

УДК 619:616.98:579.869.2

О. А. ТАРАСОВ. , кандидат ветеринарних наук

В. П. САПЕЙКО, кандидат ветеринарних наук

І. А. ЗОЦЕНКО

Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ

А. Ф. ОБРАЖЕЙ кандидат ветеринарних наук

ТОВ «Бровафарма», м. Бровари

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ІНАКТИВОВАНИХ ЕМУЛЬСИН - ВАКЦИН ПРОТИ БЕШИХИ СВИНЕЙ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ

Наведено результати вивчення імуногенності експериментальних інактивованих моноштамних емульсин - вакцин проти бешихи свиней на лабораторних тваринах. Експериментальна вакцина, що виготовлена із штаму М-2 ВК забезпечувала найбільший протективний ефект при прямому зараженні вакцинованих тварин. Захист мишей при застосуванні вакцини виготовленої із цього штаму складав 90%. Встановлено, що штаму М-2 ВК є найбільш придатним для виготовлення ефективно інактивованої емульсин - вакцини проти бешихи свиней.

Ключові слова Бешиха свиней, протективний антиген, вакцина

Одним із головних напрямів ветеринарної науки і практики є створення та виробництво засобів діагностики і профілактики хвороб тварин, захист країни від заносу збудників особливо небезпечних хвороб тварин. У зв'язку з цим, забезпечення практики ветеринарної медицини ефективними лікувально-профілактичними препаратами є одним з головних завдань.

Для запобігання захворювання свиней на бешиху в Україні застосовують три живі вакцини – із штаму ВР-2, вар. “ІВМ” , зі штамів ВР-2 і 6/24 “Рузівак”, депоновану вакцину зі штаму Конєва та одну інактивовану – концентровану гідроокисалюмінієву формолвакцину.

При застосуванні живої вакцини в окремих господарствах спостерігали розвиток поствакцинальної бешихи свиней з причини наявності у вакцинного штаму ВР-2 гетерогенності за ознакою вірулентності. При серійних пасажах через сприйнятливих тварин штаму підвищує вірулентність, що може призвести до селекціонування високовірулентних клонів [1-3].

Встановлено, що в процесі зберігання рідкої та сухої живих вакцин проти бешихи свиней значна частина бактерій бешихи поступово гине. З цієї причини, після 3 і більше місяців зберігання, імунізуюча доза, що визначається при виробництві вакцини в певній кількості мікробних клітин, буде змінюватись і призводити до зниження імуногенності вакцин.

Третім недоліком живих вакцин є те, що після введення в організм свиней живих бактерій бешихи відбувається бактеріоносійство та виділення бактерій збудника в навколишнє середовище, де бактерії бешихи тривалий час зберігаються і навіть розмножуються в ґрунті, чим можна пояснити повторні спалахи цієї хвороби в стаціонарно неблагополучних пунктах на бешиху свиней. Механізми відновлення вірулентності авірулентних штамів збудника бешихи свиней до цього часу лишаються невідомими [4-7].

Інактивовані вакцини, які не мають в своєму складі живих бактерій бешихи, не призводять до розповсюдження збудника і мають відносно стабільну імуногенність протягом всього терміну зберігання.

За даними зарубіжних дослідників [8,9], імуногенність інактивованих вакцин в значній мірі залежить від властивостей ад'юванта. При цьому, вакцини з ад'ювантами на основі мінеральних олій забезпечують вищу імуногенність в порівнянні з гідроксидом алюмінію та деякими іншими. Тому застосування сучасних ад'ювантів на основі мінеральних олій значно підвищує ефективність вакцин [10].

На даний час в нашій країні не існує високоефективної безпечної інактивованої вакцини, а застосування живих вакцин викликає сумніви в їх потенційній безпечності.

У зв'язку з цим, вивчення антигенних особливостей вакцинних та польових штамів бактерій бешихи, які можуть бути використаними для удосконалення існуючих вакцин та створення нових ефективних біопрепаратів є актуальним завданням, вирішення якого дозволить ліквідувати проблему специфічної профілактики бешихи в господарствах України.

Результати досліджень стануть науковим підґрунтям для розробки і впровадження у практику нових засобів для профілактики даного захворювання.

Мета роботи. Вивчити імуногенні властивості експериментальних моновалентних емульсин-вакцин проти бешихи свиней виготовлених із різних штамів бактерій бешихи в дослідах на лабораторних тваринах.

