

УДК 619:616.98:579.843.95:615.371:636.4

О. А. ТАРАСОВ, кандидат ветеринарних наук,
В. П. САПЕЙКО, кандидат ветеринарних наук
С. А. НИЧИК, доктор ветеринарних наук
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ЕМУЛЬСИН-ВАКЦИН ПРОТИ СТРЕПТОКОКОЗУ СВИНЕЙ

У статті наведено результати випробування експериментальних зразків вакцин проти стрептококозу свиней на лабораторних тваринах (білі миші). Проведено вивчення протективної активності при прямому зараженні, визначено показники фагоцитозу та встановлено титри специфічних антитіл при застосуванні різних варіантів вакцин.

Ключові слова: streptococcus suis, антигенні властивості, протективна активність, вакцина, ад'ювант

Streptococcus suis типу 2 є важливим патогеном для свинарства всього світу. Від цього захворювання потерпають не тільки країни, що розвиваються, а й розвинені країни, такі як США та країни Європи Стрептококову інфекцію пов'язують головним чином із менінгітами, артритами, ендокардитами, септицемією [1, 2].

У сучасній літературі описано 35 різних капсулярних серотипів *S. suis* [3,4,5].

У більшості європейських країн, *S. suis* серотипу 2 (типу 2) є найбільш поширеним серед всіх виділених ізолятів від хворих свиней.

Ускладнюючим фактором успішної боротьби із цим захворюванням є широке, не завжди раціональне застосування різних груп антибіотиків та швидке набуття полірезистентності патогенною мікрофлорою [6, 7].

Створення сучасних засобів специфічної профілактики із застосуванням вискоефективних ад'ювантів та високоімуногенних штамів дозволить ефективно боротися із поширенням даного захворювання шляхом своєчасного щеплення поголів'я та таким чином, уникнути розвитку резистентних штамів [5, 8, 9, 10].

Важливість вирішення проблеми стрептококозів має соціальне значення, оскільки так звані горизонтальні генетичні обміни стрептококів призводять до формування штамів збудника із новими патогенними властивостями, які можуть бути небезпечними для людини, а на фоні метицилінрезистентності – особливо небезпечними.

В світі щорічно реєструють більше 10 млн випадків первинної стрептококової інфекції у людей та за даними ВОЗ, біля 50% бактеріальних захворювань серця зв'язано із стрептококовою інфекцією [8, 9, 10].

У практиці ветеринарної медицини стрептококи стають причиною важких інвазивних інфекцій, таких як менінгіти, артрити, нефрити, пневмонії. Не-

виявлений етіологічний фактор стає причинами стійких до антибіотиків штамів стрептококів [1,3,10,11].

Враховуючи всі ці посилення, ми вважаємо, що розроблення специфічних засобів профілактики є найважливішим підходом щодо ліквідації даного захворювання.

Результати досліджень, які були отримані при виконанні даного завдання в 2013 році, дозволили вивчити імуногенні властивості відібраних штамів *S. suis* на лабораторних тваринах (мишах). Розроблено лабораторний регламент з виготовлення лабораторних серій вакцини проти стрептококозів свиней.

Наступними етапами планується розробка специфічних ветеринарних імунобіологічних засобів проти стрептококозів свиней.

Актуальність теми: Вирішення проблеми стрептококозів свиней надасть можливість попередити захворювання людей на стрептококоз та вдосконалити засоби специфічної профілактики.

Мета досліджень: Вивчити імуногенні властивості експериментальних зразків вакцини виготовлених із застосуванням загальноклітинного антигена (бактерину) штамів *Streptococcus suis* та провести випробування протективної активності на лабораторних тваринах.

Об'єкт дослідження: штами та ізоляти *Streptococcus suis*

Методи дослідження: Нешкідливість, реактогенність та імуногенність експериментальних інактивованих вакцин визначали в дослідах на білих мишах масою 18 – 20 г, щеплених двооразово експериментальними вакцинами з наступним зараженням через 14 днів після імунізації контрольним високопатогенним ізолятом *S. suis* (23) підшкірно, в дозі 0,2 см³ (100 LD₅₀).

У роботі були використані штами та ізоляти мікроорганізму *Streptococcus suis*, що виділені фахівцями лабораторії біотехнології бактеріальних препаратів зберігаються та підтримуються в Інституті ветеринарної медицини. Для проведення досліджень використовували патогенні ізоляти стрептококозів свиней (11 які відрізнялись за ступенем вірулентності (за даними наших попередніх досліджень)).

