

4. Зорин, В.Л., Краткие ветеринарные консультации [Текст]/ В.Л. Зорин, А.И. Зорина – М.: Аквариум ЛТД, 1999. – С. 9-20. 5. Инфекционные болезни животных [Текст]: справочник/ Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кириллов; Под общ. ред. Д.Ф. Осидзе. – М.: Агропромиздат, 1987. – 288 с. 6. Игнатов, П. Очерки об инфекционных болезнях собак [Текст]/ П. Игнатов. – М.: Мир, 1995. – С. 48-59. 7. Лабораторные исследования в ветеринарии [Текст]/ Под ред. В.Я. Антонова и П.Н. Блинова. – М.: Колос, 1974. – 320 с. 8. Максимов, Н.А. Клинические признаки и результаты бактериологических исследований при пиодерматитах собак [Текст]/ Н.А. Максимов, С.И. Лебедько, А.И. Албулов, С.М. Шинкарев//11-ый Моск.международ.вет.конгресс: Мат-лы (17-19.04.03 г., М.). – М., 2003. – С. 14-15. 9. Медицинская микробиология [Текст]/ Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: Гэотар медицина, 1999. – 1200 с. 10. Ниманд, Х.Г. Болезни собак [Текст]: Пер. с нем./Х.Г. Ниманд, П.Б. Сутер. – М.: Аквариум ЛТД, 2001. – С. 271-284. 11. Патерсон, С. Кожные болезни собак [Текст]: пер.с англ./ Под ред. Е. Осипова. – М.: Аквариум, 2003. – 176 с. 12. Тамошкин, Д.А., Антибиотикотерапия в ветеринарии [Текст]/ Д.А. Тамошкин, В.В. Сотников, М.В. Сотников// I-а міжнар. Нук.-прак. конф. з проблем дрібних тварин: Мат-ли (29-31.05.02 р., Одеса). – Одеса, 2002. – С. 157-162.

## DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF MONO-AND POLYVALENT STAPHYLOCOCCUS ANATOXINS

**Keleberda N.I., Obuhovsky J.M., Obuhovska O.V.**

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

*4-stages scheme of development of mono-and polyvalent Staphylococcus anatoxins from the museum's cultural Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus intermedia was developed.*

*3 experimental series of Staphylococcus anatoxins were prepared. Its preparations in course of double using, protect 100 % of the experimental animals from disaster, and provide from 85 to 95 % protection from infection with the relevant Staphylococcus culture.*

УДК 619 616.98:578.825.1

## РЕПРОДУКЦІЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ У ГЕТЕРОЛОГІЧНІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА ОТРИМАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

**Кривошия П. Ю., Мандигра М. С., Кот Л. Б.**

*Інститут епізоотології НААН, м. Рівне*

Інфекційні захворювання завжди домінували серед патологій коней. Останніми роками в країнах світу, в тому числі розвинутих, інфекції посідають одне з перших місць серед усіх захворювань. В Україні практично третина коней з року в рік хворіє. Проте це лише деяка частина захворюлих тварин, оскільки багато інфекцій не розпізнаються, інші не обліковуються як інфекційні захворювання.

Інфекційна анемія (ІНАН) коней посідає одне з перших місць щодо розповсюдження серед цих хвороб. Основна перепона у вивченні ІНАН – складність виділення збудника в культурі клітин.

Першими про вирощування вірусу інфекційної анемії в клітинній культурі повідомили японські дослідники Кобаясі та Коно [4]. Вірус розмножувався в клітинах кісткового мозку та лейкоцитах периферичної крові коней, зумовлюючи цитопатичні зміни. Однак культивування лейкоцитів і клітин кісткового мозку є досить трудомістким процесом, причому ще існує загроза контамінації герпес вірусом. Лише через досить тривалий період, шляхом довготривалих пасажувань почали вирощувати вірус на первинних культурах клітин ембріона коня та перещеплюваних лініях [1, 2, 3]. Вірус розмножувався у клітинах, не викликаючи цитопатичної дії, але накопичувався в культуральній рідині.

У зв'язку з тим, що вірус розмножувався на культурі без видимих морфологічних змін клітин, його індикація можлива була лише при використанні таких реакцій, як дифузна преципітація (РДП) та реакція зв'язування комплементу (РЗК). Для проведення РДП необхідне використання досить концентрованого антигену, а РЗК – трудомістка, вимагає відповідних очисток антигену та досліджуваних сироваток, численних титрацій, добору оптимальних доз, що ускладнює стандартизацію отриманих результатів.

