

УДК: 619:615.37:619:616.98

Кісера Я.В., д.вет.н., професор**Сторчак Ю.Г.**, аспірант[©]

E-mail: juliettus@rambler.ru

*Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького*

РОЗРОБКА ІНАКТИВОВАНОЇ АУТОВАКЦИНИ ПРОТИ ДИПЛОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

Основною проблемою сучасного тваринництва є отримання і вирощування здорового молодняка. Найбільш поширеними серед телят є респіраторні захворювання, які поступають лише хворобам шлунково-кишкового тракту. До групи респіраторних захворювань належить диплококова інфекція, збудником якої є *Streptococcus pneumoniae*. У хворих спостерігається зниження середньодобового приросту, продуктивних і племінних якостей. Лікування та профілактика даного захворювання залишається важливим питанням, яке вимагає своєчасного і кваліфікованого його вирішення. Для профілактики захворювання використовують вакцини, найчастіше ад'ювантом у яких міститься гідроокис алюмінію. Розробка ефективних ад'ювантів набуває особливої актуальності у зв'язку з постійною необхідністю посилювати імунну відповідь на обширну кількість нових антигенів, для більшості яких характерна слабка імуногенність. Актуальними є дослідження самої диплококової (пневмококової) інфекції, а саме в плані розробки інактивованої аутовакцини, яка б володіла високою імуногенністю. Було вирішено провести дослідження із використанням як ад'юванта спиртово-водного розчину прополісу, який володіє антибіотичною, антимікотичною дією, стимулює імунобіологічні процеси підвищуючи фагоцитарну активність лейкоцитів.

Ключові слова: білі миші, вакцинація, інфекція, імунітет, імуногенність, прополіс.

УДК: 619:615.37:619:616.98

Кісера Я.В., д.вет.н., професор**Сторчак Ю.Г.**, аспірант*Львівський національний університет ветеринарної медицини
і біотехнологій імені С.З. Гжицького*

РАЗРАБОТКА ИНАКТИВИРОВАННОЙ АУТОВАКЦИНЫ ПРОТИВ ДИПЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Основной проблемой современного животноводства является получение и выращивание здорового молодняка. Наиболее распространенными среди телят считаются респираторные заболевания, по распространенности они

уступают лишь болезням желудочно-кишечного тракта. К группе респираторных заболеваний принадлежит диплококковая инфекция, возбудителем которой является *Streptococcus pneumoniae*. У больных наблюдается снижение среднесуточного прироста, продуктивных и племенных качеств. Лечение и профилактика данного заболевания остается важным вопросом, который требует своевременного и квалифицированного решения. Для профилактики заболевания используют вакцины, чаще всего в качестве адъюванта которых содержится гидроокись алюминия. Разработка эффективных адъювантов приобретает особую актуальность в связи с постоянной необходимостью усиления иммунного ответа на обширное количество новых антигенов, для большинства которых характерной является слабая иммуногенность. Актуальны исследования самой диплококковой (пневмококковой) инфекции, а именно в плане разработки инактивированной аутовакцины, которая бы обладала высокой иммуногенностью. Решено провести исследования с использованием в качестве адъюванта спиртового водного раствора прополиса, который обладает антибиотическим, противогрибковым действием, стимулирует иммунобиологические процессы, повышая фагоцитарную активность лейкоцитов.

Ключевые слова: белые мыши, вакцинация, инфекция, иммунитет, иммуногенность, прополис.

