

## EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITION «HUMILID» ON HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD OF PIGLETS

Salyga O.M., Buchko O.M., Maksymovych I.Ya., Svarchevska O.Z.

Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv

Data concerning the effect of biologically active addition "Humilid" on hematological indices and phagocytic activity of neutrophils of piglets in the period before and after weaning from their sows are presented in the article. It was established a positive effect of "Humilid" on the total number of leukocytes and phagocytic activity of neutrophils of studied animals.

УДК 636.09:616.98:615.371:[57.063.8:579.852.1]

ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ЗРАЗКІВ ВАКЦИНИ ПРОТИ СИБІРКИ ТВАРИН ІЗ ШТАМУ *BACILLUS ANTHRACIS STERNE 34F2*Ушкалов В.О.<sup>1</sup>, Мачуський О.В.<sup>1</sup>, Романько М.Є.<sup>2</sup>, Грузіна Т.Г.<sup>1</sup>, Рєзніченко Л.С.<sup>1</sup><sup>1</sup>Державний науково-контрольний інститут біотехнології штамів і мікроорганізмів, м. Київ<sup>2</sup>Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Сибірка – унікальне захворювання тварин і людини, раз виникнувши на певній місцевості, вона може вкорінитися, зберігаючи загрозу виникнення спалахів на багато десятиріч [1]. У питанні профілактики цього небезпечного антропозоозного захворювання провідне місце посідає вакцинопрофілактика. Одним з основних заходів щодо профілактики сибірки в світі є щеплення тварин вакциною проти даного захворювання. З цією метою, згідно даних МЕБ, у світі найбільш широко використовуються живі вакцини зі штамів мікроорганізмів, що втратили здатність до капсулоутворення [2]. У країнах СНД користувалися та користуються попитом у біотехнологічній галузі безкапсульні штами сибірки такі як: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* 55-ВНІІВВuM, *Bacillus anthracis* СБ та *Bacillus anthracis* К-79Z.

За даними МЕБ у світі (окрім країн СНД) успішно використовується вакцина, розроблена Максом Стерне в 1937 році, яка представляє собою суспензійну завись спор безкапсульного штаму мікроорганізму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 [2].

Свого часу нами було отримано вакцинний штам *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 з Колорадської Компанії Сироваток, США (Colorado Serum Company, USA), вивчено деякі його біологічні властивості [3] та проведено процедуру депонування в Національному центрі штамів мікроорганізмів.

Було проведено підбір поживних середовищ для накопичення біомаси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, отримані результати свідчать, що використання наночастинок золота у складі поживних середовищ, дозволяє отримувати в 100 і більше раз вищі урожаї вакцинного штаму з одиниці об'єма поживного середовища.

**Мета досліджень.** Виготовлення лабораторних зразків вакцини проти сибірки зі штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 (з використанням нанозолота у її складі) та визначення її імуногенності.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували штами з колекції Національного центру штамів ДНКІБШМ – вакцинний штам *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, та контрольний – *Bacillus anthracis* M-71 (1 мінімальна летальна доза (млд) – 17 000 спор).

За результатами попередніх досліджень нами було встановлено, що найоптимальнішими загально доступними середовищами для накопичення бактеріальної маси сибірки є поживні середовища з вмістом амінного азоту 100-120 мг, % та pH=7,4±0,2. Отже, для виготовлення лабораторних зразків нами було використано агар Хоттінгера 1,5±0,2 % агар-агару та бульйон Хоттінгера з вище вказаними показниками.

Лабораторні зразки вакцини проти сибірки тварин зі штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 виготовляли в умовах Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) у декілька етапів. Першим етапом було виготовлення матрової розплідки збудника сибірки та перевірка її на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005. Виготовлення матрової розплідки проводили в рідкому поживному середовищі бульйон Хоттінгера за температури 37,0±1,0 °C протягом 20-24 год.

Другим етапом було накопичення бактеріальної маси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, у випадку з рідким середовищем – її концентрація та перевірка на відсутність контамінації.

Накопичення бактеріальної маси на щільному поживному середовищі агар Хоттінгера проводили шляхом інкубації в термостаті за температури 37,0±1,0°C протягом 4-ох діб. Отриману бакмасу змивали зі щільного середовища стерильним фосфатно-буферним розчином, визначали концентрацію колоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см<sup>3</sup> і перевіряли на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005.

