Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ТАРАСОВ ОЛЕКСАНДР АНАТОЛІЙОВИЧ**

**УДК 619: 579.869.2:615.371**

**Культуральні, молекулярно-біологічні та антигенні властивості вакцинних штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae***

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Української академії аграрних наук

|  |  |
| --- | --- |
| **Науковий керівник** – | кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, членкор УААН  **Ображей Анатолій Федорович,**  Інститут ветеринарної медицини УААН, директор |
| **Офіційні опоненти:** | доктор ветеринарних наук, професор, членкор УААН **Риженко Василь Петрович,**  Інститут ветеринарної медицини УААН, завідувач  лабораторії анаеробних інфекцій |
|  | кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник **Бабкін Михайло Валерійович,**  Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, завідувач відділу біотехнології і контролю якості вірусних препаратів |

Захист відбудеться “18” червня 2008 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному аграрному університеті за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус №3, ауд. № 65

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету за адресою: 03041, м. Київ–41, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус №4, кім. №28

Автореферат розісланий “6” травня 2008 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради С.В. Міськевич

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Бешиха є однією з найбільш поширених хвороб свиней, а її збудник *Erysipelothrix rhusiopathiae* здатний викликати захворювання тварин багатьох видів та людей (Урбан В.П., 1981; Геведзе В.И., Андросик Н.Н., Ленькова В.А., 1982; McCarthy D.H., 1986; Воронин Е.С., Романова М.В., 1987; Bricker J.M., Saif Y.M., 1997; Brooke C.J., Riley T.V., 1999; Wood R.L., 1999; Fidalgo S.G., Riley T.V., 2004).

За кількістю не­благополучних пунктів та рівнем летальності бешиха посідає сьоме місце серед 14 найбільш поширених інфекційних хвороб свиней, а за кількістю профілактичних щеплень – друге місце після профілактичної вакцинації проти класичної чуми свиней (Рахманов A. M., Яременко М. А., 2003).

Дослідженнями вітчизняних та зарубіжних вчених встановлено етіологію бешихи свиней, визначено епізоотологічні особливості її перебігу, розроблено методи діагностики, лікування та специфічної профілактики (Mc Carthy D.H., 1986; Bricker J.M., Saif Y.M., 1997; Brooke C.J., Riley T.V., 1999; Wood R.L., 1999; Fidalgo S.G., Riley T.V., 2004).

Однак, незважаючи на систематичні щеплення свиней, застосування антибіо­тиків та проведення ветеринарно-санітарних заходів, захворювання на бешиху свиней виявляють як в Україні, так і в країнах близького та далекого зарубіжжя.За допомогою проведених в останні роки досліджень встановлено, що спалахи бешихи в нашій державі зумовлені відсутністю достатньо ефективної та безпечної інактивованої вакцини проти бешихи свиней (Сініцин В.А., Ображей А.Ф., Остапець М.Г., Трясоруб О.Я., 1995).

Створення високоефективних вакцин потребує вивчення імуногенезу на молекулярному рівні, адже спонтанні та індуковані мутації спричиняють утворення нових штамів, у тому числі придатних для використання як виробничих (Shimoji Y., Mori Y., Fischetti V.A., 1999).

Для запобігання захворювання свиней на бешиху в Україні застосовують три живі вакцини – із штаму *E. rhusiopathiae* ВР-2, вар. ІВМ, із штамів ВР-2 і 6/24 (комерційна назва “Рузівак”), із штаму матриксу другої вакцини Конєва (комерційна назва „Бешивак”) та одну інактивовану – концентровану ГОА формолвакцину (комерційна назва „Бешиформ”) (Вербицький П.І., Головко А.М., 2004).

За даними Н.И. Тарасенок (1974), Y. Shimoji з співавторами (1994), Y. Imada з співавторами (1999, 2004), застосування живих вакцин на основі атенуйованих штамів, у тому числі ВР-2, може призвести до виникнення поствакцинальної бешихи свиней через наявність у вакцинних штамів гетерогенності за ознакою вірулентності.

У зв’язку з відсутністю в Україні високоефективної інактивованої вакцини проти бешихи свиней та потенційною небезпекою застосування живих вакцин, світовою тенденцією переходу до використання лише інактивованих вакцин, підбір високоімуногенних штамів з урахуванням їх культуральних, антигенних та молекулярно-біологічних особливостей, оптимізація складу живильних середовищ та режимів культивування бактерій бешихи для забезпечення максимального накопичення біомаси, придатної для створення ефективних інактивованих вакцин проти бешихи свиней, є актуальною проблемою, розв’язання якої дозволить ефективно вирішувати питання специфічної профілактики бешихи свиней.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є складовою частиною науково-дослідних робіт Інституту ветеринарної медицини Української академії аграрних наук за державним завданням на 2001–2005 рр. 06.03.01 “Розробити інактивовану емульсин-вакцину проти бешихи свиней”, номер державної реєстрації 0101U000790.

**Мета і завдання дослідження.** Метою досліджень було вивчення культуральних, молекулярно-біологічних та антигенних властивостей штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* та пошук виробничого штаму, найбільш придатного для виготовлення інактивованих вакцин.

Для досягнення мети було висунено такі завдання:

* вивчити культуральні, ферментативні, антигенні, молекулярно-біологічні та імуногенні властивості наявних у колекції Інституту ветеринарної медицини УААН штамів збудника бешихи свиней;
* провести молекулярно-біологічні дослідження перспективних штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae*;
* оптимізувати склад живильних середовищ для культивування вакцинного штаму бактерій бешихи;
* розробити метод інактивування вакцинних штамів та підібрати оптимальний ад’ювант для конструювання інактивованої вакцини проти бешихи свиней;
* провести дослідження лабораторних зразків інактивованих моно- та полівакцин на нешкідливість та імуногенність в дослідах на лабораторних тваринах;
* вивчити придатність та ефективність експериментально підібраного вакцинного штаму бактерій бешихи для виробництва інактивованої вакцини.

*Об’єкт дослідження* –збудник бешихи свиней та засоби її специфічної профілактики.

*Предмет дослідження* – визначення культурально-морфологічних, молекулярно- біологічних, антигенних, імуногенних та протективних властивостей штамів бактерій бешихи свиней*.*

*Методи дослідження.* Вивчення культуральних, ферментативних та молекулярно-біологічних властивостей штамів бактерій бешихи проводили загальноприйнятими методами після культивування на живильних середовищах, облік накопичення біомаси *E. rhusiopathiae* здійснювали методом послідовних розведень з подальшим висіванням на щільні живильні середовища; специфічні сироватки одержували методом гіперімунізації лабораторних тварин антигенами бактерій різних штамів; вивчення молекулярно-біологічних властивостей проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); аналіз протеїнового профілю бактерій бешихи досліджували за допомогою електрофорезу в поліакріламідному гелі; антигенні властивості збудника бешихи відносно специфічних сироваток крові та наявність специфічних антитіл досліджували методом непрямого ІФА; ефективність вакцин вивчали зараженням щеплених тварин контрольними патогенними штамами *E. rhusiopathiae* 149 і К*.*

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше в Україні проведено молекулярно-біологічні дослідження за геном основного протективного білка spaA музейних, вакцинних та окремих польових штамів *E. rhusiopathiae*, що використовуються для виробництва вакцин, та епізоотичних штамів, які циркулюють в Україні.

Розраховано специфічні праймери та розроблено „Метод виявлення бактерій роду *Erysipelothrix* виду *Erysipelothrix rhusiopathiae* у біоптатах або патологічному матеріалі, або кормах, або об’єктах зовнішнього середовища” (деклараційний патент України на корисну модель №10834, опубл. 15.11.2005 р.).

Уперше в гені spaA штаму М-2 ВК, який запропоновано як виробничий для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней, виявлено інсерційну мутацію (деклараційний патент України на корисну модель № 10833, опубл. 15.11.2005 р.).

Розроблено оптимальну рецептуру живильного середовища та відпрацьовано режим культивування для забезпечення максимального накопичення біомаси бактерій бешихи.

Уперше виготовлено інактивовану емульсин-вакцину проти бешихи свиней на основі антигену *Erysipelothrix rhusiopathiae* штаму М-2 ВК (реєстраційне посвідчення № 1933-04-0241-06 від 4 липня 2006 р.) та експериментально підтверджено її протективну активність у дослідах на мишах та свинях.

**Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення представленої дисертаційної роботи полягає у селекціонуванні вакцинного штаму *E. rhusiopathiae* М-2 ВК на підставі виявлення в гені spaA інсерції, яка обумовила його високу імуногенну активність; у розробці модифікованого середовища Фейста та обґрунтуванні оптимальних умов культивування вакцинного штаму; у підборі методу інактивування та застосуванні як ад’юванта Montanide ISA 25 (Seppic, France). Результати досліджень використані при розробці впровадженої у виробництво нормативної документації на біопрепарат «Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована», ТУ У 24.4 – 05510830 – 059:2006, реєстраційне посвідчення №1933-04-0241-06 від 4 липня 2006 р. Матеріали роботи використані при розробці діагностикуму бешихи свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції „ТУ У 24.2 – 05510830 – 067: 2006 Тест-система „Бешиха – ПЛР тест” для виявлення ДНК *Erysipelothrix rhusiopathiae* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)”.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто проаналізовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, розроблено методичні підходи до вирішення поставлених завдань, проведено лабораторні дослідження з підбору та оптимізації живильних середовищ, експериментальні дослідження при вивченні імуногенності інактивованих вакцин у дослідах на лабораторних тваринах, дослідження антигенної спорідненості штамів збудника бешихи, проаналізовано і узагальнено одержані результати, виконано їх статистичну обробку, сформульовано висновки та пропозиції виробництву, опубліковано результати досліджень та оформлено рукопис дисертації.

Дослідження молекулярно-біологічних особливостей бактерій бешихи виконувались у співавторстві з керівником наукової роботи – кандидатом ветеринарних наук А.Ф. Ображеєм та завідувачем лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини УААН О.М. Дерябіним, який надавав методичну допомогу при проведенні імуноферментного аналізу.

Науковий керівник, кандидат ветеринарних наук Ображей Анатолій Федорович брав безпосередню участь у проведенні досліджень, обробці та інтерпретації отриманих результатів, а також забезпечував надання необхідної методичної допомоги при плануванні досліджень. Досліди на свинях при вивченні протективної активності інактивованої вакцини, виготовленої на основі антигену, отриманого із бактерій бешихи експериментально підібраного вакцинного штаму, були проведені спільно з А.Ф. Ображеєм та І.І. Матяжом, що відображено у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідались і були схвалені на засіданнях вченої ради Інституту ветеринарної медицини УААН у 2001–2006 рр.; на засіданні методичної комісії Інституту ветеринарної медицини УААН 15 жовтня 2005 р.; конференції „Ветеринарна медицина – 2005: сучасний стан та актуальні проблеми забезпечення ветеринарного благополуччя тваринництва” (30 травня – 4 червня 2005 р., АР Крим, м. Ялта); науково-практичній конференції „Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології” (22–25 травня 2007 р., АР Крим, м. Феодосія); Міжнародному науково-практичному семінарі „Проблеми загальної ветеринарної профілактики (гігієна та санітарія, екологія, добробут тварин, етологія)” (24–25 травня 2007 р., м. Львів), Міжнародній науково-практичній конференції „Інно-ваційність розвитку сучасного аграрного виробництва” (18–19 жовтня 2007 р., м. Львів).

Публікації. **Основний зміст дисертації висвітлений у 13 наукових працях, з яких 8 опубліковані у фахових виданнях згідно з переліком ВАК України.**

**Об’єм і структура дисертації.** Дисертація викладена на 200 сторінках комп’ютерного тексту (з них 122 сторінки – основного тексту) і містить розділи: вступ, огляд літератури, загальну методику та основні методи досліджень, результати експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел, додатки. Робота ілюстрована 30 рисунками та 16 таблицями. Список використаної літератури нараховує 279 джерел, у тому числі 209 – далекого зарубіжжя.

**основний зміст РОБОТИ**

**ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ВИКОНАНЯ РОБОТИ**

**Загальна методика та основні методи досліджень.** Робота виконувалась впродовж 2000–2006 рр. у лабораторіях біотехнології бактеріальних препаратів та молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини УААН. Дослідження протективної активності експериментальної вакцини проти бешихи свиней, виготовленої на основі антигену *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, проводили в умовах господарства АПК „Криворіжсталь” (нинішня назва – АПК ВАТ „Арселор Міттал Кривий Ріг”).

При вивченні молекулярно-біологічних та антигенних властивостей *E. rhusiopathiae* використовували TEMED, 2-МЕ, ЕДТА – Merck; акріламід (2Х), бісакріламід, персульфат амонію – Serva®; Coomassie R250 та Coomassie G250, Тween-20, Тріс-HCl, oртофенілендіамін, антитіла проти імуноглобулінів свині та миші, мічені пероксидазою хрону – Sigma®; гліцерин – Fluka®; агарозу NA, бромистий етидій, маркери молекулярної маси білків – Pharmacia®; маркер "1 kb DNA ladder" – Stratagene®; маркер “100 b(+) DNA ladder” – Fermentas®; БСА (fr.V) – Boehringer Mannheim; Montanide ISA-25 (Seppіc®); повний та неповний ад’юванти Фрейнда – Difco®; знежирене молоко, мікробіологічні барвники – генціанвіолет, фуксин, розчин Люголя, метиленовий синій.

У роботі використовували штами бактерій E. rhusiopathiae 27, 149, 193, 251, 419, 1689, 1893, 1933, ВР-2 вар. ІВМ, М-2 ВК, К та Ш.

Вивчення нешкідливості, імуногенності та протективних властивостей експериментальних вакцин проводили на 1170 білих мишах масою 17±1г, 20 мурчаках масою 250±50 г та 124 підсвинках 3,5–4-місячного віку.

Для культивування *E. rhusiopathiae* застосовували м’ясопептонний бульйон та агар Хотінгера (МПБХ та МПАХ). При пошуку оптимального середовища для культивування вакцинних штамів бактерій бешихи в порівняльному аспекті використовували середовище Фейста (СФ), виготовлене за прописом автора (Feist H. et al., 1976) та модифіковане нами середовище Фейста (СФМ) складу: 6 г глюкози, 15 г пептону (Becton Dickinson, USA), 5 г дріжджового екстракту (Difco), 0,5 г аргініну (Sigma), 0,5 cм3 олеїнової кислоти (Merck), 0,2 г сульфату заліза (Merck) та 0,02 г сульфату цинку (Merck) в 0,2 M натрієвому фосфатному буфері, води дистильованої до 1000 cм3(рН середовища 7,6±0,2).

Культивування бактерій бешихи у рідких живильних середовищах проводили за температури (36,7±0,3) °С протягом 18–24 годин, на щільних – 48–72 години.

Тинкторіальні властивості культур бактерій бешихи вивчали візуально, продивляючись пробірки у проникаючому світлі. Морфологію колоній вивчали при триразовому збільшенні за допомогою лупи. Типовість бактерій та наявність дегенеративних форм визначали при мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом.

Вивчення біохімічних (ферментативних) властивостей штамів бактерій бешихи проводили за допомогою тест-системи API® Сoryne фірми BioMeriex, France.

Кількість бактерій бешихи в культуральних рідинах визначали методом послідовних розведень з подальшим висіванням на агар Хотінгера і виражали у колонієутворюючих одиницях (КУО).

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей ДНК штамів бактерій бешихи, що досліджувались, а також розрахунок олігонуклеотидних праймерів виконували за допомогою програмного забезпечення „Vector NTI” v.8.0 (InforMax®). При розрахунку специфічних олігонуклеотидних праймерів були використані послідовності ДНК бактерій бешихи, які зареєстровані в міжнародній базі даних сиквенсів генів GenBank, що є складовою міжнародного проекту International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Як вихідна матриця була використана повна послідовність гена білка spaA (реєстраційний номер за міжнародним банком генів АВ019124) (Shimoji Y. et al. 1999; Shimoji Y., 2000).

Синтез розрахованих нами праймерів був виконаний фірмою “ThermoHybaid. BioSciences” (Німеччина).

Для вивчення молекулярно-біологічних властивостей штамів бактерій бешихи застосовували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

Електрофорез білків проводили з метою аналізу протеїнового профілю бактерій бешихи із застосуванням методу електрофорезу в 12 % та 15 % поліакріламідному гелі у денатуруючих умовах за методикою U. Laemmli (1970).

Для вивчення антигенних властивостей досліджуваних бактерій бешихи різних штамів використовували імуноферментний аналіз у вигляді непрямого варіанта (Imada Y., Mori Y., Daizoh M. at al., 2003). Реакцію проводили на 96-лункових стриперованих пластикових планшетах (Nunc®).

З метою підбору методу інактивування культур *E. rhusiopathiae* в порівняльному аспекті добові культури бактерій спочатку інактивували додаванням 0,3 %-го розчину формаліну (Merck®) (Н2СО)n (37 %-й водний розчин формальдегіду) з подальшим витримуванням при кімнатній температурі (18–20 °С) протягом 96 годин. Формалін перед змішуванням з культурою розводили стерильним фізіологічним розчином в об’ємному співвідношенні 1:1. В другому варіанті до культур бактерій бешихи додавали 0,1 Н розчин натрію гідроксиду, доводячи до рН 12 та витримували при кімнатній температурі 6 годин, після чого додаванням 1Н розчину HCl рН інактивованої культури доводили до 7,3±0,1.

