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

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Еверт Віктор Вікторович**

**УДК 619: 579.62. 57.083.13**

 УДОСКОНАЛЕННЯ діагностичних та профілактичних препаратів ПРИ лептоспірозІ тварин

**16.00.03** – **ветеринарна мікробіологія та вірусологія**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

Київ – 2002

 **Дисертацією є рукопис.**

 **Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Української академії аграрних наук.**

Науковий керівник: **кандидат біологічних наук,** Кучерявенко Олексій Олександрович, **Інститут ветеринарної медицини УААН, завідувач лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин із музеєм штамів мікроорганізмів, заступник директора з питань науки**

Офіційні опоненти: **доктор ветеринарних наук, професор** Рухляда Валентин Васильович**, Білоцерківський державний аграрний університет, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та зоології;**

кандидат ветеринарних наук , доцент **Ібатулліна Фльора Жаферівна**,Національний аграрний університет, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

Провідна установа: **Харківська зооветеринарна академія, кафедра мікробіології, вірусології та зоології Міністерства аграрної політики України, м. Харків**

**Захист відбудеться " 4 " жовтня 2002 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 в Національному аграрному університеті за адресою: 03041, Київ-41, вул. Героїв оборони, 15, навчальний корпус 3, ауд. 65.**

**З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету за адресою: 03041, Київ-41, вул. Героїв оборони, 13, навчальний корпус 4, к. 41.**

**Автореферат розісланий " 3 "…вересня .2002р.**

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради Міськевич С.В.**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Проблема лептоспірозної природно-вогнищевої інфекції останнім часом набуває особливого значення, оскільки стала дуже розповсюдженою та наносить значні економічні збитки. Захворювання має місце на усіх континентах, поширене в багатьох країнах світу, у тому числі в Україні.

Цілий ряд вітчизняних та зарубіжних дослідників плідно працювали над проблемою лептоспірозу (Терских В.И., 1964; Малахов Ю.А., 1976; Киктенко В.С., 1985; Любашенко С.Я., 1948; Слинько В.Г., 1979; Баришев П.М., 1981; Бернасовська Є.П., 1996; Настенко А.Я., 1988; Мельницька Е.П., 1995; Мойсеєва А.В., Шабловська Є.А., 1988; Савченко С.Н., 1980 та ін.)

Незважаючи на безсумнівну актуальність проблеми, багато питань все ще залишаються нерозв’язаними. Відсутність вітчизняних методів ідентифікації виділених лептоспірозних ізолятів як правило призводить до несвоєчасної діагностики. Вчасне та вірне визначення етіологічного агента дає змогу чітко з’ясувати епізоотичну ситуацію, а отже, цілеспрямовано провести заходи запобігання інфекції.

У процесі лабораторного культивування лептоспір їхня антигенна та імуногенна активність знижується, частина патогенних форм переходить у сапрофітні. Використовувати сероваріанти лептоспір зі зниженою активністю в процесі приготування засобів специфічної профілактики небажано, оскільки імуногенні властивості біопрепарату, виготовленого з антигенів, які втратили свою активність, будуть незадовільними, що в свою чергу може викликати прорив імунітету та реінфікування тварин. Внаслідок використання слабоімунних антигенів, які входять до складу засобів ідентифікації етіологічного агента або діагностування інфекції, істотно знижуються специфічність та чутливість отриманих препаратів. Тому підвищення антигенної та імуногенної активності штамів лептоспір є дуже важливим для практики.

Для успішної боротьби з лептоспірозом та його ліквідації існує потреба в розробці сучасних вітчизняних препаратів для активної профілактики хвороби у сільськогосподарських тварин. Такі заходи можливі тільки за наявності в арсеналі ветеринарних спеціалістів високоякісних протилептоспірозних вакцин. У процесі виготовлення таких біопрепаратів є нагальна потреба в використані певних технологічних методів та схем підготовки, інактивації, концентрації лептоспірозного антигену, які б запобігали втраті імуногенних властивостей біопрепарату, забезпечували поруч з нешкідливістю та нетоксичністю високу імунологічну відповідь у сенсибілізованого таким препаратом організму. Тому з’ясування параметрів інактивації лептоспіромісткої суспензії, режимів її концентрування, введення до складу вакцини високоактивних у імунологічному відношенні лептоспірозних сероваріантів, поруч з комплексною перевіркою отриманого продукту, є важливими практичними питаннями, що потребують розв’язання.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано згідно з Державним планом науково-дослідних робіт Інституту ветеринарної медицини УААН КН № 0197 U 12755 інв. № 02.02. “Вивчити епізоотологію, розробити моно- і полівалентні вакцини і методи діагностики “; плану: “Основні заходи оздоровлення тварин від лептоспірозу в Україні на 1999 – 2000 роки”, затвердженого наказом № 2 від 18.01.1999 р. Державним департаментом ветеринарної медицини Міністерства Агропрому України.