Живильні середовища

Штами та ізоляти *S.suis* культивували у м'ясопептонному бульйоні Хоттінгера з вмістом (%): пептону – 0,5; натрію хлориду – 0,2; калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,3; натрію фосфорнокислого двохзаміщеного – 2; детергенту Tween-80 – 0,05; сироватки крові великої рогатої худоби, коней або овець – 8-10; глюкози – 0,4; амінного азоту 180 – 200 мг %. Поживне середовище мало рН 7,4 – 7,6. Інші дослідження проводили на стандартних середовищах МПА, МПБ, середовищі Сабуру.

Для всиановлення гемолітичних властивостей використовували МПА із додаванням стерильної дефібринованої крові ВРХ, а також при проведенні досліджень використовували суху плазму крові (БіоФарма).

Методи

Культивування мікроорганізмів *Streptococcus suis*

Культивування проводили: в МПБ та МПБХ із рН – 7,4 – 7,6 із додаванням інактивованої сироватки крові ВРХ в кількості 8-10%. при температурі 36,7± 0,3° С протягом 12-24 годин і в МПАХ 58 – 72 години.

Добові культури збудника стрептококову свиней піддавали інактивуванню шляхом додавання формаліну (Merck®) $(\text{H}_2\text{CO})_n$ (37 % водний розчин формальдегіду) в кількості 0,2 % і витримували при кімнатній (18-20°C) температурі протягом трьох діб.

По закінченні інактивування зразки вакцинної культури досліджували на стерильність шляхом посівів в пробірки з МПБ, МПБХ, ТГС, середовищем Сабуро та на МПА і МПАХ в чашках Петрі, на скошений МПАХ в пробірках згідно ГОСТ 28085. Культивування посівів проводили при $(36,7 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, а в середовищі Сабуро при $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом, відповідно, 7 і 14 діб. До і після інактивування визначали збереженість структури клітин, їх морфологію та відсутність сторонніх мікроорганізмів в мікроскопічних препаратах із культур пофарбованих за Грамом.

Експериментальні зразки вакцин виготовляли шляхом додавання до інактивованої культури стерильного ад'юванту та перемішування до утворення стійкої емульсії. Для отримання вакцин з різним вмістом інактивованих бактерій бешихи відповідно до схем дослідів, проводили концентрування культури шляхом центрифугування при 6000 об/хв. протягом 30 хвилин або розбавлення фізіологічним розчином до необхідної концентрації.

Щеплення тварин проводили з дотриманням загальноприйнятих правил асептики та антисептики. Щеплення мишей здійснювали шляхом підшкірного введення вакцин за допомогою шприца об'ємом 1 см^3 в дозі $0,2 \text{ см}^3$, або в дозах, передбачених схемою досліду.

Контрольне зараження мишей проводили шляхом підшкірного введення $0,2 \text{ см}^3$ культури патогенного ізоляту *Streptococcus suis* з вмістом 100 LD₅₀ КУО.

Для вивчення активності макрофагів проводили опсоно-фагоцитарну реакцію, для чого із серця у лабораторних тварин відбирали кров в пробірці з антикоагулянтом (2% розчин лимоннокислого натрію). До $0,15 \text{ см}^3$ крові, що досліджувалась, додавали $0,1 \text{ см}^3$ двохмільярдного завису добової культури збудника стрептококову свиней в фізіологічному розчині. Вміст пробірки ретельно перемішували та ставили пробірку в термостат при 37°C на 30 хвилин (протягом цього терміну суміш періодично струшували). Із крові готували мазки, фарбували їх за Романовським - Гімза та продивлялись під мікроскопом. В різних місцях препарату досліджували по 25 нейтрофілів, з підрахунком в кожному з них числа фагоцитованих мікробних клітин. Ступінь фагоцитозу визначали підрахунком кількості мікробних клітин, фагоцитованих лейкоцитами.

Ад'юванти готували та застосовували згідно до інструкцій по застосуванню наданих виробником.

Колір готової емульсії коливався від білого – до світло коричневого, що обумовлювалось інтенсивністю забарвлення поживного середовища на якому проводили напрацювання антигену.

Усі ад'юванти перед додаванням до підготовленого антигену стерилізували автоклавуванням при температурі 120°C протягом 30 хвилин та перед змішуванням з антигеном охолоджували до температури біля 50°C .

Відбір крові у лабораторних тварин проводили шляхом кардіальної пункції за допомогою стерильної довгої голки з дотриманням правил асептики та антисептики.

Для вивчення антигенних властивостей досліджуваних стрептококів використовували імуноферментний аналіз (ІФА) у вигляді непрямого варіанту. Реакцію проводили на 96 лункових стриперованих пластикових планшетах (Nunc®).