Для підбору ад’юванту, придатного для виготовлення інактивованих вакцин проти бешихи свиней, ми в порівняльному аспекті вивчили та дослідили: 10 %-й розчин алюмінію гідроксиду, який додавали до добових бульйонних культур бактерій бешихи в кількості 4 %; суміш вазелінової олії з ланоліном у об’ємному співвідношенні 83 : 17 та суміш мінеральної олії Marcol 52 (ESSO®, France) з ланоліном у співвідношенні 70 : 30, які додавали до культури в кількості 50 %; готовий ад’ювант Montanide ISA 25 (Seppic®, France), який додавали до культури в об’ємі 25 %.

При виготовленні експериментальних зразків емульсин-вакцин як водну фазу використовували добові бульйонні культури бактерій бешихи, інактивовані 0,3 %-м формаліном.

Щеплення тварин проводили з дотриманням правил асептики та антисептики. Щеплення мишей здійснювали шляхом підшкірного введення вакцин за допомогою шприца в об’ємі 0,2 см3. Свиням вакцину вводили внутрішньом’язово в дозах, передбачених схемою досліду.

Контрольне зараження мишей проводили шляхом підшкірного введення 0,2 см3 культури *E. rhusiopathiae* контрольного штаму 149 з вмістом 100 LD50 живих бактерій бешихи. Періодично перед зараженням визначали LD50 контрольного штаму для білих мишей.

Контрольне зараження свиней проводили шляхом внутрішньодермального введення бактерій *E. rhusiopathiae* К, розведених фізіологічним розчином, з латеральної сторони тіла, посередині умовної лінії від лопатки до стегна в 5 місць на відстані між ними 2–3 см в об’ємі по 0,2 см3. Всього кожній тварині сумарно вводили по 3 ×106 бактерій бешихи штаму К в об’ємі 1 см3.

Всіх заражених тварин щоденно протягом 10 діб піддавали індивідуальному клінічному огляду та дворазовій термометрії о 8 та 17 годинах. Оцінювали стан тварин, розмір та характер запалення шкіри в місцях внутрішньодермального зараження.

Активність нейтрофілів крові визначали в опсоно-фагоцитарній реакції за загальноприйнятим методом (Чумаченко В.Е. із співавт., 1990).

Протективну активність експериментальної інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней, виготовленої на основі антигену бактерій *E. rhusiopathiae* штаму М-2 ВК з ад’ювантом Montanide ISA 25, вивчали в комісійних дослідах на свинях за розробленою нами методикою, яка була затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини України (наказ № 53 від 05.05.2005 р.).

Всього було щеплено 109 підсвинків, у тому числі:

- три групи тварин (№№ 1, 2 та 3), відповідно, по 14, 25 та 27 голів, вакцинували дворазово з інтервалом 14 діб у дозах по 1, 2 та 3 см3, із вмістом по 2, 4 та 6×109 бактерій бешихи (по 4, 8 і 12 ×109 м. к.);

- одну групу тварин (№ 4) в кількості 27 голів щепили одноразово в дозі 4 см3 (8×109 м. к.).

З метою визначення напруженості імунітету проти бешихи у вакцинованих свиней через 46 та 180 днів після останнього щеплення від дослідних груп відбирали по 5 вакцинованих та 5 контрольних тварин та заражали внутрішньодермально патогенними бактеріями збудника бешихи контрольного штаму К у попередньо підтитрованій дозі.

Результати експериментальних досліджень оброблені загальноприйнятими методами статистики (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962) з використанням комп’ютерної програми „Microsoft Excel 7.0”. При цьому визначали середню арифметичну величину (М), її середньоквадратичне відхилення (σ) та похибку середньої арифметичної (m). Вірогідність середніх величин (Р) між групами або в порівнянні з вихідними даними визначали за критерієм Ст’юдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ**

**Вивчення морфологічних та культурально-біохімічних властивостей збудника бешихи свиней різних штамів.** Бактерії бешихи всіх штамів, що досліджувались (авірулентного штаму ВР-2 вар. ІВМ, патогенних контрольних штамів 149, К, Ш та помірно патогенних штамів 1933, 419, М-2 ВК, 1689, 1893, 93, 251), характеризувалися типовими культурально-морфологічними ознаками і добре росли в МПБХ та на середовищі Фейста з утворенням через 20–24 годин помутніння без плівки та пристінного кільця, яке при струшуванні мало вигляд так званих „муарових хвиль”, а при стоянні культур з часом утворювався осад, який при струшуванні піднімався у вигляді косички. На МПАХ через 48–72 години культивування бактерії бешихи утворювали дрібні гладенькі, прозорі, росинчасті колонії з рівними краями (S-форми), які через 72–96 годин набували ніжно-блакитного кольору. В мазках спостерігали Грам-позитивні тонкі, прямі палички, розташовані поодиноко або попарно. При вивченні ферментативних властивостей *E. rhusiopathiae* з використанням системи API® Сoryne („Biomeriex”, France) встановлено, що всі досліджувані штами позитивно реагували з піролідоніларіламінідазою та ацетил-Β-глюкозамінідазою, ферментували глюкозу та лактозу. Ферментативні властивості авірулентного штаму ВР-2 вар. ІВМ, патогенних контрольних штамів 149, К, Ш та помірно патогенних штамів 1933, 419, М-2 ВК, 1689, 1893, 93, 251 не відрізнялися.

**Вивчення молекулярно-біологічних властивостей збудника бешихи.** В дослідженнях були використані розраховані нами дві пари олігонуклеотидних праймерів:

– #ЕR1 та #ЕR2, які фланкують регіон гена spaА *E.  rhusiopathiae*, що дозволяє диференціювати *Е.  rhusiopathiae* від *E. tonsillarum*:

#ЕR1 – 5'-CGATTATATTCTTAGCACGCAACG-3'

#ЕR2 – 5'-TGCTTGTGTTGTGATTTCTTGACT-3'

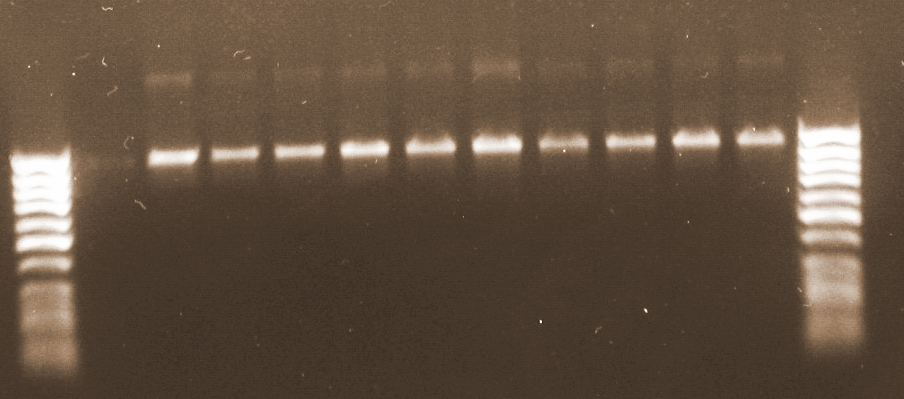
– #spaА\_sn та #spaА\_asn, які фланкують повний ген spaА *E.  rhusiopathiae*:

#spaА\_sn – 5'-CATATGAAAAAGAAAAAACACC-3'

#spaА\_asn – 5'-GTCGACCAGATTTTAAACTTCCATCGTTC-3'

При електрофорезі результатів ампліфікації ДНК авірулентного штаму ВР-2 вар. ІВМ, патогенних польових ізолятів К та Ш, помірно вірулентних виробничих штамів 1933, 419, 1893, 93, М-2 ВК, контрольних заражаючих штамів 149 (для мишей) та 27 (для голубів) не встановлено відмінностей в досліджуваній ділянці ДНК гена spaА, на який були розраховані праймери (рис. 1). Розмір ампліфікатів у всіх досліджуваних штамів становив 914 нуклеотидних пар (н.п.).

Цим було підтверджено гіпотезу про консервативність даної ділянки гена spaА *E.  rhusiopathiae*  та встановлено, що різниця в патогенності між зазначеними штамами не обумовлена відмінностями в дослідженій ділянці гена spaА.