UDC: 619:615.37:619:616.98

Y.V. Kisera, Doctor of Veterinary Sciences, Professor;

Y.G. Storchak, postgraduate

*Lviv national university of veterinary medicine and biotechnology
named of S. Z. Gzitskyj*

INACTIVATED AUTOVACCINE FROM LOCAL STRAINS AGENT OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AGAINST DIPLOCOCCAL INFECTION

*The main problem is to get a modern animal husbandry and cultivation of healthy calves. The most common among calves registered respiratory diseases, which are second only to the prevalence of diseases of the gastrointestinal tract. The group of respiratory diseases belongs diplococcal infection, which is the causative agent of *Streptococcus pneumoniae*. In patients with a decrease in average daily rate, productive and breeding qualities. Treatment and prevention of this disease remains an important issue that requires prompt and qualified to resolve it. For the prevention of disease using vaccines often as adjuvant containing aluminum hydroxide. The development of effective adjuvants is of particular relevance due to the constant need to strengthen the immune response to the vast number of new antigens, most of which is characterized by weak immunogenicity. Relevant research is very diplococcal(pneumococcal) infection, namely in terms of the development of self-vaccination inactivated, which would had a high immunogenicity. It was decided to conduct a study using as adjuvant alcohol-water solution of propolis, which has*

antibiotic, antifungal action, stimulates the immunological processes increasing the phagocytic activity of leukocytes.

Keywords: *whitemouse, vaccination, infection, immunity, immunogenicity, propolis.*

Вступ. Захворювання органів дихання – це одна з основних причин економічних збитків у тваринництві. Як правило, перші ознаки респіраторної патології з'являються через 5-10 днів після технологічного перегрупування тварин.

Відомо, що в основі патології респіраторного тракту лежать порушення цілісності сурфактантної вистілки у структурній одиниці легенів, гемодинаміки та секреторної діяльності слизової оболонки верхніх дихальних шляхів. Виникнення респіраторної патології в організмі тварин перебуває у прямій залежності від гіперчутливості наднирників, обумовленої стресами. Викид великої кількості стероїдних гормонів у периферійну кров пригнічує функції імунної системи організму.

Респіраторні захворювання телят реєструють у різних регіонах України, за поширеністю вони займають друге місце після шлунково-кишкових захворювань. До групи респіраторних захворювань належить диплококова інфекція. У хворих спостерігається зниження середньодобового приросту, продуктивних і племінних якостей. Лікування та профілактика даного захворювання залишається важливим питанням, яке вимагає своєчасного і кваліфікованого його вирішення [1]. Саме тому в даний час особливо актуальною є розробка та подальше впровадження у практику нових високоефективних й економічно виправданих схем профілактики респіраторних захворювань бактеріальної етіології [8].

Літературні дані свідчать, що причиною диплококозу є проникнення в організм умовно-патогенної мікрофлори в результаті зниження загальної резистентності, яка часто стійка до ряду антибактеріальних препаратів [1, 5].

В сучасних умовах вакцинопрофілактика розглядається як один з провідних масових ефективних засобів боротьби з інфекціями. Як стверджує Медуніцин Н. В., прагнення створити вакцини з високоочищених антигенів, які в більшості випадків мають слабку імуногенність, призвело до необхідності застосування ад'ювантів, що підсилюють імунну відповідь [6].

Розробка ефективних ад'ювантів - носіїв антигенів, які забезпечують формування вираженого і тривалого збереження імунітету, є одним із найскладніших завдань у виробництві вакцинних препаратів. Тому розробка нових ад'ювантів набуває особливої актуальності у зв'язку з постійною необхідністю посилювати імунну відповідь на обширну кількість нових антигенів, для більшості яких характерна слабка імуногенність [6]. Використання ад'ювантів має і економічну доцільність, оскільки вакцини з ад'ювантами вимагають мінімальної витрати антигену [10].

Термін «ад'ювант» (АД) часто використовується як синонім поняття «імуномодулятор», хоча насправді імуностимулятори - це, як правило,

однокомпонентні речовини, що володіють власними імуностимулюючими або імуномодулюючими властивостями, а АД-комбінації або АД-системи можуть складатися з декількох різних речовин із різними функціями та активністю [9]. Тому ми вирішили провести дослідження із використанням як ад'юванта спиртового розчину прополісу, який володіє антибіотичною, антимікотичною дією, стимулює імунобіологічні процеси підвищуючи фагоцитарну активність лейкоцитів.