Матеріали і методи. Для виготовлення експериментальних інактивованих емульсин-вакцин застосовували штами збудника бешихи: М-2 ВК; 93; 251; 419; 1933. Бактерії бешихи культивували у м'ясопептонному бульйоні Хоттінгера (МПБХ) з рН 7,4 – 7,6. Типовість бактерій в культурах визначали шляхом мікроскопії пофарбованих за Грамом мазків.

Кількість живих бактерій бешихи в культурах до інактивування визначали стандартним методом серійних розведень.

У роботі використовували лабораторних білих мишей вагою 16 – 18 г. Щеплення здійснювали шляхом підшкірного введення вакцин за допомогою шприца в дозі 0,2 см³ з вмістом 1 млрд бактерій бешихи до інактивування. Місце введення обробляли 70% етиловим спиртом.

Інактивування бактерій проводили формаліном (Merck, Німеччина) з вмістом формальдегіду не менше 37%. Формалін додавали до культури в

кількості 0,3%. Перед додаванням його розводили стерильним фізіологічним розчином в співвідношенні 1:1. Формалінізовану культуру витримували при кімнатній температурі протягом трьох діб.

По закінченню інактивування зразки вакцинної культури досліджували на стерильність згідно ГОСТ 280 – 85 - 89 .

Виготовлення вакцини проводили шляхом змішування інактивованої вакцинної культури з ад'ювантом Montanide ISA 25 (Seppic, Франція) у об'ємному співвідношенні 75 до 25 з розрахунку , що в дозі готової вакцини вміст інактивованих бактерій буде складати 1 млрд.

Для контрольного зараження використовували патогенний для мишей штам 149, ліофілізований в Інституті ветеринарної медицини УААН в ампулах. Контрольне зараження проводили шляхом підшкірного введення мишам 0,2 см³ культури з вмістом 100 LD₅₀ бактерій бешихи. Заражаючу дозу контрольного штаму попередньо підтитрували на мишах.

Оцінку титрів специфічних антитіл проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) в непрямому варіанті за стандартним протоколом на 96 лункових стріперованих планшетах (Nunc, Данія). Антиген для адсорбції наносили в карбонатному буфері (рН 9,6) в концентраціях 0,2 мкг білка на лунку та витримували при +4°С протягом 10 годин. Результати реєстрували при довжині хвилі 492 нм (ОФД).

Рівень фагоцитозу визначали методом експозиції суміші 0,5 см³ стабілізованої цитратом натрію крові з 0,5 см³ добової бульйонної культури бактерій збудника бешихи штаму 149 протягом 30 хвилин при 37±0,2°С. За результатами мікроскопії мазків суміші крові із бактеріями пофарбованими за Романовським-Гімза після витримування в термостаті і визначали фагоцитарну активність нейтрофілів у відсотках (відношення кількості фагоцитів, які захопили бактерії до загальної кількості підрахованих) та фагоцитарний індекс – середня кількість бактерій захоплених одним фагоцитом.

Результати досліджень. Для дослідження імуногенних властивостей нами було виготовлено п'ять моноштамних емульсин-вакцин проти бешихи із інактивованих формаліном штамів М-2 ВК; 93; 251; 419; 1933 та поліштамну емульсин вакцину із їх суміші. Культури, які використовувались для їх виготовлення, не були контаміновані сторонніми мікроорганізмами, а бактерії бешихи мали типові морфологічні і культуральні властивості.

Для визначення нешкідливості, реактогенності та імуногенності експериментальних вакцин за принципом аналогів було сформовано сім дослідних груп мишей, яких дворазово з інтервалом 14 днів підшкірно вакцинували емульсин-вакцинами в дозі 0,2 см³ з вмістом 1 × 10⁹ мікробних інактивованих клітин бешихи.

Усі миші після щеплення були рухливі та залишились живими.

Через 14 днів після другого щеплення, піддослідних та контрольних мишей заражали бактеріями бешихи контрольного патогенного штаму 149 підшкірно в дозі $0,2 \text{ см}^3$ (100 LD_{50}).

Загибель мишей реєстрували в основному через 4-6 днів після зараження. Після зараження в групі мишей, які були щеплені вакциною із штаму 93 загинули всі миші (100%); М-2 ВК – одна миша (10%); 251 – сім мишей (70%); 419 – вісім мишей (80%); 1933 – шість мишей (60%); із суміші штамів – чотири із десяти мишей (40%) при загибелі всіх контрольних мишей.

Відповідно захист від загибелі після зараження збудником бешихи свиней мишей, щеплених різними інактивованими емульсин-вакцинами складав, із штамів: 251 – 30%; 1933 – 40%; М-2 ВК – 90%; 419 – 20%; а із суміші зазначених штамів – 60% (табл.1).