М К(-) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 М

Рис.1. Електрофореграма результатів ампліфікації ДНК штамів

*E. rhusiopathiae* з праймерами #ЕR1 та #ЕR2, штами:

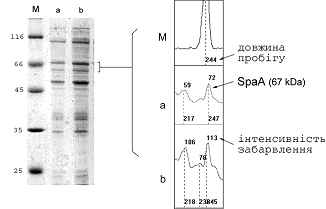
1 – М-2 ВК; 2 – Ш; 3 – К; 4 – ВР-2 вар. ІВМ; 5 –1933; 6 – 93; 7 – 149; 8 – 419;

9 – 1893; 10 – 27; М – маркери молекулярної ваги (“100 bp DNA ladder”);

К(-) – негативний контроль.

При електрофоретичному дослідженні отриманих нами ампліфікатів ДНК повного гена spaА *E. rhusiopathiae* встановлено, що їх розмір у всіх штамів, що досліджувались, відповідав розрахунковим даним – 1880 п. н., за винятком ДНК бактерій штаму М-2 ВК, розмір ампліфікату якої був більшим, ніж у інших штамів, і становив близько 2266 н. п. Нами було зроблено припущення, що це обумовлено наявністю інсерційної мутації в гені spaА *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, завбільшки орієнтовно 400 н.п. (рис. 2).

Електрофоретичним дослідженням в поліакриламідному гелі сумарного бактеріального білка *Erysipelothrix rhusiopathiae*  М-2 ВК, у якого виявлено відмінності в розмірі гена spaA, нами було встановлено, що піку 66 кДа білкового маркера відповідає пік білка з молекулярною масою близько 67 кДа (рис. 3), який був ідентифікований нами як spaA, що відповідало розмірам цього білка, описаним J.E. Galan, J.F. Timoney, 1990 та I. Imada, N. Goji, H. Ishikawa et al., 1999. На підставі проведених досліджень ми зробили висновок, що зміни в гені spaA *E. rhusiopathiae*  штаму М-2 ВК не впливають на продукування білка spaA.





|  |  |
| --- | --- |
| 1 2 3 4 5 6 М1 7 8 9 М2  Рис 2. Електрофореграма результатів ампліфікації гена spaА ДНК  *E. rhusiopathiae* з праймерами #spaА\_sn та #spaА\_asn, штами:  1 – 149, 2 – 419, 3 – Ш, 4 – 93, 5 – М-2 ВК, 6 – 1933, 7 – 1689, 8 – ВР-2 вар. ІВМ;  9 – 251; М1 – ДНК маркер „100b+”; М2 – ДНК маркер "1kb”. | Рис 3. Електрофорез сумарного білка *E. rhusiopathiae* М-2ВК:  a – загальний білок, нанесений в кількості 1 мкг на лунку;  b – загальний білок, нанесений в кількості 5 мкг на лунку;  М – маркер молекулярної ваги. |

**Вивчення антигенної спорідненості бактерій бешихи свиней різних штамів.** При проведенні досліджень цільноклітинних антигенів бактерій бешихи штамів 93, 251, 149, 1933, К, ВР-2 вар. ІВМ, М-2 ВК у непрямому варіанті ІФА встановлено, що всі вони проявили антигенну активність по відношенню до специфічних сироваток крові, отриманих на антигени *E. rhusiopathiae*  штамів 149, К, ВР-2 вар. ІВМ, Ш та М-2 ВК.

Найвищу активність проявили антигени бактерій бешихи штамів М-2 ВК та 1933 як з гомологічними, так і з гетерологічними сироватками, отриманими на антигени патогенних штамів 149 та Ш та на антиген авірулентного штаму ВР-2 вар. ІВМ. Ці штами ми використовували при створенні експериментальних зразків інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней.

**Визначення вірулентності *E. rhusiopathiae* для лабораторних тварин.** Для визначення патогенності музейних штамів збудника бешихи свиней *E. rhusiopathiae* за LD50 було проведено серію дослідів на мишах.

У результаті проведених досліджень встановлено, що найвищою патогенністю характеризувалися штами *E. rhusiopathiae* 149(LD50  для білих мишей становила 144±20 КУО на голову) і К (LD50 для білих мишей становила 187±9 КУО на голову), дещо нижча вірулентність виявлена у штаму Ш, LD50 якого становила 922±218 КУО на білу мишу. Ці штами можуть бути запропоновані для застосування як контрольні заражаючі при дослідженні імуногенності та протективних властивостей вакцин. Штами, що застосовувалися для виготовлення інактивованих вакцин, характеризувалися середньою або слабкою вірулентністю для білих мишей (LD50 коливається від 14926±607 КУО у штаму 93 до 59721±1847 КУО у штаму 1933). Штам ВР-2 вар. ІВМ, який застосовують для виготовлення живої вакцини проти бешихи свиней, був непатогенним для мишей навіть в дозі, більшій 1×106 КУО на мишу.

**Визначення заражаючої дози патогенних штамів бактерій бешихи для мишей та свиней.** Для визначення LD50 контрольного високовірулентного штаму *E. rhusiopathiae* 149 було проведено дослід на мишах з восьми груп (по десять голів у групі), яким підшкірно в ділянці спини вводили по 0,2 см3 розтитрованої фізіологічним розчином сухої бульйонної культури з вмістом живих бактерій в кількості від 15±6 до 1000±49 в 1 см3. У результаті дослідів було встановлено, що LD50 контрольного штаму 149 для мишей становила 104±3,3 КУО.

З метою визначення інфікуючої дози *E. rhusiopathiae* контрольного штаму К для зараження свиней при визначенні імуногенності вакцин було підібрано три групи тварин по 5 голів породи велика біла віком 3,5 місяців, клінічно здорових з температурою тіла в межах фізіологічної норми, не вакцинованих проти бешихи свиней.

Свиней дослідних груп заражали живими бактеріями бешихи контрольного штаму К внутрішньодермально. Свиням кожної групи вводили по 1 см3 культури з вмістом для свиней групи № 1 – 2×106 бактерій бешихи, групи № 2 – 1×106 бактерій бешихи, групи № 3 – 0,5×106 бактерій бешихи.

Захворювання свиней контрольної групи розпочиналося переважно на другу добу після введення патогенних бактерій бешихи. В місцях введення спостерігали характерне для бешихи запалення шкіри. З розвитком захворювання температура тіла підвищувалась до 42 °С. У деяких заражених свиней процес набував генералізації. Спостерігали слабкість кінцівок, яка прогресувала – свині переважно лежали і майже не рухались.

Таким чином, ми встановили, що оптимальною заражаючою дозою збудника, яка викликає захворювання 100 % свиней, є доза 1±0,04×106 бактерій бешихи штаму Кпри внутрішньодермальному способі введення.

**Підбір живильних середовищ та оптимізація умов культивування бактерій бешихи.** З метою підбору найбільш придатних живильних середовищ та оптимізації умов культивування для одержання максимальних кількостей бактеріальної маси *E. rhusiopathiae* чотири штами (149, ВР-2 вар. ІВМ, М-2 ВК, Ш) в порівняльному аспекті культивували на МПБХ, середовищі Фейста (СФ) та модифікованому нами середовищі Фейста (СФМ) за температури (36,7±0,3) °С протягом 24 годин.

Методом посіву серійних розведень отриманих добових культур на МПАХ встановлено, що найбільший вміст бактерій всіх штамів отримано при культивуванні на СФМ. Вміст живих бактерій бешихи в культурах при вирощуванні на СФМ коливався від 8,56±0,08 ×109 (штам 149) до 10,57±0,45×109 (штам К) КУО в 1 см3, що в 2,7 рази (р < 0,05) перевищувало їх вміст при культивуванні в МПБХ (від 2,27±0,03×109 КУО (штам 149) до 4,17±0,03×109 КУО (штам К) в 1 см3 культури), та в 1,46 рази (р < 0,05) – при культивуванні на СФ (від 5,82±0,04×109 КУО (штам ВР-2 вар. ІВМ) до 6,88± 0,01×109 КУО (штам К) в 1 см3 культури). Найбільше накопичення бактеріальної маси *E. rhusiopathiae* М-2 ВК – 9,02±0,04×109 КУО в 1 см3 ми отримували лише при культивуванні на СФМ.

Найбільше накопичення бактеріальної маси штамом М-2 ВК при культивуванні на СФМ підтверджувалось також вимірюванням оптичної густини відповідної культуральної рідини через 24 години після засівання. На СФМ вона становила 5,01±0,04 одиниць, СФ – 3,53±0,03 одиниць, на МПБХ – 2,77±0,03 одиниць.

Культивування окремих штамів збудника бешихи в середовищі МПБХ призводило до зменшення вихідного значення рН середовища з 7,3±0,1 до 6,23±0,07 (штам ВР-2 вар. ІВМ) та до 5,17±0,03 (штам М-2 ВК); в СФ – до 6,68­±0,12 одиниць (штам ВР-2 вар. ІВМ) та до 4,95±0,06 (штам К). При культивуванні штамів у СФМ значення рН зменшувалось до 6,53±0,13 (штам 149) та 6,75±0,06 (штам ВР-2 вар. ІВМ).