На теренах СНД діагностиком для ІНАН коней виробляє Щолківський біокомбінат (Росія). Групоспецифічний антиген для діагностичного набору з використанням у реакції дифузної преципітації (РДП) отримують із селезінки хворих на інфекційну анемію коней. Тканинний селезінковий антиген вірусу ІНАН – високоспецифічний діагностиком, однак для його виробництва потрібна спеціальна база для утримання великої кількості коней, що призводить до значних матеріальних затрат та зниження стандартності препарату внаслідок різної та неоднорідної сировини. З огляду на це, все більшого значення набуває пошук інших можливостей для отримання культурального антигену вірусу ІНАН. Відсутність компонентів діагностики ІНАН коней в Україні обумовила необхідність таких досліджень.

**Мета роботи.** Метою нашої роботи є виділення та серійне пасажування різних штамів вірусу ІНАН в гетерологічній культурі клітин і використання отриманого вірусного антигену для серологічної діагностики в реакції нейтралізації.

**Матеріали та методи.** Віруси: польовий штам К-1, виділений від хворого коня на інфекційну анемію, виробничий штам «3-ВІСВ-К», культивовані на культурі клітин шкіри та нирки ембріона коня в підтримуючому середовищі, до складу якого входило 49 % Ігла, 49 % 199 та 2 % сироватки великої рогатої худоби при рН 7,6. Інфекційну активність вірусів після їх адаптації до первинної та субкультури клітин курячих ембріонів визначали за цитопатичною дією на даній культурі.

Наявність вірусу в культуральній рідині визначали в реакції нейтралізації та реакції дифузної преципітації, які проводили за загальноприйнятими методами. Як позитивний контроль використовували набір антигену та антисироватки для діагностики ІНАН у РДП виробництва Щолківського біокомбінату.

**Результати досліджень.** Для адаптації вірусу ІНАН до культур гетерологічного походження нами проводилося інфікування вірусом ІНАН як гомологічних первинних культур (нирки та шкіри коня), так і гетерологічних (первинні культури клітин ембріона курчати та перещеплювана культура трахеї теляти). Періодичними пасажами різних штамів ІНАН нами були виділені штами, які при пасажуванні викликали прояв цитопатичної дії на культурі клітин гетерологічного походження. Прояв цитопатичної дії залежно від пасажу вірусу на перещеплюваній культурі трахеї теляти наведено в таблиці 1.

Так, при пасажуванні вірусного матеріалу на первинній культурі клітин курячого ембріона проходила адаптація вірусу до даної культури. Це підтверджується наростанням ураження вірусом клітин моношару із збільшенням кількості пасажів, що проявляється в цитопатичній його дії на культуру клітин та зменшенням періоду для повної деструкції моношару. Розмноження вірусу після першого пасажу супроводжувалось округленням клітин. Так, в 3-му пасажі часткова деструкція (25 %) моношару

#### Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

була встановлена на 13-ий день інкубації, а в 7-му пасажі вже на дев'ятий день після інфікування клітин, а з 6-го пасажу, вірусна репродукція проявилася повною деградацією клітин моношару. Отже, шляхом серійних пасажувань на гетерологічній культурі клітин нами отримано вірусний культуральний антиген.

**Таблиця 1** – Динаміка прояву ЦПД вірусу ІНАН на первинній культурі клітин курячого ембріона (КЕК).

Кількість пасажів на культурі (КЕК)	Дні спостереження												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Процентний відсоток уражених клітин моношару												
1	-	-	-	-	-	0	0	-	-	0	-	0	-
3	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	25
4	-	-	0	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-
7	-	-	50	-	80	-	-	-	100	-	-	-	-

**Примітка:** “-” спостереження не проводились.

Наявність антигену збудника інфекційної анемії коней у культурах клітин визначали в реакції нейтралізації, де контролем слугувала позитивна сироватка з діагностичного набору для визначення антитіл до вірусу ІНАН в сироватці крові коней в реакції дифузної преципітації.

Для проведення реакції нейтралізації з метою виявлення антитіл до вірусу інфекційної анемії були відібрані вірус-зливи з титром активності вірусу від  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$  ТЦД<sub>50</sub>/0,1мл. Постановка реакції нейтралізації для виявлення антитіл у сироватці крові коней до вірусу ІНАН проводилась при використанні дози вірусу в 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1мл., при різних розведеннях сироваток, що досліджувалися.