При проведенні імуноферментного аналізу використовували негативні сироватки крові до збудника стрептококову свиней від інтактних мурчаків, білих мишей та імунні (позитивні) сироватки крові від мурчаків, мишей імунізованих антигеном, отриманим із культур збудника стрептококозів свиней.

Для отримання гіперімунної сироватки крові мурчаків та мишей імунізували суспензією живих мікроорганізмів. Підшкірно, в ділянці спини, тваринам вводили суспензію, що містила $2,5 \times 10^6$ мікробних клітин з додаванням неповного ад'юванту Фрейнда до 20% від об'єму, в дозі $0,5 \text{ см}^3$. Повторну імунізацію проводили через 14 днів у тій же дозі. Через 21 добу після останнього щеплення тваринам вводили суспензію живих мікроорганізмів в кількості 5×10^6 КУО в дозі 1 см^3 .

Сироватку отримували з крові, яку відбирали на 20-ий день після останнього введення антигену з серця у кількості до 5 см^3 від мурчаків та біля 1 см^3 від мишей.

Результати експериментальних досліджень оброблені загальноприйнятими методами статистики (Ашмарін І. П., Воробйов А.А., 1962). з використанням комп'ютерної програми „Microsoft Exel 7.0”. При цьому вираховували середні арифметичні величини, середнє квадратичне відхилення, достовірність різниці між середніми величинами (критерій значення “Р”).

Результати досліджень.

Для дослідження протективної активності експериментальних зразків емульсин – вакцин за принципом аналогів було сформовано 5 дослідних груп мишей по 10 голів, вагою 18 ± 2 г яких дворазово з інтервалом 14 днів підшкірно вакцинували дослідними варіантами емульсин-вакцин, в дозі $1 \pm 0,12 \times 10^9$ КУО. Кожну групу щепили окремою вакциною.

Усі миші протягом 10 діб після щеплення та до контрольного зараження були клінічно здоровими. Не реєстрували будь-якого негативного впливу вакцин, тобто вакцини були нешкідливими та нереактогенними.

Через 14 днів після другого щеплення, всіх піддослідних та контрольних мишей заражали культурою високо патогенного ізоляту 23 підшкірно в дозі 100 LD_{50} в об'ємі $0,2 \text{ см}^3$ (табл.1).

Таблиця 1

Вивчення нешкідливості та імуногенності експериментальних інактивованих моноштамних емульсин - вакцин проти стрептокококсу свиней(при введенні мишам в дозі $0,2 \text{ см}^3$ з вмістом $1 \pm 0,12 \times 10^9$ інактивованих мікробних клітин)

№ груп	Інактивовані вакцини зі штамів	Кількість голів у групі	Загинуло мишей після контрольного зараження		Захист (%)
			голів	%	
1	Вар.1 (Із суміші штамів 11 та 19)	10	4	40	60
2	Вар.2 (Із суміші штамів 19 та 21)	10	4	40	60
3	Вар.3 (Із суміші штамів 11 та 21)	10	3	30	70
4	Вар.4 (Із суміші штамів 11, 19, 21)	10	3	30	70
5	Контроль позитивний МПБХ (75%)+ Montanide ISA 25 (25%)	10	10	100	-
5	Контроль негативний	10	10	100	-

Захист від загибелі мишей, щеплених різними варіантами інактивованих емульсин-вакцин після зараження складав: Вар.1 – 60%; Вар.2 – 60%; Вар.3 – 70%; Вар.4 – 70%.

При дослідженні крові, відібраної із серця у мишей всіх груп перед контрольним зараженням встановлено, що фагоцитарна активність нейтрофілів у відношенні до бактерій збудника бешихи від тварин піддослідних груп після дворазової вакцинації значно збільшилась в порівнянні з контролем. Спостерігались достовірно збільшення як показника фагоцитарного індексу, так відсотка фагоцитозу ($P < 0,05$). Найбільше збільшення відсотку фагоцитозу реєстрували у мишей після другого щеплення вакциною Вар.4. Його рівень збільшився у два рази з $31,0 \pm 3,42$ до $52,0 \pm 1,77$. При застосуванні вакцини Вар.1 відсоток фагоцитозу збільшився лише з $29,0 \pm 2,31$ до $37,0 \pm 1,12$; вакцини Вар.2 з $29,0 \pm 1,42$ до $47,0 \pm 2,19$; Вар.3 з $26,0 \pm 5,12$ до $48,0 \pm 1,87$ на фоні стабільності фагоцитозу нейтрофілів від мишей контрольної групи.