При додатковому дослідженні динаміки росту *E. rhusiopathiae*  М-2 ВК порівняно з апатогенним вакцинним штамом ВР-2 вар. ІВМ було підтверджено, що максимальне накопичення бактерій (9,8–11,4 ×109 КУОв 1 см3) проходить на 18 годину культивування на середовищі СФМ при (36,7±0,3) °С (рис.4).

Рис. 4. Накопичення біомаси *E. rhusiopathiae* М-2 ВК при культивуванні в рідких середовищах.

### Підбір методів інактивування бактерій бешихи виробничих штамів. При додаванні до культур E. rhusiopathiae штамів М-2 ВК, ВР-2 вар. ІВМ та К 0,3 % розчину формаліну з подальшим витримуванням при кімнатній температурі (19±1) °С протягом 96 годин спостерігали повну інактивацію бактерій бешихи, що підтверджувалось відсутністю росту на всіх середовищах та збереженням структури клітин.

Додавання 0,1 Н розчину натрію гідроксиду до рН 12 та витримування при кімнатній температурі протягом 6 годин з подальшим зменшенням рН культури до 7,3±0,1 додаванням 1Н розчину HCl також забезпечувало повне інактивування бактерій, але призводило до порушення антигенної структури.

З метою забезпечення збереження структури клітин, зручності застосування та забезпечення консервуючої дії для інактивування бактерій бешихи виробничих штамів нами було рекомендовано 0,3 %-й розчин формаліну з подальшим витримуванням при кімнатній температурі (19±1)°С протягом 96 годин.

## Підбір ад’ювантів для інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи.

**З метою підбору оптимальних ад’ювантів до інактивованих 0,3 %-м формаліном добових культур бактерій бешихи окремо додавали 4 % 10-відсоткового розчину алюмінію гідроксиду, по 50 % суміші вазелінової олії з ланоліном та суміші мінеральної олії марколу з ланоліном, а також ад’ювант Montanide ISA 25 в кількості 25 % і перемішували протягом 3**–**5 хвилин до утворення стійкої емульсії.**

Лише ад’ювант Montanide ISA 25, який додавали до культури в кількості 25 %, забезпечував утворення стійкої однорідної емульсії за консистенцією, подібною до молока, яка не розшаровувалась при зберіганні протягом 12 місяців (термін спостереження), та придатної для введення тваринам без додаткових підігрівань. Після підшкірного та внутрішньом’язового введення цієї емульсії лабораторним тваринам та свиням у місці введення утворювалось незначне припухання, яке протягом 10–14 діб повністю розсмоктувалось без будь-якого впливу.

Емульсії на основі сумішей вазелінової олії та ланоліну, а також марколу з ланоліном були густими, потребували додаткового підігрівання для зручного введення за допомогою шприца, а в місцях внутрішньом’язового введення тваринам викликали припухання, що не розсмоктувались протягом 14 днів і більше.

**Виготовлення експериментальних серій інактивованих емульсин-вакцин проти бешихи свиней, дослідження на нешкідливість, реактогенність та імуногенність на мишах.** Для вивчення імуногенності та нешкідливості запропонованих нами штамів *E. rhusiopathiae*  ми виготовили вакцини із інактивованих формаліном бактерій штамів М-2 ВК, 251 та 1933; суміші інактивованих бактерій штамів 1933 та М-2 ВК, а також із суміші бактерій штамів 1933, 251 та М-2 ВК (табл. 1) з вмістом 1±0,1×109 інактивованих бактерій бешихи в 0,2 см3 з додаванням 25 % ад’юванту Montanide ISA 25.

Всі варіанти експериментальних зразків вакцин протягом 10 діб після підшкірного введення в дозі 0,2 см3 (1±0,1×109інактивованих бактерій) не спричиняли захворювань, загибелі або інших змін у піддослідних мишей, що свідчить про їх нешкідливість та ареактогенність.

Після підшкірного контрольного зараження всіх піддослідних мишей *E. rhusiopathiae* штаму 149 у дозі 100LD50 було встановлено, що кращий захист (92 %) забезпечувала вакцина із штаму М-2 ВК, найгірший був пов’язаний з вакцинами, виготовленими із антигенів штамів 1933 та 251 (по 25%), а у вакцин, виготовлених із антигенів суміші штамів, протективний ефект залежав від вмісту антигену штаму М-2 ВК та становив 67 % при застосуванні вакцини, виготовленої на основі антигену двох штамів та 33 % – трьох штамів (табл. 1).

Для підтвердження гіпотези щодо найвищої імуногенної активності штаму *E. rhusiopathiae* М-2 ВК на мишах, щеплених в дозі 1±0,12×109 інактивованих мікробних клітин (м.к.) в 0,2 см3, були досліджені експериментальні інактивовані вакцини, виготовлені за тією ж технологією з антигенів штамів *E. rhusiopathiae* – М-2 ВК; 93; 251; 419 та 1933.

*Таблиця 1* – **Показники нешкідливості та імуногенності інактивованих емульсин-вакцин проти бешихи свиней, виготовлених на основі ад’юванта Montanide ISA 25 в дослідах на білих мишах, щеплених у дозі 0,2 см3 (1±0,1 ×109 м.к.)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер груп | Емульсин - вакцини, виготовлені із штамів | Кількість щеплених тварин | Загинуло мишей після зараження | | Залиши-лось живими | |
| голів | % | голів | % |
| 1 | 1933 | 12 | 9 | 75 | 3 | 25 |
| 2 | М-2 ВК | 12 | 1 | 8 | 11 | 92 |
| 3 | 251 | 12 | 9 | 75 | 3 | 25 |
| 4 | Із суміші штамів 1933 та М-2 ВК | 12 | 4 | 33 | 8 | 67 |
| 5 | Із суміші штамів 1933, М-2 ВК та 251 | 12 | 8 | 67 | 4 | 33 |
| 6 | Контроль позитивний  МПБХ (75 %) та Montanide ISA 25 (25 %) | 12 | 12 | 100 | - | - |
| 7 | Контроль негативний | 12 | 12 | 100 | - | - |

Після зараження всіх піддослідних мишей *E. rhusiopathiae* 149 в дозі 100 LD50 було встановлено, що вакцина зі штаму 251 забезпечувала захист 30 %, зі штаму 419 – 20 %, а із штаму 1933 – 40 % щеплених тварин при загибелі всіх тварин контрольної групи та щеплених вакциною із штаму 93. Нами було підтверджено найвищу протективну активність антигену бактерій бешихи штаму М-2 ВК. Вакцина, виготовлена на основі цього антигену, забезпечувала захист від загибелі 90 % щеплених мишей при контрольному зараженні (табл. 2).

*Таблиця 2* – **Показники нешкідливості та імуногенності інактивованих моноштамних емульсин-вакцин проти бешихи свиней при введенні білим мишам (доза 0,2 см3 з вмістом 1±0,12 ×109 м.к.)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер груп | Інактивовані вакцинизі штамів | Кількість голів  у групі | 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 | Контрольна група | 10 | 10 | 100 | - |

При дослідженні крові, відібраної з серця щеплених дворазово моноштамними вакцинами мишей, спостерігали підвищенняфагоцитарної активності нейтрофілів. Так, після щеплення мишей вакциною із антигену бактерій штаму М-2 ВК відсоток фагоцитозу збільшився з 31,0±3,42 до 62,0±1,77 (Р<0,05). При застосуванні вакцини із штаму 93 відсоток фагоцитозу збільшився з 27,0±2,31 лише до 32±1,12 (Р<0,05); вакцини із штаму 251 – з 35,0±1,42 до 51±2,19; із штаму 419 – з 26,0± 5,121 до 52±1,87 та із штаму 1933 – з 26,0±1,9 до 46±2,25 на фоні стабільності рівня фагоцитозу нейтрофілів крові мишей контрольної групи (табл. 3).