Мета досліджень: розробка та випробування на лабораторних тваринах нешкідливої та високо імуногенної інактивованої аутовакцини проти збудника диплококової інфекції з використанням прополісу, імуностимулюючого складника як ад'юванта.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводились на кафедрі епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького та у Комунальній міській клінічній лікарні швидкої медичної допомоги м. Львова. Було розроблено та виготовлено дослідну серію вакцини з місцевого штаму збудника *Streptococcus pneumoniae*. Зразки вакцини були досліджені на предмет відсутності контамінації бактеріальної і грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 [2] та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613 [3]. Інактивацію проводили фізичним методом. Культуральними та біологічними методами була визначена повнота інактивації вакцинного препарату. У випадку відсутності росту мікроорганізмів на поживних середовищах та ознак захворювання і загибелі імунізованих мишей, дану вакцину вважали повністю інактивованою.

Концентрацію інокуляту визначали за допомогою денситометра DEN-1. Інтерпретацію результатів (у вигляді одиниць Мак-Фарланда) здійснювали у відповідні числові значення концентрацій бактеріальних суспензій та їх оптичну щільність при λ у 550 нм (таблиця 1).

З метою визначення нешкідливості аутовакцини, її антигенної та імуногенної активності, у дослідженнях використовували білих мишей.

Для цього сформували чотири групи лабораторних тварин: контрольну і три дослідні групи по 10 голів у кожній групі. Тваринам 1-ї дослідної групи вакцинацію проводили аутовакциною із концентрацією інокуляту у 2 млрд. м.к., 2-ї дослідної групи – із концентрацією у 4 млрд. м.к., 3-ї дослідної групи – у 6 млрд. м.к. Контрольній групі тварин замість аутовакцини вводили фізіологічний розчин.

Спостереження за тваринами проводили упродовж 21 доби. Під час проведення дослідження на лабораторних тваринах проводили реєстрацію зміни загального стану мишей, наявність реактивних змін у місці введення препарату. З метою визначення імуногенності препарату дослідні тварини піддавались дворазовому введенню вакцини у дозі 0,3 мл. Через 14 діб після проведення повторного щеплення тварин заражали польовим штамом *Streptococcus pneumoniae* у дозі 0,5 мл [4, 7]. Тварин контрольної групи через 14 діб після повторного введення фізіологічного розчину заражали польовим штамом *Streptococcus pneumoniae* у дозі 0,5 мл.

Таблиця 1

Інтерпретація результатів у відповідні числові значення концентрацій бактеріальних суспензій та їх оптичну щільність при λ 550 нм

Стандарти Мак-Фарланда	Склад	Інтерпретація	
	Концентрація BaSO_4	Концентрація бактерій	Теоретична оптична щільність
0,5	$2,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,15 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,125
1	$4,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,3 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,25
2	$9,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,6 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,5
3	$1,44 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$0,9 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,75
4	$1,92 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$1,2 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,0
5	$2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$1,5 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,25
10	$4,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$3,0 \cdot 10^9$ м.к./мл	2,5
Дослідна бактеріальна суспензія № 1		$2 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,67
Дослідна бактеріальна суспензія № 2		$4 \cdot 10^9$ м.к./мл	3,33
Дослідна бактеріальна суспензія № 3		$6 \cdot 10^9$ м.к./мл	5,0

Вакцина вважалась нешкідливою у тому випадку, якщо упродовж усього періоду спостереження за дослідними тваринами усі білі миші залишились живими, а також не було наявних місцевих й симптоматичних проявів, які могли бути спричинені вакциною.

Результати досліджень. Згідно з отриманими результатами досліджень випливає, що дослідні зразки вакцини, виготовленої із місцевих штамів збудника, відповідають вимогам ДСТУ 4483 та ДСТУ 4613. Не було виявлено контамінації препарату бактеріальною, а також грибовою мікрофлорою, зразки вакцини пройшли повну інактивацію та виявились нешкідливими для дослідних лабораторних тварин. Під час спостереження за піддослідними тваринами при підшкірному та внутрішньочеревному введенні вакцини у дозі $0,3 \text{ см}^3$ у 2-й та 3-й дослідній групі не було зареєстровано випадків захворювань тварин, їх загибелі та запальних реакцій у місці введення вакцини. В 1-й дослідній групі зареєстровано загибель однієї лабораторної тварини після введення польового штаму збудника.

