R-15 в обох станах (нативному і культуральному) зберіг свої типові морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні, токсигенні (як біологічну модель використано білих мишей) та вірулентні (як біологічну модель використано морських свинок) властивості.

З метою виконання вимог міжнародних документів щодо гуманного відношення до тварин та впровадження системи «seed-lots» в процес підготовки і виготовлення вакцини проти емкару нами було підготовлено партію master-seed на основі використання культури, виділеної з організму теляти у 2005 році [20, 21]. Робоча культура готується від головної, не менше одного разу на рік. Ці культури використовують для приготування вихідного матеріалу у виробництві вакцини від 6 до 12 місяців. Слід зазначити, що робоча культура не може мати більше, ніж два пасажі від головної, яка має стабільні характеристики, і що вакцину треба формувати з робочої культури без додаткового пасажування.

Стандартизація процесу виробництва вакцини стосується вхідних матеріалів, технологічних процесів і проміжних контролів якості і відповідності до нормативної документації і реєстраційного досьє згідно вимог «Переліку матеріалів реєстраційного досьє та порядком його формування» та міжнародних вимог, визначених документами FAO, Європейською фармакопеею та федеральними нормативними актами уряду США (Code of Federal Regulations, CFR) [22, 23]. На основі цих документів проведено аналіз методів контролю імуногенності вакцини, які показують значні відмінності вимог вітчизняної та міжнародної нормативної документації (табл. 2).

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Виробничий штам *Cl. chauvoei* R-15, після тривалого зберігання (11 років) у нативному стані та у вигляді ліофілізованої культури зберіг типові для виду морфологічні ознаки та культуральні, біохімічні й вірулентні властивості, що свідчить про стабільність показників його активності, і може бути використаним без додаткового пасажування крізь організм чутливої тварин для виготовлення концентрованої гідроксид алюмінієвої вакцини проти емфізематозного карбункулу, як високоефективного вітчизняного імпортозаміщуючого ветеринарного імунобіологічного засобу.

2. Перспектива подальших досліджень полягає у проведенні досліджень молекулярно-генетичної ідентифікації виробничого штаму *Cl. chauvoei* R-15, розробці методів контролю активності вакцини проти емкару з використанням серологічних методів, зокрема ELISA, РНГА, РА тощо та виготовлення стандарту сухої спорової культури *Cl. chauvoei*.

Таблиця 2

Порівняльна таблиця методів випробування імуногенності вакцини проти емфізематозного карбункулу

Країна	Тварини	Кількість тварин у		Вакцинація (доза і спосіб введення вакцини)	Зараження (матеріал і спосіб інфікування тварин)	Ступінь захисту
		досліді	контролі			
Україна *	Морські свинки 400±50 г	10	10	0,4 см ³ ; підшкірно в ділянку черевних м'язів; для ін'єкції використовують суміш вакцини з 10 флаконів по 2-3 см ³ з кожного.	Через 18–20 діб вакцинованих і контрольних тварин заражають внутрішньом'язовою споровою культурою в дозі 20 LD ₅₀ (спорову культуру вводять в суміші з 0,2 см ³ 10% розчину кальцію хлориду) або 1,0 см ³ добової культури штаму <i>Cl. chauvoei R-15</i> підшкірно в ділянці паху.	Серію вакцини вважають придатною для використання, якщо з 10 вакцинованих виживає не менше 8 свинок і загинуть не менше 8 контрольних. У разі виживання меншої кількості вакцинованих морських свинок або загинуть меншої кількості свинок контрольної групи серію вакцини перевіряють порівнюючи з сухим стандартом імуногенності.
ЄС **	Морські свинки	10	5	0,2 см ³ ; вакцину вводять двічі; повторно через 28 діб.	Зараження суспензією спор проводять через 42 доби; спостерігають 5 діб.	10% вакцинованих і всі контрольні гинуть. Якщо гине більше 10 % імунізованих тварин, дослід повторюють.
США ***	Морські свинки	8	8	0,2 см ³ ; вакцинують двічі; повторно через 21–23 доби.	0,5 см ³ (50 LD ₅₀ сухої спорової культури); внутрішньом'язово; спостерігають 72 години.	Всі вакциновані живі; 80% контрольних тварин гине на 3-ю добу.

Примітка: * – нормативна документація на гідроокис алюмінієву формолвакцину проти емфізематозний карбункулу овець на основі вакцинного штаму R-15; ** – Фармакопея 0361; *** – 9 CFR 117.4, 9 CFR 113.106

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко П.К. Епізоотичний процес та специфічна профілактика емфізематозного карбункулу великої рогатої худоби / автореф. дис. на здобуття наукового ступеня док. вет. наук: спец. 16.00.03. – К.: НУБіП, 2009. – 44 с.