*Таблиця 3* –  **Показники фагоцитарної активності макрофагів крові мишей, щеплених інактивованими моноштамними емульсин-вакцинами (M±m, n=10)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Інактивовані вакцини зі штамів | Відсоток фагоцитозу, % | | Фагоцитарний індекс, од | |
| до щеплення | після щеплення | до щеплення | після щеплення |
| 93 | 27,0±2,31 | 32±2,12 | 2,51± 0,06 | 2,1±0,05 |
| 251 | 35,0±1,42 | 51±2,19\* | 1,9±0,15 | 2,9±0,12\* |
| 419 | 26,0±5,121 | 52±1,87\* | 2,3±0,04 | 3,1±0,14\* |
| 1933 | 26,0±1,9 | 46±2,25\* | 3,1±0,05 | 3,8±0,04\* |
| М-2 ВК | 31,0±3,42 | 62,0±1,77\* | 2,0±0,02 | 4,5±0,19\* |
| Контрольна група | 29,0±2,19 | 27,0±2,84 | 1,9±0,08 | 1,4±0,03 |

Примітка. \* - Р< 0,05 порівняно з показниками контрольної групи (до щеп-лення)

**Фагоцитарний індекс нейтрофілів у два рази** – **з 2,0± 0,02 до 4,5±0,19 (Р< 0,05) – збільшувався лише при застосуванні вакцини із штаму М-2 ВК. Застосування інших вакцин (табл. 3) призводило лише до незначного збільшення показника фагоцитарного індексу при відносній стабільності його у крові, відібраній від тварин контрольної групи.**

**При дослідженні сироваток крові від мишей після щеплення інактивованою емульсин-вакциною зі штаму 93 титри специфічних антитіл до збудника бешихи свиней становили 4,2±0,11 log2; вакциною зі штаму 251** – **5,2±0,11 log2; вакциною зі штаму 419** – **4,2±0,11 log2; зі штаму 1933** – **5,2±0,11 log2 , а зі штаму М-2 ВК** – **7,3± 0,21 log2 при майже однакових титрах антитіл у всіх тварин до щеплення та відсутності змін титрів антитіл до антигенів збудника бешихи у сироватках крові контрольних тварин.**

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що штам *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК, який має інсерцію в гені spaA, проявив найвищі протективні властивості в дослідах на мишах. На штам М-2 ВК одержано деклараційний патент України на корисну модель за № 10833.

**Виготовлення та контроль якості експериментальної серії інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней.** На підставі проведених нами досліджень шляхом інактивування бактерій бешихи штаму *E. rhusiopathiae* М-2 ВК 0,3 %-м розчином формаліну та додавання 25 % ад’юванта “Montanide ISA 25” було виготовлено експериментальну серію інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней із вмістом 4 ×109 інактивованих м.к. в 1 см3.

Вакцина була стериль­ною та нешкідливою для мишей. Через 14 діб після одноразового підшкірного щеплення в дозі 0,5 см3 вакцина забезпечувала захист 90 % вакцинованих тварин від загибелі після зараження бактеріями контрольного штаму E.  rhusiopathiae 149 в дозі 100 LD50 в 0,2 см3.

## Вивчення нешкідливості та імуногенності експериментальної інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней в дослідах на свинях.

## Для вивчення нешкідливості та імуногенності експериментальної інакти­вованої емульсин-вакцини проти бешихи свиней було вакциновано чотири групи тварин. Три групи, по 14, 25 та 27 го­лів відповідно, вакцинували дворазово з інтервалом 14 діб у дозах по 1, 2 та 3 см3 вакцини, із вмістом по 2, 4 і 6 ×109 м. к відповідно. Тварин четвертої групи в кількості 27 голів щепили одноразово в дозі 4 см3 (8×109 м. к.). Контрольних тварин не щеплювали.

У всіх вакцинованих тварин протягом 14 діб після щеплень не реєстрували проявів реактогенності та шкідливості вакцини.

Після внутрішньодермального зараження бактеріями бешихи контрольного штаму К в дозі 3 × 106 КУО в 1 см3 через 46 діб після останнього щеплення в групі свиней, вакцинованих дворазово в дозі по 6×109 інактивованих м. к., із клінічними ознаками бешихи захворіла одна свиня (20 %). У однієї свині (20 %), щепленої одноразово в дозі 8 ×109 м.к., спостерігали незначне запалення шкіри і підвищення температури тіла. Всі інші тварини в усіх групах лишались клінічно здоровими (табл. 4).

*Таблиця 4* – **Показники протективної активності інактивованої емульсин-вакцини проти бешихи**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер  групи | Доза  вакцини | Контрольне зараження через 46 діб після щеплення | | | Контрольне зараження через 180 діб після щеплення | | |
| заражено, гол. | захворіло, гол. | захист, % | заражено, гол. | захворіло, гол. | захист, % |
| 1 | Дворазово по  2 ×109 м. к. | 5 | - | 100 | - | - | - |
| 2 | Дворазово по  4 ×109 м. к. | 5 | - | 100 | 8 | 4 | 50 |
| 3 | Дворазово по  6 ×109 м. к. | 5 | 1 | 80 | 6 | 2 | 67 |
| 4 | Одноразово  8 ×109 м. к. | 5 | 1 | 80 | 8 | 2 | 75 |
| 5 | Контрольні невакциновані | 5 | 5 | - | 6 | 6 | - |

Таким чином, щеплення інактивованою емульсин-вакциною проти бешихи, виготовленою на основі антигену бактерій штаму М-2 ВК, у дозах 2, 4 та 6 ×109 м.к. дворазово, та 8×109 м.к. одноразово при контрольному зараженні через 46 діб після щеплення забезпечувало захист від зараження патогенними бактеріями бешихи штаму К 80–100 % свиней.

У результаті контрольного зараження дослідних свиней через шість місяців після щеплення інактивованою емульсин-вакциною проти бешихи свиней було встановлено, що вакцина в дозі 4 ×109 м. к. при дворазовому введенні забезпечувала захист від захворювання 50 % тварин, в дозі 6 ×109 м. к. при дворазовому введенні забезпечувала захист 67 % тварин. Одноразове щеплення в дозі 8 ×109 м. к. забезпечувало захист 75 % тварин і свідчило про достатню протективну активність вакцини через 6 місяців після вакцинації.

У невакцинованих проти бешихи свиней в місцях внутрішньодермального введення *E. rhusiopathiae* контрольного штаму К розвивалось захворювання з типовим для бешихи свиней запаленням шкіри, яке у окремих тварин супроводжувалось підвищенням температури тіла до 41–42,2 °С та набувало генералізації в місцях введення збудника.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами запропоновано штам *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, який використано при розробці технологічного регламенту та технічних умов біопрепарату „Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована” (ТУ У 24.4–05510830–059: 2006), реєстраційне посвідчення № 1933-04-0241-06 від 4 липня 2006 р.

ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми, що виявляється в проведених культурально-біохімічних, мікробіологічних, серологічних і молекулярно-біологічних дослідженнях, визначенні протективних властивостей підібраного та охарактеризованого штаму *E. rhusiopathiae* М-2 ВК для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней, оптимізуванні складу живильного середовища та терміну культивування з метою отримання максимальної біомаси бактерій. Запропоновано метод та режим інактивування бактерій бешихи, експериментально обґрунтовано застосування для виробництва вакцини ад’юванта “Montanide ISA 25”. Імуногенність штаму *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, що мав інсерцію в гені spaA, підтверджено в дослідах на лабораторних тваринах і свинях.

2. Встановлено, що 11 штамів збудника бешихи свиней різних серотипів (1, 2а, 2в, N та нетиповані ізоляти) не відрізнялись між собою за ферментативними та культурально-морфологічними ознаками та мали однаковий розмір гена spaA – 1880 нуклеотидних пар.

3. Уперше встановлено інсерцію в гені spaA ДНК *E. rhusiopathiae* М-2 ВК розміром 400 нуклеотидних пар.

4. Підтверджено, що штам *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, поряд зі штамом 1933, в імуноферментному аналізі вирізнявся найвищою антигенною активністю відносно гіперімунних сироваток крові, отриманих на антигени бактерій бешихи штамів ВР-2 вар. ІВМ, 149, Ш та М-2 ВК.

5. Доведено, що вирощування бактерій вакцинного штаму М-2 ВК на модифікованому нами середовищі Фейста при температурі (36,7±0,3) °С протягом 24 годин забезпечувало найбільше накопичення біомаси бактерій бешихи в культуральній рідині – 9,02±0,04 × 109 КУО/см3 при оптимальному значенні рН (6,65±0,04) наприкінці культивування.

6. Встановлено, що повне інактивування бактерій бешихи із збереженням антигенних властивостей та структури клітин відбувається при додаванні формаліну (із вмістом формальдегіду не менше 37 %) в кількості 0,3 % та витримуванні за температури (19±1)°С протягом 96 годин.

7. У порівняльних дослідженнях з ад’ювантами на основі сумішей марколу з ланоліном, вазелінової олії з ланоліном та Montanide ISA 25 встановлено, що Montanide ISA 25 забезпечував утворення найбільш стійкої емульсії, яка мала консистенцію, придатну для введення тваринам без попереднього прогрівання.