Такі ж зміни спостерігали при аналізі фагоцитарного індексу. Він збільшився в два рази з $2,0 \pm 0,02$ до $4,2 \pm 0,19$ ($P < 0,001$) лише при застосуванні вакцини Вар.4. Застосування інших вакцин (табл. 2) призводило лише до незначного збільшення показників фагоцитарного індексу при відносній стабільності його у нейтрофілів крові від тварин контрольної групи.

З метою визначення титрів специфічних антитіл, від дослідних та контрольних тварин перед контрольним зараженням відбирали кров пункцією серця та отримували сироватку. При дослідженні сироваток крові від мишей після дворазового щеплення інактивованою емульсин – вакциною вар.1 титри специфічних антитіл до збудника стрептококозів свиней складали – $4,2 \pm 0,11 \log_2$; вакциною Вар.2 – $5,2 \pm 0,11 \log_2$; вакциною Вар.3 – $4,2 \pm 0,11 \log_2$; Вар.4 – $7,3 \pm 0,21 \log_2$ при майже однакових титрах антитіл у всіх тварин до щеплення (рис1).

Таблиця 2

Вивчення фагоцитарної активності макрофагів крові мишей, щеплених інактивованими емульсин-вакцинами проти стрептококозів свиней

Інактивовані вакцини зі штамів	Відсоток фагоцитозу, %		Фагоцитарний індекс, од	
	До щеплення	Після щеплення	До щеплення	Після щеплення
Вар.1 (Із суміші штамів 11 та 19)	$29,0 \pm 2,31$	$37,0 \pm 1,12^*$	$2,51 \pm 0,06$	$4,1 \pm 0,05^{**}$
Вар.2 (Із суміші штамів 19 та 21)	$29,0 \pm 1,42$	$47,0 \pm 2,19^{**}$	$1,9 \pm 0,15$	$3,9 \pm 0,12^{**}$
Вар.3 (Із суміші штамів 11 та 21)	$26,0 \pm 5,12$	$48,0 \pm 1,87^{**}$	$2,3 \pm 0,04$	$3,5 \pm 0,14^{**}$
Вар.4 (Із суміші штамів 11, 19, 21)	$31,0 \pm 3,42$	$52,0 \pm 1,77^{**}$	$2,0 \pm 0,02$	$4,2 \pm 0,19^{**}$
Контрольна група	$28,0 \pm 2,19$	$30,0 \pm 2,84$	$1,9 \pm 0,08$	$1,4 \pm 0,03$

* - $P < 0,05$ ** - $P < 0,001$ в порівнянні з показниками контрольної групи (до щеплення)

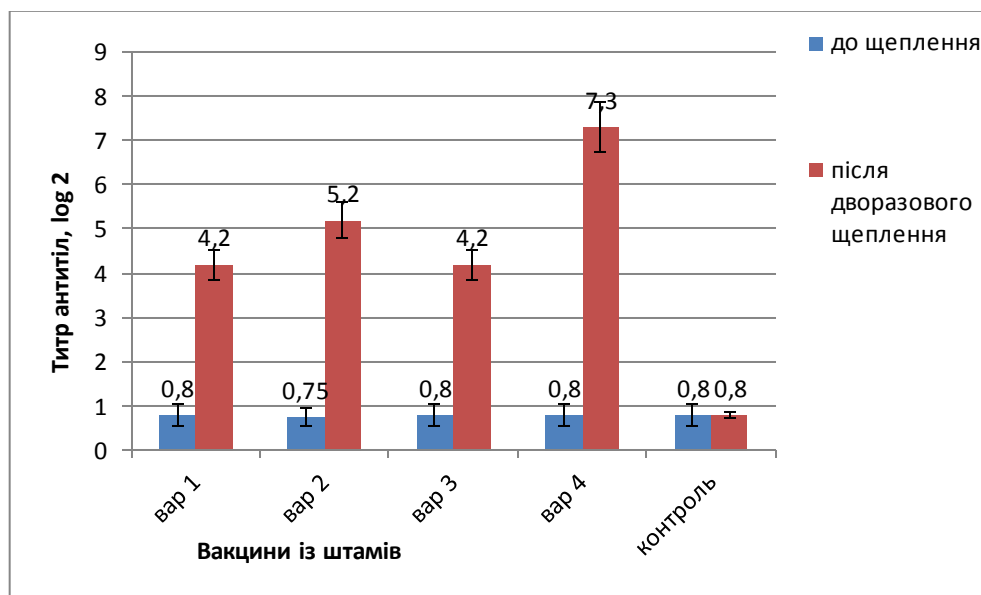


Рис 1. Титри специфічних антитіл сироваток крові мишей, щеплених експериментальними інактивованими вакцинами проти стрептококозу

Таким чином нами в результаті проведених досліджень встановлено, що експериментальна інактивована емульсин-вакцина варіанту 4 (Із суміші штамів 11,19,21), показала найвищі протективні властивості серед всіх досліджених варіантів вакцин.