2. Human fulminate gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei* / N. Nagano, S. Isomine, H. Kato, Y. Sasaki et all. // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Apr. – 46 (4). – P. 1545–7.
3. Білик Р.І. Вимоги до ветеринарного обслуговування органічних молочних господарств / Р.І. Білик, С.А. Ткачук. // Ветеринарна медицина України. – 2015. – № 3. – С. 29–33.
4. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з емфізематозним карбункулом / Риженко В.П., Вербицький П.І., Горжеєв В.М. та ін. // Державний департамент ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики, 2000. – 11 с.
5. Эмфизематозный карбункул [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://vetvo.ru/emfizematoznyj-karbunkul.html>.
6. European pharmacopoeia 8-th edition. 2005. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://medlib.in.ua/medicina/farmaceuticheskie-nauki/6800.htm>.
7. FAO animal production and health, paper 87. Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines. PART II. Production of backleg Vaccine. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.fao.org/docrep/004/>.
8. Каган Ф.И. Концентрированная вакцина против эмфизематозного карбункула / Ф.И. Каган, А.И. Колесова // Биологические и химиотерапевтические ветеринарные препараты. – М.: Изд-во сельхоз. литературы, 1963. – С. 195–203.
9. Средства лекарственные для ветеринарного применения. Вакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец [Текст] : ГОСТ 32732-2014. – Изд офиц. – Впервые; действ. с 01.07.2015. – М.: Стандартинформ, 2015. – III, 8 с.включ. обл.:табл.; 29 см – (Национальный стандарт РФ)
10. Мікробіологія продуктів харчування і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень [Текст] : ДСТУ ISO 7218:2008. – Вид. офіц. – Вперше; введ. 01.01.2011. – К. : Держспоживстандарт України, 2011. - [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://lindex.net.ua/shop/bibl/500/doc/10055>.
11. Продукти харчові. Готування проб для мікробіологічних аналізів [Текст] : ДСТУ 7963:2015. - Вид. офіц. - Вперше; введ. 2017-01-01. – К. : Держспоживстандарт України, 2017. – III, 14 с. – (Національний стандарт України). [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.csm.kiev.ua/nd/nd.php?b=1&l=9393>.
12. Продукти харчові. Методи культивування мікроорганізмів [Текст] : ДСТУ 8535:2015. - Вид. офіц. - Вперше; введ. 2017-07-01. – К. : Держспоживстандарт України 2017. – III, 14 с. – (Національний стандарт України). [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.csm.kiev.ua/nd/nd.php?b=1&l=10173>.
13. Діагностика емфізематозного карбункулу: Методичні рекомендації для спеціалістів вет. медицини, науковців та студентів / В.О. Бусол, В.П. Риженко, М.С. Мандигра, П.К. Бойко та ін. – Київ: ДДВМ, 2005. – 40 с.
14. Галузевий стандарт України. Препарати ветеринарні. Методи визначення нешкідливості[Текст] : ГСТУ 46.024-2002. - Вид. офіц. - Вперше; введ. 2003-01-01. – К. : Держспоживстандарт України, 2003. – III, 14 с. – (Національний стандарт України). : [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://ua-info.biz/legal/basene/ua-cmelvr.htm>.
15. Препарати ветеринарні. Належна лабораторна практика [Текст] : ДСТУ 7198:2010. – Вид. офіц. – Вперше; введ. 2011-07-01. – К. : Держспоживстандарт України, 2011. – III, 11 с. – (Національний стандарт України).
16. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Належна доклінічна практика [Текст] : ДСТУ 7199:2010. – Вид. офіц. – Вперше; введ. 2011-07-01. – К. : Держспоживстандарт України, 2011. - III, 13 с. – (Національний стандарт України).
17. Препарати ветеринарні. Належна виробнича практика [Текст] : ДСТУ 8164:2015. – Вид. офіц. – Вперше; введ. 2017-01-01. – К. : Держспоживстандарт України, 2017. – III, 107 с. – (Національний стандарт України): [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://document.ua/preparati-veterinarni.-nalezhna-virobnicha-praktika-std27892.html>.

18. Інструкція про порядок депонування в Україні штамів мікроорганізмів з метою здійснення патентної процедури. Затверджено наказом Держпатенту України і національної академії наук України від 26.06.1995 р. № 106/115. // Бібліотека «Закон і бізнес» 22.11.1995 р. №70. – С. 3–21.

19. Закон України Про ветеринарну медицину // Вісті Верховної Ради. – 2012. – №4. – С. 17. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/425-18>.

20. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998; European Convention on the Protection of Pet Animals N 125 of 13 November 1987. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://worldanimal.net/council.html>.

21. Council of Europe (1986b): Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal L*, 358, 18.12.1986, p.1-28, Available from:[Електронний ресурс] Режим доступу: <http://eur-lex.europa.eu>.

22. Перелік матеріалів реєстраційного досьє та порядком його формування», що затверджений наказом Державного комітету ветеринарної медицини України 14.07.2008 №133 та зареєстрований в Міністерстві юстиції України 7 серпня 2008 р. за № 727/15418 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.biocontrol.com.ua/>.

23. Code of Federal Regulations, SAM 200 Supplemental Assay Method Potency Testing Products Containing *Clostridium chauvoei* Antigen 9CFR 113.106. U.S. Government Printing Office, Washington. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.rspca.org.uk/servlet/>.

ПРОВЕРКА ТИПИЧНОСТІ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА CLOSTRIDIUM CHAUVOEI R-15 ПО МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ / Акименко Л.І., Нычик С.А., Бойко П.К., Бойко О.П., Ассори А.Ю.

Приведены результаты анализа международной нормативной базы относительно подготовки штаммов микроорганизмов для внедрения в производство, контроля стабильности их свойств при длительном хранении в соответствии с паспортными характеристиками, с целью изготовления ветеринарных иммунобиологических средств, а также промежуточного и конечного контроля качества готового препарата.

*Показаны самые важные этапы проведения стандартизации основных показателей качества гидроокись алюминиевой формовакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец на примере вакцинного штамма *Cl. chauvoei* R-15, в частности результаты проверки типичности по морфологическим признакам, тинкториальным, культуральным, биохимическим, иммунологическим и вирулентным свойствам.*

Ключевые слова: *Clostridium chauvoei*, эмфизематозный карбункул, стандартизация, качество вакцины.

CHECKING OF THE CLOSTRIDIUM CHAUVOEI R-15 PRODUCTION STRAIN TYPICALITY ACCORDING TO MORPHOPHIZIOLOGICAL PARAMETERS / Akimenko L.I., Nychyk S.A., Boyko P.K., Boyko O.P., Assori A.Ju.

Introduction. *It has been made the analysis of international normative documents base concerning preparation of microorganisms' strains for industrial applying (using as pattern Clostridium chauvoei), storage of them without change of passport descriptions, and control of major properties of species.*

The major standardization stages of the main quality indicators of aluminium hydroxide formol-vaccine against blackleg of cattle and sheep using the strain *Cl. chauvoei* R-15 are shown, in particular, morphological, tinctorial, cultural, biochemical, immunological and virulent features.

The purpose of the work was to: a) evaluate the properties of strain *Cl. chauvoei* R-15, pointed in state documentation base, in compare with international requirements in relation to quality of vaccine; b) define directions of improvement of vaccine preparation.

Materials and methods of researches. As a research material the production strain *Cl. chauvoei* R-15 was used. In the researches we used bacteriological, biological, biochemical methods. We conducted a study of the viability, activity and stability of the passport characteristics of the refreshed strain stored in a deeply frozen state for 11 years (preservative 30% glycerol solution) and lyophilized culture *Cl. chauvoei* R-15. Pathogenicity of productive strain of *Cl. chauvoei* R-15 studied on guinea-pigs (mass 400±50 g) in the dose of 0.5 ml and 4 months calf.

Results of research and discussion. The studies showed that the production strain *Cl. chauvoei* R-15 (native and cultural forms) showed its typical morphological features, tinctorial, cultural, biochemical, toxigenic (as a biomodel white mice were used) and virulent (as a biomodel guinea pigs were used) properties.

After infecting the calf, pathological material (heart, spleen, liver, kidneys, muscles) was collected during the first hour after death for bacteriology to study *Cl. chauvoei* R-15 typicality by morphological signs and biocamical properties.

Conclusions and prospects of further researches. Productive strain *Cl. chauvoei* R-15 after either passage through the live organism or storage lyophilized had saved typical and stable morphology feathers, tinctorial, physiology and pathology properties and can make use without additional passage through the organism of susceptible animals for production of concentrated hydroxide aluminum formolvaccine against blackleg as the effective veterinary immunobiological preparation.

Keywords: *Clostridium chauvoei*, blackleg, standardization, quality of vaccines.