8. Експериментально підтверджено достатню протективну активність антигену *E. rhusiopathiae* штаму М-2 ВК у дослідах на мишах та свинях. Експериментальна емульсин-вакцина, виготовлена нами на основі інактивованого антигену *E. rhusiopathiae* штаму М-2 ВК, через 14 діб після підшкірного введення в дозі 2×109 м.к. забезпечувала захист 92 % щеплених мишей від зараження патогенними бактеріями штаму *E. rhusiopathiae* 149 в дозі 100 LD50 та 75 % піддослідних свиней через шість місяців після одноразового внутрішньом’язового щеплення в дозі 8×109 м.к. від внутрішньошкірного зараження бактеріями контрольного штаму К збудника бешихи свиней в дозі 3×106 м.к.

# 

# ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

**1. Для активної імунопрофілактики захворювання свиней на бешиху рекомендуємо застосовувати біопрепарат “Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована” (ТУ У 24.4-05510830-059: 2006, реєстраційне посвідчення № 1933-04-0241-06 від 4 липня 2006р.).**

**2. Для виготовлення інактивованих вакцин проти бешихи свиней рекомендуємо використовувати штам *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК (Деклараційний патент 10833 Україна, С12N1/20, А61К39/02 Штам бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae*  М-2ВК для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней/ О.А. Тарасов, А.Ф. Ображей, О.М. Дерябін – 200507495; Заявл. 27.07.2005; Опубл. 15.11.2005, бюл. №11).**

3. Для максимального накопичення біомаси бактерій при виготовленні вакцин проти бешихи свиней пропонуємо проводити культивування вакцинних штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* на модифікованому нами середовищі Фейста при температурі (36,7±0,3) °С протягом 24 годин.

4. Матеріали дисертації щодо молекулярно-біологічних досліджень збудників бешихи свиней використані при розробці “Методу виявлення бактерій роду *Erysipelothrix* виду *Erysipelothrix rhusiopathiae* у біоптатах або патологічному матеріалі або об’єктах зовнішнього середовища” (Деклараційний патент 10834 Україна, G01N33/00 Спосіб виявлення бактерій роду *Erysipelothrix* виду *Erysipelothrix rhusiopathiae* у біоптатах або патологічному матеріалі, або кормах, або об’єктах зовнішнього середовища / О.А. Тарасов, А.Ф. Ображей, О.М. Дерябін, Д.М. Іродов, О.Г. Дерябіна – 200507497; Заявл. 27.07.2005; Опубл. 15.11.2005, бюл. №11) та технічних умов “Тест-система „Бешиха ПЛР-тест” для виявлення ДНК *Erysipelothrix rhusiopathiae* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)” (ТУ У 24.2-05510830-067:2006).

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Визначення оптимальної заражаючої дози збудника бешихи контрольного штаму, що викликає зараження свиней / В.Ф. Павлов, А.Ф. Ображей, М.Г. Остапець, **О.А. Тарасов** // Ветеринарна медицина України. – 2000. – № 8. – С. 26–27 *(здобувач брав участь в проведенні дослідів, аналізі і узагальненні результатів)*.

2. **Тарасов О.А.**, Ображей А.Ф., Сапейко В.П. Чутливість польових та музейних штамів збудника бешихи свиней до антибіотичних речовин // Ветеринарна біотехнологія. – 2004. – № 5. – С. 140–143 *(здобувач провів експериментальні дослідження, зроблено висновки, підготовлено статтю до друку).*

3. Дослідження імуногенності емульсин-вакцин проти бешихи свиней на лабораторних тваринах / **О.А. Тарасов,** А.Ф. Ображей, М.Г. Остапець, В.Ф. Бабак, А.М. Головко, В.Г. Скрипник, Н.Г. Пінчук // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2005. – Т. 2, № 85. – С. 1063–1066 *(здобувач провів виготов-лення експериментальних варіантів вакцин та дослідження на лабораторних тваринах з визначення протективного ефекту).*

4. **Тарасов О.А.** Дослідження імуногенності експериментальних інактивованих моноштамних емульсин-вакцин проти бешихи свиней в дослідах на лабораторних тваринах// Ветеринарна біотехнологія. – 2005. – №6. – С. 197–204.

5. Деклараційний патент України на корисну модель 10833 Україна, МПК С12N1/20, А61К39/02. Штам бактерій Erysipelothrix rhusiopathiae М-2ВК для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней / **О.А. Тарасов,** А.Ф. Ображей, О.М. Дерябін (Україна)/ Інститут ветеринарної медицини УААН – № u200507495; Заявл. 27.07.2005; Опубл. 15.11.2005, бюл. №11. – 4 с. *(здобувач провів експериментальні дослідження та оформив заявку на патент)*.

6. Деклараційний патент України на корисну модель 10834. Україна, МПК G01N33/00. Спосіб виявлення бактерій роду Erysipelothrix виду Erysipelothrix rhusiopathiae у біоптатах або патологічному матеріалі, або кормах, або об’єктах зовнішнього середовища/ **О.А. Тарасов**, А.Ф. Ображей, О.М. Дерябін, Д.М. Іродов, О.Г. Дерябіна (Україна) / Інститут ветеринарної медицини УААН – № u200507497; Заявл. 27.07.2005; Опубл. 15.11.2005, бюл. № 11. – 2 с. *(здобувач провів експери-ментальні дослідження та оформив заявку на патент)*.

7. Методичні рекомендації з діагностики бешихи свиней методом полімеразної ланцюгової реакції / А.Ф. Ображей, **О.А. Тарасов,** О.М. Дерябін, О.Г. Дерябіна. – Київ, 2005 – 15 с. *(здобувач брав участь у проведенні дослідів, оформленні протоколів)*.

8. Біопрепарат „Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована”: ТУУ 24.4 – 05510830-059: 2006. – Чинний від 13.10.2006. – Київ, 2006. – 17 с. *(здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень та оформленні нормативної документації).*

9. Тест система „Бешиха – ПЛР тест” для виявлення ДНК Erysipelothrix rhusiopathiae методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ТУ У 24.2 – 05510830 – 067: 2006. – Чинний від 13.10.2006. – Київ, 2006. – 22 с. *(здобувач брав участь у проведенні експериментальних досліджень та оформленні нормативної документації).*

10. Вивчення нешкідливості та протективності інактивованої емульсин вакцини проти бешихи свиней / А.Ф. Ображей, **О.А. Тарасов**, І.І. Матяж //Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 2. – С. 39–42 *(здобувач брав участь у плануванні дослідів, проводив щеплення та контрольне зараження дослідних тварин, обробку результатів дослідів).*

11. Аналіз поліморфізму гена білка spa A Erysipelothrix rhusiopathiae / А.Ф. Ображей, О.М. Дерябін, **О.А.** **Тарасов**, О.Г. Дерябіна // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2007. – № 88. – С. 161–165 *(здобувач дослідив молекулярно-біологічні властивості штамів бактерій бешихи щодо гена spa A в ПЛР* *).*

12. Вивчення антигенних властивостей Erysipelothrix rhusiopathiae різних штамів/ А.Ф. Ображей, **О.А. Тарасов**, О.М. Дерябін // Наук. вісник ЛНАВМ імені С.З.Гжицького, Львів, 2007. – Т. 9, № 1 (32). – С. 114–119 *(здобувач провів експериментальні дослідження)*.

13. **Тарасов О.А.** Порівняльна оцінка живильних середовищ для культивування Erysipelothrix rhusiopathiae // Наук. вісник ЛНАВМ імені С.З. Гжицького. – Львів, 2007. – Т. 9, № 3 (34). – С. 192–198.

**Тарасов О.А. Культуральні, молекулярно-біологічні та антигенні властивості вакцинних штамів *Erysipelothrix rhusiopathiae* – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. – Національний аграрний університет, Київ, 2008.

На підставі проведених культурально-біохімічних, мікробіологічних, серологічних і молекулярно-біологічних досліджень підібрано та охарактеризовано штам *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней, оптимізовано склад живильного середовища та термін культивування з метою отримання максимальної біомаси бактерій. Запропоновано метод та режим інактивування бактерій бешихи, експериментально обґрунтовано застосування для виробництва вакцини ад’юванта “Montanide ISA 25”. Імуногенність штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК, що мав інсерцію в гені spaA, підтверджено в дослідах на лабораторних тваринах і свинях.

Встановлено, що 11 штамів збудника бешихи свиней різних серотипів (1, 2а, 2в, N та нетиповані ізоляти) не відрізнялись між собою за біохімічними і культурально-морфологічними ознаками та мали однаковий розмір гена spaA – 1880 нуклеотидних пар.

Уперше встановлено інсерцію в гені spaA у ДНК *Erysipelothrix rhusiopathiae* штаму М-2 ВК завбільшки 400 нуклеотидних пар.