В рідкому поживному середовищі накопичення бакмаси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 проводили шляхом інкубації в термостаті за температури 37,0±1,0°C протягом 4-ох діб. У подальшому, з метою концентрації бакмаси, дане середовище центрифугували за 3000 об/хв протягом 30 хв. В отриманій бакмасі визначали КУО в 1 см<sup>3</sup> і перевіряли на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою.

Наступним, третім, етапом було формування лабораторних мікросерій зразків вакцин з концентрацією 12 млн спор в 1 см<sup>3</sup>. В якості консерванту використовували 30 % розчин гліцерину на фосфатно-буферному розчині.

Після дослідження даних серій та отримання результатів, нами було виготовлено дві лабораторні мікросерії вакцин з нанозолотом та без його додавання до щільного поживного середовища агару Хоттінгера.

Отримання матрової розплідки, накопичення бакмаси та формування мікросерій зразків вакцини проводили за вище описаними схемами. Але у другому варіанті вакцини, при формуванні мікросерії вакцинного препарату додавали наночастинок золота середнього розміру (19,0±0,9) нм у кінцевій концентрації 19±2 мкг/мл.

Наночастинок золота одержували конденсаційним методом шляхом відновлення калію аурату ацетоном за Девісом. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота H[AuCl<sub>4</sub>]-4H<sub>2</sub>O, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію.

Розмір отриманих наночастинок обчислювали, використовуючи метод лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) [4]. У випадку монодисперсних систем метод ЛКС дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок, а також обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо сферичності цих частинок.

Визначення імуногенності зразків вакцин проводили на морських свинках у п'яти повторах. Для кожного дослідження використовували 3 групи тварин по 10 голів у кожній групі, раніше не щеплених проти сибірки.

В першому досліді тваринам групи № 1 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор (1 см<sup>3</sup>) вакцини проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, виготовленої на щільному поживному середовищі. Тваринам групи № 2 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор вакцини проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, виготовленої в рідкому поживному середовищі. Тварини групи № 3 були контрольними, їм вводили підшкірно в області черева 1 см<sup>3</sup> стерильного фізіологічного розчину натрію хлориду.

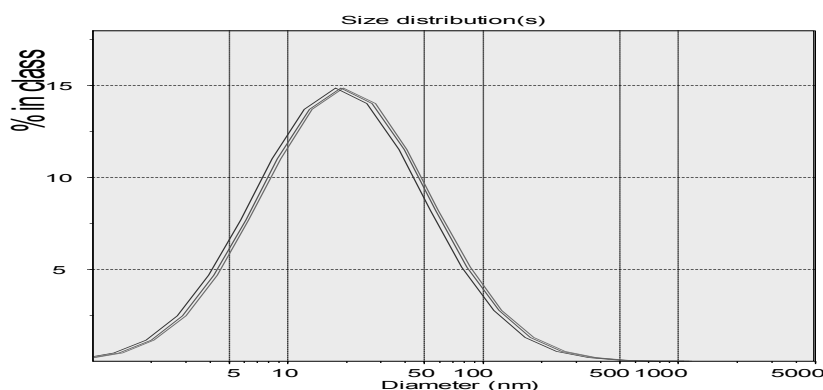


Рис. 1 Розмір наночастинок золота,  $19,0 \pm 0,9$  нм (за даними ЛКС).

Спостереження за щепленими тваринами проводили протягом 21 доби, після чого щепленим тваринам вводили по 100 млд контрольного штаму *Bacillus anthracis* M-71 підшкірно в області черева, а тваринам контрольної групи контрольний штам вводили в дозі 10 млд. Спостереження за зараженими тваринами проводили протягом 10 діб, обліковуючи випадки загибелі тварин.

У другому досліді тваринам групи № 1 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор ( $1 \text{ см}^3$ ) вакцини із штаму *Sterne 34F2* з наночастками золота. Тваринам групи № 2 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор вакцини проти сибірки тварин із штаму *Sterne 34F2* без наночастинок золота. Тварини групи № 3 були контрольними, їм вводили підшкірно в області черева  $1 \text{ см}^3$  стерильного фізіологічного розчину натрію хлориду. Спостереження за тваринами проводили протягом 21 доби. Через 21 добу тваринам дослідних груп вводили по 100 млд контрольного штаму *Bacillus anthracis* M-71 підшкірно в області черева. Тваринам контрольної групи вводили по 10 млд контрольного штаму підшкірно в області черева. Спостереження за тваринами після зараження проводили протягом 10 діб, обліковуючи випадки загибелі тварин. Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «Excel 2007».