Так, для проведення реакції використовували культуральний вірус інфекційної анемії коней штаму «3-BIEB-K», специфічну позитивну сироватку з набору діагностиків для виявлення антитіл у сироватці крові коней в реакції дифузної преципітації, яка виробляється Щолківським біокомбінатом. Досліджувані позитивні сироватки коней з господарств Рівненської області, негативні сироватки, культуру клітин КЕК, поживні середовища 199, Ігла, нормальну сироватку крові великої рогатої худоби.

Титр сироватки в реакції нейтралізації вважали її найбільше розведення, при якому проходила нейтралізація вірусу ІНАН. Результати досліджень наведені в таблиці 2. З даних таблиці видно, що імунна сироватка ІНАН з діагностичного набору Щолківського біокомбінату та імунна сироватка від коня №15 одного з господарств Острозького району Рівненської області, яка дала позитивну реакцію в РДП-тесті на інфекційну анемію, містять антитіла, які нейтралізують вірус. Титр імунних сироваток коней становив відповідно 1:40 та 1:20. У сироватці від коня №9, яка в попередніх дослідженнях була негативна в РДП-тесті на інфекційну анемію, не встановлено антитіл у реакції нейтралізації. При дослідженні імунної сироватки кроля до вірусу ринопневмонії (штам СВ-69) та імунної сироватки до ринотрахеїту ВРХ не було встановлено в проведених нами дослідженнях антитіл до штаму «3-BIEB-K» вірусу інфекційної анемії.

**Таблиця 2** – Результати нейтралізації штаму «3-BIEB-K» вірусу інфекційної анемії досліджуваними сироватками

№ п/п	Сироватки крові	Розведення сироватки					
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
1.	Імунна сироватка ІНАН з діагностичного набору	-	-	-	+	+	+
		-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	+	+
		-	-	-	-	+	+
2.	Сироватка від коня №15 з господарства Острозького району позитивна в РДП	-	-	+	+	+	+
		-	-	+	+	+	+
		-	-	-	+	+	+
		-	-	-	-	-	-
3.	Сироватка від коня №9 з господарства Острозького району негативна в РДП	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
4.	Імунна сироватка кроля до штаму ринопневмонії коня (СВ-69)	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
5.	Імунна сироватка ІРТ ВРХ	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-

**Примітка:** +- ЦПД; - ознаки ЦПД відсутні

Отже робоче розведення вірусу, який містить  $100\text{TCID}_{50}/0,1\text{мл}$ , на адаптованій культурі клітин, не нейтралізувала жодна з імунних сироваток до інших захворювань, а також сироватка коней, яка була негативна в РДП-тесті на інфекційну анемію, крім сироваток імунних до даного вірусу, що підтверджує специфічність культивованого збудника на гетерологічній культурі клітин.

#### Висновки.

1. Адаптовано вірус інфекційної анемії до гетерологічних культур шляхом довготривалого пасажування на первинних та перещеплюваних культурах клітин гетерологічного та гомологічного походження з проявом цитопатичної дії.

2. Отримано антиген, придатний для діагностики ІНАН в реакції нейтралізації.

#### Список літератури

1. Вирусные болезни лошадей. Предисл. Я.Р. Коваленко. М.; Колос, 1972 – С 107. 2. Диагностика вирусных болезней животных: Справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.; Агропромиздат, 1991. – С. 313-314. 3. Инфекционные и инвазионные болезни лошадей. М.; Колос, 1976 – с 63. 4. Kobayashi, K., Kono, Y. Propagation and titration of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture // Nat. Inst. Anim. Quart. – 1967. – Vol.7. N1. – P. 8-20.

### REPRODUCTION OF VIRUS OF HORSES INFECTIOUS ANEMIA IN HETEROLOGOUS CELL CULTURE AND GETTING OF ANTIGEN FOR NEUTRALIZATION REACTION

Kryvoshia P.Yu., Mandygra M.S., Kot L.B.

Institute of epizootology of NAAS of Ukraine, Rivne

Results of studying of infectious anemia virus in heterologous cell culture are presented in the article. The culture received antigen, which is suitable for serological diagnosis of infectious anemia of horses in the neutralization.