Висновки

1. На підставі визначення протективних властивостей підбрано та охарактеризовано штами *S.suis* для виготовлення інактивованої вакцини проти стрептококозу свиней; в дослідях на білих мишах підтверджено достатню протективну активність лабораторного зразка вакцини, виготовленої на основі загальноклітинного антигену *S.suis*.

2. Експериментально підтверджено достатню протективну активність антигену збудника стрептококозів в дослідях на мишах. Експериментальна емульсин-вакцина, виготовлена нами на основі інактивованого антигену *S.suis*, через 14 днів після підшкірного введення в дозі 2 млрд. мікробних клітин забезпечувала захист 70% щеплених мишей від загибелі при зараженні патогенним штамом *S.suis* в дозі 100 ЛД₅₀.

Комплексні дослідження стануть підґрунтям для подальших фундаментальних та прикладних досліджень щодо даного збудника.

Список використаної літератури:

1. Clifton-Hadley, F. A., Alexander, T. L., Upton, I., Duffus, W.P. H.. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs.// *Vet Rec.* – 1984. – 114, – P. 513-518.

2. Devriese, L. A., Ceysens, K., Homme, J., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.H., 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. // *Veterinary Microbiol.* – 1991. – №26, – P.141-150.
3. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J., Pijon, C., Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muramidase-released protein and extracellular factor. // *Can. J. Vet. Res.* – 1996. – №60, 72-74
4. Vecht, U., Van Leengoed, L.A.M.G., Verheijen E.R.M., *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (part one). // *Vet. Q.* 1998. – №7, – 315-321.
5. Vecht, U., Arends, Van der J.P., Molen, E.J., Van Leengoed, L.A.M.G., Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. // *Am. J. Vet. Res.* – 1989. – №50, – P.1037–1043.
6. Vecht, U., Wisselink, H.J., Jellema, M.L., Smith, H.E., Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. // *Infect. Immun.* 1991. – №59. – P. 3156-3162.
7. Vecht, U., Wisselink, H.J., Van Dijk, J.E., Smith, H.E., Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. // *Infect. Immun.* – 1992. – № 60, – P. 550-556.
8. Vecht, U., Wisselink H.J., Anakotta J., Smith, H.E., 1993. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay. // *Veterinary Microbiol.* – 1993. – №34. – P. 71-82.
9. Панин А. Н. Эпизоотологические особенности стрептококкоза свиней в условиях промышленного ведения животноводства / А. Н.Панин, Е. И. Цветков // Актуальные вопросы эпизоотологии. Тез. докл. Зсесоюз. научн. конф. – Казань, 1983, с. 116.
10. Панин А. Н. Стрептококкозы свиней / А. Н.Панин // Справочник. Инфек-
11. Панин А.Н. Контроль иммуногенных свойств стрептококков серогруппы 2/ А.Н.Панин, Л.А. Котлова // Совершенствование методов государственного контроля ветеринарных препаратов. Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. – М., 1991, с. 163.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЭМУЛЬСИН-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СТРЕПТОКОККОЗОВ СВИНЕЙ/ Тарасов А. А., Сапейко В. П., Ничик С. А.

В статье представлены результаты исследований экспериментальных образцов вакцин против стрептококкозов свиней на лабораторных животных (белые мыши). Проведено исследование протективной активности при прямом заражении определены показатели фагоцитарной активности и определены титры специфических антител при применении различных вариантов вакцин

Ключевые слова: *streptococcus suis*, антигенные свойства, протективная активность, вакцина, адьювант

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE PROPERTIES OF EXPERIMENTAL / **Tarasov O., Sapeyko V., Nychyk S.**

It was presented the data on investigation of the protective properties of experimental samples of emulsion-vaccine against swine streptococcosis on laboratory animals (white mice). The investigation of the protective action was conducted with using the direct challenge method, phagocytosis indexes and the specific sera yields were detected for different variants of vaccine.

Key words: streptococcus suis, antigenic properties, protective action, vaccine, adjuvant

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **В. В. Уховський**

Рукопис надійшов 27.02. 2014 року.