**Результати досліджень.** Зведені результатами першого досліді відображені в таблиці 1. Отримані дані свідчать про те, що за показником «імуногенність» виготовлені зразки вакцини відповідали вимогам міжнародних нормативних документів до протисибіркових вакцин. Проте необхідно відзначити, що зразки вакцини, отриманої на щільному поживному середовищі, достовірно переважали за рівнем імуногенності (на 12 %) препарат, отриманий при використанні рідкого поживного середовища.

Таблиця 1 – Імуногенна активність лабораторних зразків вакцини із штаму *Sterne 34F2* ( $n=10$ ;  $M \pm m$ )

№ n/n	Група №1 (щільне поживне середовище), % захисту	Група №2 (рідке поживне середовище), % захисту	Група №3 (контроль), % захисту
1.	100	80	0
2.	90	80	0
3.	100	90	0
4.	100	80	0
5.	90	90	0
$M \pm m$	$96,0 \pm 0,6$	$84,0 \pm 0,6$	0

Тобто, в лабораторних експериментах показано, що зразки вакцини проти сибірки із штаму *Sterne 34F2* були не шкідливими для лабораторних тварин, введення препарату не викликало побічних місцевих або загальних реакцій; крім того, отримані дані свідчать про те, що за допомогою певних технологічних прийомів можливо отримати різні за ґатунком зразки препарату (за показником імуногенності), що суттєво при промисловому способі виготовлення вакцини.

У таблиці 2 представлені результати другого експерименту, в якому було проведено порівняльне визначення лабораторних зразків вакцини, виготовленої шляхом накопичення біомаси вакцинного штаму на щільному поживному середовищі за класичним (фармакопейним) способом та зразку вакцини, складу якої було введено наночастинки золота. Одержані дані свідчать про вищу на 12 % імуногенну активність вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* *Sterne 34F2* з вмістом у складі наночастинок золота в порівнянні з препаратом-прототипом. Проте аналіз отриманих результатів дає підстави для більш детального вивчення показників, що характеризують рівень імуногенності різних за складом зразків вакцин. Так у подальшому нами заплановані експерименти, кінцевою метою яких буде визначення мінімальної імунізуючої дози вакцини ( $\text{ІМД}_{50}$ ). Ці дані дадуть більш повну характеристику за імуногенністю зразків вакцини проти сибірки.

Таблиця 2 – Імуногенна активність лабораторних зразків вакцини із штаму *Sterne 34F2* з нанозолотом та без його додавання ( $n=10$ ;  $M \pm m$ )

№ n/n	Група №1 (вакцина з нанозолотом), % захисту	Група №2 (вакцина без нанозолота), % захисту	Група №3 (контроль), % захисту
1.	100	100	0
2.	90	90	0
3.	100	100	0
4.	100	100	0
5.	100	90	0
$M \pm m$	$98,0 \pm 0,4$	$96,0 \pm 0,6$	0

Таким чином, у результаті проведених експериментів встановлено, що імуногенність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* *Sterne 34F2*, виготовлених на щільному поживному середовищі агар Хоттінгера вища,

ніж імуногенна активність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, виготовлених в рідкому поживному середовищі бульйон Хоттінгера на 12 %, а імуногенність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, виготовлених на щільному середовищі, з додаванням наночастинок золота вища на 2 %, ніж імуногенна активність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 без додавання наночастинок золота. Тобто, технологічними прийомами можливо суттєво підвищити рівень імуногенності вакцини проти сибірки (в наших експериментах на 14 %).

Отже, отримані результати свідчать про нешкідливість вакцинного препарату із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, а також вакцини зі штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 що вміщує наночастинок золота, та дають підстави для поглибленого, вивчення дії зразків вакцини на організм щеплених тварин.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** 1. Результати лабораторних випробувань зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 свідчать про те, що розроблений препарат є імуногенним і відповідає за даним показником вимогам міжнародних стандартів.

2. Зразки вакцини, отриманої на щільному поживному середовищі, показали вищі показники імуногенності на 12 %, ніж зразки, отримані при використанні рідкого поживного середовища.

3. У результаті проведених експериментів встановлено, що захист лабораторних тварин після введення зразків вакцини, виготовлених на щільному середовищі, з додаванням наночастинок золота складає 98 %, тоді як при введенні зразків вакцини, виготовлених на рідкому поживному середовищі без додавання наночастинок золота – 84 %.