Таблиця 1

Визначення нешкідливості та імуногенності інактивованих емульсин-вакцин проти бешихи свиней із штамів 93, 419, 1933, М-2 ВК та їх суміші

№ №г руп	Інактивовані вакцини зі штамів	Кількіст ь голів	Загинуло мишей після контрольного зараження		Захист, (%)
			голів	%	
1	93	10	10	100	-
2	251	10	7	70	30
3	419	10	8	80	20
4	1933	10	6	60	40
5	М-2 ВК	10	1	10	90
6	Із суміші п'яти штамів	10	4	40	60
7	Контрольна група	10	10	100	-

Фагоцитарна активність нейтрофілів у відношенні до бактерій збудника бешихи від тварин піддослідних груп після другої вакцинації значно збільшилась. Спостерігались достовірне збільшення як показника фагоцитарного індексу, так відсотка фагоцитозу ($P < 0,05$). Найбільше збільшення відсотку фагоцитозу реєстрували у мишей після другого щеплення вакциною із штаму М-2 ВК. Його рівень збільшився у два рази з $31,0 \pm 3,42$ до $62,0 \pm 1,77$. При застосуванні вакцини із штаму 93 відсоток фагоцитозу збільшився лише з $27,0 \pm 2,31$ до $32 \pm 1,12$; вакцини із штаму 251 з $35,0 \pm 1,42$ до $51 \pm 2,19$; із штаму 419 з $26,0 \pm 5,121$ до $52 \pm 1,87$; із штаму 1933 з $26,0 \pm 1,9$ до $46 \pm 2,25$; із суміші штамів з $28,0 \pm 1,08$ до $54 \pm 1,02$ на фоні стабільності фагоцитозу нейтрофілів від мишей контрольної групи.

Аналогічний процес спостерігали при аналізі фагоцитарного індексу. Він збільшився в два рази з $2,0 \pm 0,02$ до $4,5 \pm 0,19$ ($P < 0,001$) лише при застосуванні вакцини із штаму М-2 ВК. Використання антигену інших штамів (таблиця 2) незначно збільшувало показник фагоцитарного індексу при відносній стабільності його у нейтрофілів від контрольних тварин.

Таблиця 2

Фагоцитарна активність макрофагів крові мишей, щеплених інактивованими моноштамними емульсин-вакцинами вакцинами

Інактивовані вакцини зі штамів	Відсоток фагоцитозу		Фагоцитарний індекс	
	До щеплення	Після щеплення	До щеплення	Після щеплення
93	$27,0 \pm 2,31$	$32 \pm 1,12$	$2,51 \pm 0,06$	$2,1 \pm 0,05$
251	$35,0 \pm 1,42$	$51 \pm 2,19$	$1,9 \pm 0,15$	$2,9 \pm 0,12$
419	$26,0 \pm 5,121$	$52 \pm 1,87$	$2,3 \pm 0,04$	$3,1 \pm 0,14$
1933	$26,0 \pm 1,9$	$46 \pm 2,25$	$3,1 \pm 0,05$	$3,8 \pm 0,04$
М-2 ВК	$31,0 \pm 3,42$	$62,0 \pm 1,77$	$2,0 \pm 0,02$	$4,5 \pm 0,19$
Вакцина із суміші штамів	$28,0 \pm 1,08$	$54 \pm 1,02$	$2,1 \pm 0,05$	$3,6 \pm 0,20$
Контрольна група	$29,0 \pm 2,19$	$27,0 \pm 2,84$	$1,9 \pm 0,08$	$1,4 \pm 0,03$

При дослідженні сироваток крові від мишей після дворазового щеплення інактивованою емульсин – вакциною зі штаму 93 титри специфічних антитіл до збудника бешихи свиней складала - $4,2 \pm 0,11 \log_2$; вакциною зі штаму 251 - $5,2 \pm 0,11 \log_2$; вакциною зі штаму 419 - $4,2 \pm 0,11 \log_2$; із штаму – 1933 - $5,2 \pm 0,11 \log_2$; із штаму М-2 ВК - $7,3 \pm 0,21 \log_2$ при майже однакових титрах антитіл у всіх тварин до щеплення .

Висновки і пропозиції 1. При порівняльному дослідженні експериментальних емульсин – вакцин проти бешихи свиней на основі ад'юванту Montanide ISA 25 (Seppic, Франція) із інактивованих формаліном штамів 93, 251, 419, 1933 і М-2 та їх сумішей встановлено, що всі вони були нешкідливими для мишей при дворазовому підшкірному введенні в дозі $0,2 \text{ см}^3$ (1×10^9 бактерій).