У контрольній групі після зараження польовим штамом збудника тварини не володіли несприйнятливостю організму до збудника інфекції.

Одержані результати досліджень свідчать (таблиця 2), що дворазове введення вакцини у білих мишей стимулює забезпечення формування несприйнятливості організму до зараження їх летальними дозами збудника стрептококової інфекції.

Із застосуванням вакцини, виготовленої з місцевого штаму збудника, спостерігається формування імунітету у тварин до антигенів *Streptococcus pneumoniae*. Захист тварин дослідних груп під час експериментального зараження був у межах від 90 до 100%.

Таблиця 2

Імуногенні властивості вакцини на білих мишах

Групи тварин	Кількість тварин	Концентрація збудника у препараті	Заражено голів польовим штамом	% захисту
Контрольна група	10	-	10	0
Дослідна група №1	10	2*10 ⁹ м.к.	10	90
Дослідна група №2	10	4*10 ⁹ м.к.	10	100
Дослідна група №3	10	6*10 ⁹ м.к.	10	100

При визначенні нешкідливості та імуногенності дослідної серії вакцини було встановлено, що у піддослідних тварин не спостерігається поствакцинальних ускладнень.

Клінічні спостереження за щепленими тваринами свідчать про те, що експериментальні зразки вакцини є нешкідливими, застосування її не викликає негативних наслідків, а саме: у тварин 2-ї та 3-ї дослідних груп не реєстрували набряків та абсцесів у місці введення, підвищення місцевої температури та температури тіла, погіршення загального стану лабораторних тварин. Під час клінічних спостережень у тварин не було зареєстровано побічних реакцій та відхилень від фізіологічних норм, характерних для даного виду тварин.

Висновки:

1. Дослідні зразки вакцини, виготовленої із місцевих штамів збудника, відповідають вимогам ДСТУ 4483 та ДСТУ 4613.
2. Дворазове введення аутовакцини з інтервалом у 14 діб у білих мишей стимулює забезпечення формування несприйнятливості організму до зараження їх летальними дозами збудника диплококової інфекції.
3. Під час клінічного спостереження за тваринами не було зареєстровано побічних реакцій на введення вакцини та відхилень від фізіологічних норм.

Література

1. Басова Н. Ю. Респираторные болезни телят //Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2007. – №3. – С. 57-61.
2. ДСТУ 4483:2005. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначання бактеріальної і грибної контамінації. <http://www.csm.kiev.ua/nd/nd.php?b=1>.
3. ДСТУ 4613:2006 Препарати біологічні для ветеринарної медицини. Метод визначення контамінації мікоплазми. <http://www.csm.kiev.ua/nd/nd.php?b=1>.
4. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин /В.І. Левченко, В.В. Влізло, І.П. Кондрахін та ін. - Біла Церква, 2004. – 608 с.
5. Козлов Р.С. Пути оптимизации мониторинга, профилактики и фармакотерапии пневмококковых инфекций. Автореф. дис. докт. мед. наук. Смоленск, 2004. – 46 с.
6. Медуницин, Н. В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней /Н. В. Медуницин, В. И. Покровский. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. 528 с.

7. Методичні рекомендації для оцінки та контролю імунного статусу тварин /Р. П. Маслянюк, І. І. Олексюк та ін. – Львів, 2001.– 87 с.
8. Науменко В. И. Диагностика смешанных респираторных инфекций у телят //Сб. научн., тр. Витебского вет. ин-та. – 1992. – Т. 29. – С. 46-47.
9. Bruno G. The perfect mix: recent progress in adjuvant research //Nature Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 5. – P. 505-517.
10. Plotkin SL, Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. Vaccines, 4th edn. Philadelphia: WB Saunders; 2004: 1-15.

Рецензент – д.б.н., професор Куртяк Б.М.