УДК 619:615.31

### ЕФЕКТИВНІ І СУЧАСНІ АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ПРЕПАРАТИ

Кучерук М.Д., Соломон В.В.

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

З появою антибіотиків усі інші антибактеріальні препарати відійшли на другий план. Однак, антибіотики, як панацея від усіх хвороб, не виправдали себе через ряд негативних побічних дій, та утворення стійких бактерій. Фахівці ветеринарної та гуманної медицини шукають дієву екологічно безпечну їм альтернативу [2].

Сучасна стратегія боротьби (профілактики і лікування) з бактеріями і вірусами полягає в необхідності використання препаратів нового типу дії, що відрізняються за механізмом від антибіотиків і є екологічно безпечними.

У цьому плані перспективними виявилися препарати срібла, їх ефективність підтверджена тисячолітнім досвідом. Однак, на зміну дорогим потенційно токсичним препаратам зі сполуками срібла (його відносять до важких металів) прийшли нанопрепарати срібла з розмірами частинок від 1 до 100 нм., які отримують з використанням новітніх досягнень [1].

Розчини наночастинок срібла діють подібно до антибіотиків, однак не знешкоджують навмання всю мікрофлору організму, а коригують склад мікробіоценозу, знешкоджуючи патогенну і умовно-патогенну мікрофлору, практично не знижуючи концентрації корисних симбіонтів [3].

До наносрібла, на відміну від антибіотиків, не розвивається стійкість, воно не токсичне [4] і не викликає побічних ефектів, добре переноситься хворими (у літературі немає даних щодо алергічних реакцій на препарати срібла), має широкий спектр протимікробної, противірусної та протигрибкової дії. Щоправда спороутворюючі види мікроорганізмів до срібла менш чутливі, однак, проростання спор затримується [1].

Розчини наночастинок срібла ефективні в надзвичайно малих концентраціях, екологічно безпечніші, ніж будь-які з нині відомих хімічних біоцидів, і характеризуються ширшим спектром антимікробної дії [1].

**Мета:** дослідити антибактеріальну дію різних концентрацій розчинів нанорозмірного срібла на мікрофлору технічної та водопровідної води.

**Матеріали і методи.** Досліджували зразки води з різним ступенем бактеріальної забрудненості шляхом визначення загального мікробного числа (ЗМЧ). Питну водопровідну воду відбирали в пробірки, у які для нейтралізації залишкової кількості хлору вносили 10 мг натрію сірчистокислого у вигляді 1,5 % розчину в кількості 2 см<sup>3</sup> на 500 см<sup>3</sup> води. Технічну воду також відбирали в стерильні пробірки, з якої в подальшому робили послідовні десятикратні розведення (відповідно до передбачуваного забруднення). З усіх пробірок були зроблені посіви в чашки Петрі з додаванням різних концентрацій розчину колоїдного срібла. З кожної проби води робили посів не менше 2 об'ємів по 1 см<sup>3</sup> натуральної проби або з 10-кратних розведень у дві паралельні чашки.

Випробовувалися 1 %, 0,1 %, 0,01 %, 0,001 % концентрації розчину наносрібла. Загальне мікробне число визначали методом глибинного посіву 1 см<sup>3</sup> води в поживний агар і враховували всі колонії мікроорганізмів, які вирости на поверхні і вглибині агару, за температури 36 °С протягом 24 годин і які можна було побачити при 2-5-кратному збільшенні. Враховували кратність розведення.

**Результати досліджень.** Дані таблиці 1 свідчать про те, що загальне мікробне число у технічній воді становило 30700 КУО/мл. Методом послідовних десятикратних розведень технічної води зменшували її величину мікробного забруднення для отримання достовірних результатів на чашках Петрі (можливості підрахунку всіх колоній, що вирости).

При додаванні до неї 1 мл 1 % та 0,1 % розчину срібла в усіх розведеннях на поживному агарі не вирости жодної колонії. 0,01 % розчин наносрібла зменшив кількість мікроорганізмів технічної води до 4 (у 7,5 тис. разів); 0,001 % розчин срібла зменшив кількість мікроорганізмів у 130 разів.

Кількість мікроорганізмів у водопровідній воді незначно перевищувала норму (100 КУО/мл). А розчин срібла згубно вплинув майже на всі мікроорганізми, що були у воді. Однак, концентрація розчину колоїдного срібла 0,001 % виявилась недостатньою для знешкодження абсолютно всієї мікрофлори.