2. Найбільший проєктивний ефект при випробуванні на мишах після зараження патогенним штамом 149 в дозі 100LD_{50} забезпечувала експериментальна вакцина із штаму М-2 ВК. Застосування цієї вакцини давало 90% - овий захист мишей від загибелі після зараження патогенним штамом, супроводжувалось збільшенням показників відсотку фагоцитозу з $31,0 \pm 3,42$ до $62,0 \pm 1,77$ та індексу фагоцитозу з $2,0 \pm 0,02$ до $4,5 \pm 0,19$, а також сприяло максимальному індукуванню титрів специфічних антитіл проти збудника бешихи свиней на рівні $7,3 \pm 0,21 \log_2$

За результатами досліджень встановлено, що штам М-2 ВК виявився найбільш придатним для виготовлення ефективної інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней.

Список використаної літератури

1. Тарасенок Н. И. Изменчивость возбудителя рожи свиней/ Н. И. Тарасенок // Доклады ВАСХНИЛ. - 1974. - № 10. - С. 39—40.
2. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping / Imada Y, Takase A, Kikuma R, et al. // J Clin Microbiol. – 2004. - №42(5). – P.2121 – 2126
3. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice / Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T., Mori Y, Kubo M. // Infect. Immun. – 1994. –vol. 62. – P. 2806-2810.
4. Molecular identification of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle by PCR / Hassanein R., Sawada T., Kataoka Y., Gadallah A., Suzuki Y. // Vet Microbiol. – 2003 . -№95(4) . – P.239- 245.
5. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine /Shimoji Y., Oishi E., Muneta Y., Nosaka H., Mori Y. // Vaccine. - 2003. -№21(5-6) . – P.532-537.
6. Pathogenicity for mice and swine of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle /Hassanein R., Sawada T., Kataoka Y., Gadallah A., Suzuki Y., Takagi M., Yamamoto K.// Vet Microbiol. - 2003 . -№91(2-3) . – P.231-238.
7. Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice / Shimoji Y., Asato H., Sekizaki T., Mori Y., Yokomizo Y. // J Vet Med Sci. - 2002 . -№64(2) . – P.173-176.
8. Induction of cross-protection in mice against dolphin *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates with a swine commercial vaccine / Lacave G., Cox E., Hermans J., Devriese L., Goddeeris B.M.// Vet Microbiol.- 2001 . -№80(3) . – P.247-253.
9. Beckmann R., Cussler K. Potency Testing of Erysipelas Vaccines in Mice. ELISA vs. Challenge // ALTEX. -1994. -№11(5) . – P.39-45.
10. Groschup M. H., Cussler K, Weiss R, Timoney J. F. Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* // Epidemiol. Infect. - 1991. - №107(3). – P.637-49.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ИНАКТИВИРОВАННЫХ
ЭМУЛЬСИН-ВАКЦИН/ О. А. Тарасов, В. П. Сапейко, И. А. Зоценко,
А. Ф. Ображей**

Наведено результати вивчення імуногенності експериментальних інактивованих моноштамних емульсин - вакцин проти бешихи свиней на лабораторних тваринах. Експериментальна вакцина, що виготовлена із штаму М-2 ВК забезпечувала найбільший протективний ефект при прямому зараженні вакцинованих тварин. Захист мишей при застосуванні вакцини виготовленої із цього штаму складав 90%. Встановлено, що штамп М-2 ВК є найбільш придатним для виготовлення ефективною інактивованою емульсин - вакцини проти бешихи свиней

Ключевые слова : протективный антиген, вакцина, рожа свиней

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE ACTIVITY OF THE
EXPERIMENTAL SPECIMENS INACTIVATED EMULSION VACCINE
AGAINST SWINE ERYSIPELAS ON LABORATORY CONDITIONS /
Tarasov A.A., Sapeyko V.P., Zotsenko I.A., Obrazhey A.F.**

The investigation of immunity of experimental inactivated emulsion – vaccine against erysipelas results was carried out. was the most effective in challenge vaccinated animals with control pathogenic strain. The experimental vaccine, made with strain M-2 BK, induced protection against infection with control pathogenic strain at level 90%. Strain M-2 BK may be used as the most promising strain for effective vaccine against erysipelas.

Key words: protective antigene, vaccine, swine erysipelas

Рецензент – кандидат ветеринарних У. М. Яненко

Рукопис надійшов 01. 08. 2013р.