Отримані результати дають підстави для проведення подальших досліджень стосовно використання наночастинок металів з метою підвищення рівня імуногенності вакцинних препаратів.

Наступним кроком у вивченні даного питання будуть дослідження дії вище згаданих вакцинних препаратів на організм різних видів тварин, що включатимуть концентраційно-дозовий діапазон, регламент застосування та ширший перелік показників їх біологічного впливу.

#### Список літератури

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни [Текст] / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селивостров // Владимир. – Посад, 2001. – 282 с.
2. World organization for animal health "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)" [Текст] / OIE fifth edition volume 1, 2004.
3. Мачуський, О.В. Результати вивчення деяких біологічних властивостей штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 [Текст] / О.В. Мачуський, В.О. Ушкалов // Ветеринарна біотехнологія / IBM УААН, ДНКІБШМ. – 2009. – Бюл. №15. – С. 247-252.
4. Дибкова, С.М. Оцінка *in vivo* ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок золота різного розміру [Текст] / С.М. Дибкова, Л.С. Резниченко, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг // Біотехнологія. – 2010. – Том №3, № 3 – С. 66-70.

#### STUDY OF LABORATORY SAMPLES OF ANTHRAX VACCINE, WHICH WERE MADE FROM BACILLUS ANTHRACIS STERNE 34F2

Ushkalov V.O., Machutsky O.V., Gruzina T.G., Reznichenko L.S.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv,

Roman'ko M.Ye.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

There were studied the immunogenesity of different variants of anthrax spore vaccine, which were made in liquid and agar medias. Also we are determined the difference between anthrax spore vaccine with nanoparticles of gold and without it.

УДК 619:591.8:616-097.3:578.832.1

#### ВИВЧЕННЯ МУКОЗАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ КУРЧАТ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕННЯ ВІРУСОМ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ

Шутченко П.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків,

На сьогодні птахофермам завдано значної економічної шкоди вірусними та бактеріальними захворюваннями такими як пташиний грип, мікоплазмоз, інфекційний ларинготрахеїт, інфекційний бронхіт курей, хвороба Ньюкасла та інші [4]. Ці хвороби відносяться до мукозальних захворювань, у зв'язку з чим, разом з клітинним і гуморальним імунітетом, необхідно вивчати мукозальний (локальний), імунітет слизових оболонок органів дихання, шлунково-кишкового тракту, кон'юнктиво-асоційованої лімфоїдної тканини. Слизова оболонка через її топографічні позиції є першою на шляху ураження патогенами і взаємодіє з екзогенними антигенами [1]. Вона містить комплекс факторів неспецифічного і специфічного імунного захисту, що в більшості випадків забезпечує надійний бар'єр від проникнення патогенів. Імунітет слизової оболонки являє собою складну систему, який включає структуровані і лімфоїдні тканини, епітеліальні клітини, дендритні клітини, макрофаги, нейтрофіли [3]. Вивчення мукозального імунітету привертає особливу увагу дослідників в усьому світі. З цієї метою застосовують найсучасніші методи гістохімії та імуногістохімії, засновані на імуноферментному виявленні імунних клітин і антигенів збудників з використанням антивидових сироваток у зрізах тканин [2]. Застосування імуногістохімічних методів дозволяє вивчити динаміку імунної відповіді у домашньої птиці і тварин на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів і макрофагів та М-клітин (мембранних клітин) шлунково-кишкового тракту.

**Матеріали і методи.** У досліді використовували 2 групи птиці: 1 – курчата, інфіковані вірусом низькопатогенного грипу птиці А/крижень/Україна/2007 (35 голів) та 2 – контрольні, інтактні курчата (35 голів). Від курчат на 1-у, 3-ю, 5-у, 7-у, 10-у, 14-у та 21-у добу відібрано зразки внутрішніх органів – сліпа кишка, трахея і легені. Матеріал фіксували у рідкому азоті. Проведено виготовлення гістологічних препаратів із застосуванням кріостату, фарбування зрізів імуногістохімічним методом із застосуванням міченого стрептавідин-біотину.

З метою імуногістохімічних досліджень вивчення формування імунної відповіді курчат були застосовані моноклональні антитіла до субпопуляцій імунокомпетентних клітин: CD4, CD8, IgM, IgG, IgA, макрофагів та М-клітин.