Експериментально підтверджено високу протективну активність штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК у дослідах на мишах та свинях. Експериментальна емульсин-вакцина через 14 діб після підшкірного введення в дозі 2 ×109 м.к. забезпечувала захист 92 % щеплених мишей та 75 % піддослідних свиней через шість місяців після одноразового внутрішньом’язового щеплення в дозі 8 ×109  інактивованих бактерій бешихи.

**Ключові слова:** штам, бешиха свиней, ген протективного білка, ад’ювант, вакцина, імуногенність.

**Тарасов А.А. Культуральные, молекулярно-биологические и антигенные свойства вакцинных штаммов *Erysipelothrix rhusiopathiae* – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. – Национальный аграрный университет, Киев, 2008.

На основании проведенных культурально-биохимических, микро- биологических, серологических и молекулярно-биологических исследований подобрано и охарактеризовано штамм *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК для изготовления инактивированной вакцины против рожи свиней, оптимизированы состав питательной среды и сроки культивирования с целью получения максимальной биомассы бактерий. Предложены метод и режим инактивирования бактерий возбудителя, экспериментально обосновано применение для производства вакцины адъюванта “Montanide ISA 25”. Иммуногенность *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК, у которого впервые была обнаружена инсерционная мутация в гене основного протективного протеина spaA, подтверждена в опытах на лабораторных животных: белых мышах и свиньях.

Установлено, что 11 штаммов возбудителя рожи свиней различных серотипов (1, 2а, 2в, N и нетипированные полевые изоляты) не различались между собой по биохимическим и культурально-морфологическим признакам и имели одинаковый размер гена spaA – 1880 нуклеотидных пар, что было подтверждено в ПЦР с использованием праймеров, рассчитанных на полный ген, и только в ДНК бактерий *Erysipelothrix rhusiopathiae* штамма М-2 ВК установлена инсерция в гене *spaA* размером 400 нуклеотидных пар, которая, как мы полагаем, усилила иммуногенность данного штамма по сравнению с другими, использованными в проведенных опытах. При исследовании ДНК всех штаммов в ПЦР с праймерами, рассчитанными на участок гена spaA, отличий в размерах амплификатов установлено не было.

Подтверждено, что штамм *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК, наряду со штаммом 1933, в иммуноферментном анализе (непрямой вариант ИФА) проявлял наивысшую антигенную активность по отношению к гипериммунным сывороткам крови, полученным на антигены *Erysipelothrix rhusiopathiae* штаммов ВР-2 вар. ИВМ, 149, Ш та М-2 ВК, то есть был одинаково активным как по отношению к гомологичным, так и к гетерологичным сывороткам.

При изучении суточных культур методом последовательных разведений на мясопептонном агаре Хоттингера (МПАХ) установлено, что наибольшее накопление бактерий всех штаммов происходило при культивировании на модифицированной нами среде Фейста (СФМ) и количество бактерий колебалось от 8,56±0,08×109 КОЕ (штамм 149) до 10,57±0,45×109 КОЕ(штамм К) в 1 см3, что в 2,7 раза (р < 0,05) превышало их содержание при культивировании в МПБХ (от 2,27±0,03 ×109 КОЕ (штамм 149) до 4,17±0,03 ×109 КОЕ (штамм К) в см3), а также в 1,46 раза (р < 0,05), чем при культивировании на среде Фейста (СФ) (от 5,82±0,04×109 КОЕ (штамм ВР-2 вар. ИВМ) до 6,88± 0,01×109 КОЕ (штамм К) в 1 см3). Наибольшее накопление бактериальной массы – 9,02±0,04×109 КОЕ в 1 см3 для бактерий штамма М-2 ВК регистрировали при культивировании на СФМ.

Наибольшее накопление бактериальной массы штаммом М-2 ВК при культивировании на СФМ также подтверждалось измерением оптической плотности культуральной жидкости через 24 часа роста. На СФМ она составляла 5,01­±0,04 единиц, на СФ - 3,53±0,03 единиц и на МПБХ – 2,77±0,03 единиц.

Культивирование отдельных штаммов возбудителя рожи свиней в среде МПБХ приводило к снижению исходного значения рН среды с 7,3±0,1 до диапазона значений от 6,23±0,07 (штамм ВР-2 вар. ИВМ) до 5,17±0,03 (штамм М-2 ВК), в СФ до 6,68­±0,12 единиц (штамм ВР-2 вар. ИВМ) и до 4,95±0,06 (штамм К). При культивировании штаммов в СФМ значение рН снижалось до 6,53 ± 0,13 (штамм 149) и 6,75±0,06 (штамм ВР-2 вар. ИВМ).

При исследовании динамики роста *E. rhusiopathiae*  М-2 ВК по сравнению с апатогенным вакцинным штаммом ВР-2 вар. ИВМ было подтверждено, что максимальное накопление бактерий (9,8–11,4×109 КОЕ в 1 см3) происходит на 18-ом часу с начала культивирования на среде СФМ при (36,7±0,3)°С.

Доказано, что выращивание вакцинного штамма М-2 ВК на модифицированной нами среде Фейста при температуре (36,7±0,3) °С в течение 24 часов обеспечивает наибольшее накопление биомассы бактерий рожи в культуральной жидкости до 9,02±0,04×109 КОЕ/см3 при оптимальном значении рН (6,65±0,04) в конце культивирования.

Установлено, что полная инактивация бактерий рожи свиней с сохранением антигенных свойств и структуры бактериальных клеток происходит при добавлении формальдегида в количестве 0,3 % и выдерживании при комнатной температуре в течение 96 часов.

На основании проведенных исследований, путем инактивирования бактерий рожи штамма М-2 ВК 0,3 %-м раствором формалина и добавления 25% адъюванта “Montanide ISA 25”, нами была изготовлена экспериментальная серия инактивированной эмульсин-вакцины против рожи свиней с содержанием антигена 4 ×109 м. к. в 1 см3.

Экспериментальная эмульсин-вакцина, которая была изготовлена на основе антигена, полученного из инактивированных формалином бактерий *E. rhusiopathiae* штамма М-2 ВК, через 14 суток после однократного подкожного введения в дозе 2 ×109 м. к. обеспечивала защиту 92 % вакцинированных мышей от заражения патогенным штаммом *Erysipelothrix rhusiopathiae* 149 в дозе 100 LD50 и 75% опытных свиней через шесть месяцев после однократной внутримышечной прививки в дозе 8 ×109 м.к. от заболевания при контрольном заражении рожистыми бактериями контрольного штамма К в дозе 3 ×109 м. к..

Таким образом, нами предложен штамм *E. rhusiopathiae* М-2 ВК, который использован при разработке технологического регламента и технических условий биопрепарата „Эмульсин-вакцина против рожи свиней инактивированная” (ТУ У 24.4-05510830-059: 2006), регистрационное свидетельство № 1933-04-0241-06 от 4 июля 2006 года. Экспериментально подтверждена достаточная протективная активность *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК в опытах на белых мышах и свиньях.

**Ключевые слова:** штамм, рожа свиней, ген протективного белка, адъювант, вакцина, иммуногенность.

**Tarasov A. The cultural, molecular-biological and antigenic properties of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strains – Мanuscript.**

The thesis for obtaining the degree of doctor of philosophy in veterinary medicine, specialty 16.00.03 – veterinary microbiology and virology. – The National Agrarian University, Kyiv, 2008.

On the base of conducted cultural-biochemical, microbiological, serological and molecular – biological investigations it was choused and characterized strain *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 VК for making inactivated vaccine against swine erysipelas, optimized nutrient media and terms of cultivation for obtaining maximal bacterial biomass. It was offered the method and the order of the inactivation of erysipelas bacteria and experimentally substantiated using of adjuvant “Montanide ISA 25”. The immunity of the *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 VК strain, which was characterized as mutant strain with insertion in the main protective gene spa A, was confirmed in the experiments carried out on laboratory mouse and swine in pig farm condition.

It was substantiated, what 11 strains of erysipelas bacteria of different serotypes (1, 2a, 2b and unidentified isolates) had no biochemical and cultural – morphological peculiarities and had equal gene spaA size - 1880 b.p.

It was confirmed what strain *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 VК among with 1933 strain were the most active in indirect ELISA with hyperimmune serums against antigens

*Erysipelothrix rhusiopathiae* strains ВР-2 var. ІVМ, 149, Ш and М-2 VК.

Experimentally proved enough protective activity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 ВК strain in experiments with using mouse and pigs.

Experimental emulsion-vaccine on the base of the inactivated with formalin bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* М-2 VК in 14 days after single shot injection (dose per mouse – 2×109 microbial cells) provided 92 % protection of vaccinated mouse and 75 % pigs in six months after single shot vaccination with vaccine, contained 8 ×109 inactivated microbial cells.

**Key words**: strain, swine erysipelas, the protective protein gene, adjuvant, vaccine, immunity.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>