REFERENCES

1. Bojko, P. K. (2009). Epizootichnij proces ta specifichna profilaktika emfizematoznogo karbunkulu veliko rogatoi chudobi [Epizootic process and specific prophylaxis to the blackleg of cattle]. *Extended abstract of candidate thesis*, Kyiv [in Ukrainian].
2. Nagano, N., Isomine, S., Kato, H. and Sasaki, Y. et al. (2008). Human fulminate gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei*. *Journal of Clinical Microbiology* Apr., 46 (4), 1545-1547.
3. Bilyk, R.I. & Tkachuk, S.A. (2015). *Vimogi do veterinarnogo obslugovuvannja organichnih molochnih gospodarstv* [Requirements to veterinary maintenance of organic dairying]. *Veterinarna medycyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 3, 29–33 [in Ukrainian].
4. Rizhenko V. P., Verbickij P. I., Gorzheev V. M. ta in. (2000). Instrukcija pro zahodi z profilaktyki ta borotby z emfizematozным karbunkulom [Instruction on measures concerning a prophylaxis and fight against gangraena emphysematosa]. Derzhavnij departament veterinarnoi medycyni Ministerstva agrarnoi polityky – State department of veterinary medicine of Ministry of agrarian policy, 11 [in Ukrainian].
5. Emfizematoznyj karbunkul – The blackleg. *vetvo.ru*. Retrieved from <http://vetvo.ru/emfizematoznyj-karbunkul.html>.
6. European pharmacopoeia 8-th edition. (2005). *medlib.in.ua*. Retrieved from <http://medlib.in.ua/medicina/farmaceuticheskie-nauki/6800.htm>.
7. FAO animal production and health paper 87. Manual for the production of anthrax and blackleg vaccines. PART II. Production of blackleg Vaccine. *www.fao.org*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/004/>.
8. Kagan, F.I. & Kolesova, A.I. (1963). *Biologicheskie i chemioterapevticheskie veterinarnye preparaty* [Biological and chemotherapeutic veterinary preparations]. M.: Izd-vo selchoz. Literatury [in Russian].

9. Sredstva lekarstvennye dlja veterinarnogo primenenija. Vakcina protiv emfizematoznogo karbunkula krupnogo rogatogo skota i ovec [Medicine remedies for veterinary use. Vaccine against blackleg of cattle and seeps. Specifications]. *GOST 32732-2014* from 01.07.2015. M.: Standartinform [in Russian].
10. Mikrobiologija produktiv charchuvania i kormiv dlja tvarin. Zagal'ny nastanovy shcodo mikrobiologichnyh doslidzhen' [Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations]. (2008). DSTU ISO 7218:2008 from 01.01.2011. K.: Derzhspozhyvstandart Ukraini [in Ukrainian].
11. Produkty chartchovi. Gotuvannja prob dlja mikrobiologichnyh analiziv [Foods. Preparation of tests for microbiological analyses]. (2015). DSTU 7963:2015 from 01.01.2017. K.: Derzhspozhyvstandart Ukraini [in Ukrainian].
12. Produkty charchovi. Metody kultivuvannja mikroorganizmiv [Foods. Methods of cultivation of microorganisms]. (2015). DSTU 8535:2015 from 01.01.2017. K.: Derzhspozhyvstandart Ukraini [in Ukrainian].
13. Busol, V. O., Rizhenko, V. P., Mandigra, M. S., Bojko, P. K. et al. (2005). Diagnostika emfizematoznogo karbunkulu: Metodichni rekomendacii dlja specialistiv vet. medicini, naukovciv ta studentiv [Diagnostics to the blackleg. Methodical recommendations for the specialists of veterinary medicine, research workers and students]. Kyiv: Derzhavnij departament veterinarnoi medycyny Ministerstva agrarnoi polityky [in Ukrainian].
14. Galuzevyj standart Ukraini. Preparaty veterinarni. Metody viznachennia neshkidlivosti .[Industry standard of Ukraine. Veterinary preparations. Methods of determination of harmlessness]. (2002). GSTU 46.024-2002 from 01.01.2003. K.: Derzhspozhyvstandart Ukraini [in Ukrainian].
15. Preparaty veterinarni. Nalezna laboratorna praktika [Veterinarian preparations. Good laboratory practice].(2011). DSTU 7198:2010 from 01.07.2011. K.: Derzhspozhyvstandart Ukrayini [in Ukrainian].
16. Preparaty veterinarni imunobiologichni. Nalezna doklinichna praktika [Veterinary immunobiological preparations. Good preclinical practice]. (2011). DSTU 7199:2010 from 01.07.2011. K.: Derzhspozhyvstandart Ukraini [in Ukrainian].
17. Preparati veterinarni. Nalezna virobniha praktika [Veterinary preparations. Good manufacture practice]. (2015). DSTU 8164:2015 from 01.01.2017. K.: Derzhspozhyvstandart Ukrayini [in Ukrainian].
18. Instrukcija pro porjadok deponuvannja v Ukraini shtamiv mikroorganizmiv z metoju zdijnsenja patentnoi procedury. Zatverdzheno nakazom Derzhpatentu Ukraini i nacional'noi akademii nauk Ukraini vid 26.06.1995 r. № 106/115. (1995) [Instruction about the order of depositing in Ukraine of microorganisms strains with the purpose of realization of patent procedure. It is ratified by national Patent of Ukraine and national academy of sciences of Ukraine from 26.06.1995 r. № 106/115. (1995)]. *Biblioteka "Zakon i biznes" – The library "Law and business"*,70, 3-21 [in Ukrainian].
19. Zakon Ukrainy pro veterinarnu medicinu (2012). [The law of Ukraine on veterinary medicine]. *Sait of the Visti Verhovnoi Rady – Site of the News of Verchovna Rada*, 4, 17. Retrieved from <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/425-18>.
20. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998; European Convention on the Protection of Pet Animals N 125 of 13 November 1987. Retrieved from <http://worldanimal.net/council.html>.
21. Council of Europe (1986 b): Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal L* 358, 18.12.1986, 1-28, Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu>.
22. Perelik materialiv reestracijnogo dos'e ta porjadok jogo formuvannja, shctso zatverdzenij nakazom Derzhavnogo komitetu veterinarnoi medycyny Ukraini 14.07.2008 №133.

The list of materials of the registration dossier and the formation approved by the state Committee of veterinary medicine. Retrieved from <http://www.biocontrol.com.ua/>.

23. Code of Federal Regulations, SAM 200 Supplemental Assay Method Potency Testing Products Containing Clostridium chauvoei Antigen 9CFR 113.106. U.S. Government Printing Office, Washington. Retrieved from <http://www.rspca.org.uk/servlet/>.

УДК: 639:615.9:636.085

ВАСЯНОВИЧ О.М., канд. с.-г. наук, ст.наук. сп., e-mail:myco-ivm@rambler.ru,

РУДА М.Є., канд. вет. наук, ст.наук. сп., e-mail:rudayamargo@gmail.com,

ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail:juliajangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

ВСТАНОВЛЕННЯ ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ МІКРОМІЦЕТІВ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХ ЗДАТНОСТІ ПРОДУКУВАТИ ФУЗАРІОТОКСИНИ

Проведено мікотоксикологічні дослідження 35 зразків зернових та комбінованих кормів, з яких ізольовано та ідентифіковано до виду 78 штамів мікроміцетів. Встановлено, що найбільш розповсюдженими були гриби роду Fusarium – 26,9 % від загальної кількості досліджених проб, Penicillium – 18,0, Aspergillus – 20,5 %. Дослідженнями на тест-об'єкті Tetrachitena pyriformis встановлено токсичну дію у 40 штамів із 78 досліджених. В результаті вивчення токсигенного потенціалу найбільш розповсюджених мікроміцетів грибів роду Fusarium було виділено 7 продуцентів Т-2 токсину, 9 продуцентів – зеараленону та 11 – фумонізинів від 27 досліджених токсичних штамів.

***Ключові слова:** мікроміцети, зерно, мікологічні дослідження, фузаріотоксини, фумонізину.*

Вступ. Серед багатьох токсичних факторів зовнішнього середовища все більше уваги привертають саме метаболіти плісневих грибів – мікотоксини. Вже давно встановлено понад 150 видів плісневих грибів, які продукують майже 300 мікотоксинів різних за своїми токсичними властивостями та хімічною будовою.

Лише трихотеценових мікотоксинів виділено та вивчено понад 45. Вони є природними контамінантами кормів та продуктів харчування. Серед них особливо високою токсичністю та частотою виявлення виділяється Т-2 токсин, який є головним етіологічним фактором фузаріотоксикозів сільськогосподарських тварин [1, 2]. Фузаріотоксикоз періодично реєструють як в нашій країні так і за кордоном. Він протікає гостро, підгостро, хронічно, призводить до загибелі тварин, зниження їх продуктивності, імунної відповіді.

Ще один із мікотоксинів, який останніми роками внаслідок глобального потепління набув широкого розповсюдження в країнах ЄС та СНГ – фумонізин В₁. Цей мікотоксин викликає лейкоенцефаломаліацію у коней або набряк легень у свиней. Фумонізин В₁ є токсичним як для печінки, нирок, так і для серцево-судинної системи усіх видів тварин, викликає патологію мітозу в уражених

* Аспірант, науковий керівник – канд. с.-г. наук **Васянович О.М.**