## Мета і завдання досліджень. Метою досліджень було підвищення якості лептоспірозних антигенів для виготовлення діагностичних та профілактичних препаратів.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

* створити високоспецифічні групові аглютинуючі сироватки для визначення серогрупової належності лептоспір;
* визначити оптимальну схему виділення та ідентифікації збудника лептоспірозу з патологічного матеріалу;
* підвищити антигенну та імуногенну активність штамів;
* удосконалити поліантиген діагностичної імуноферментної тест-системи «ІФА-лептоспіроз» та засобів профілактики лептоспірозу, використавши штами з підвищеною антигенною та імуногенною активністю;
* провести порівняльну характеристику дії різних хімічних інактивуючих речовин на культуру лептоспір;
* розробити нові технологічні методи концентрування лептоспірозного антигену.

*Об’єкт дослідження* – культури лептоспір.

*Предмет дослідження* – процес підвищення антигенної та імуногенної активності лептоспірозного антигену.

*Методи досліджень*: оцінку накопичення біомаси виконували методом темнопольної мікроскопії; аглютинуючі лептоспірозні сироватки одержували методом гіперімунізації лабораторних тварин; підвищення активності штамів лептоспір проводили методом послідовних пасажів через організм сприйнятливих тварин; порівняння якості різних варіантів поліантигену для тест-системи “ІФА-лептоспіроз” проводили методом імуноферментного аналізу; концентрування лептоспірозної суспензії проводили хроматографічним методом та за допомогою методу відстоювання; контроль повноти інактивації проводили методом послідовних пасажів на селективних середовищах; антигенну та імуногенну активність лептоспір досліджували серологічним методом у реакції мікроаглютинації (РМА).

## Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні запропоновано:

* спосіб концентрування лептоспірозного антигену за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ). (Одержано патент України на винахід №2001021255. Бюл.№7, 2001);
* спосіб концентрування лептоспірозного антигену за допомогою хроматографії на порожнистих волокнах. (Одержано патент України на винахід №2001031538. Бюл.№7, 2001);
* спосіб інактивації лептоспірозного антигену (Одержано рішення про видачу патенту України на винахід. Заявка № 2002010385, вих. № 28089, 2002);
* метод гіперімунізації кролів для виготовлення аглютинуючих лептоспірозних сироваток;
* метод контролю лептоспірозних вакцин на повноту інактивації.

**Практичне значення одержаних результатів.** Матеріали досліджень використано при розробці нормативної документації (НД), яка затверджена Державним департаментом ветеринарної медицини:

* 1. НД з виготовлення і застосування тест-систем діагностичних імуноферментних “ІФА-лептоспіроз” ТУУ 46.15.581-2001;
	2. НД з виготовлення і застосування сироваток групових аглютинуючих лептоспірозних ТУУ 46.15.582-2001;
	3. НД з виготовлення і застосування моновалентної вакцини проти лептоспірозу тварин (затверджено методичною комісією ІВМ УААН №2 від 20 березня 2002 р.).

## Особистий внесок здобувача. Експериментальні дослідження, аналіз одержаних результатів, їхнє узагальнення і статистична обробка, а також оформлення рукопису виконані дисертантом особисто.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідались і були схвалені:

* на семінарі завідуючих серологічними відділами обласних і Центральної державної лабораторій ветеринарної медицини на базі лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин Інституту ветеринарної медицини УААН, м. Київ, 2002;
* на науково-практичній конференції “Сучасні ветеринарні та технологічні аспекти свинарства”, Пуща-Водиця, березень, 2002;
* на семінарі лікарів–бактеріологів відділів особливо небезпечних інфекцій з актуальних питань діагностики лептоспірозу та організації роботи лабораторій (квітень, 2002).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 4 статті у фахових виданнях. Одержано рішення про видачу трьох патентів України на винахід.

**Об’єм і структура дисертації.** Дисертація викладена на 135 сторінках комп’ютерного тексту і містить: вступ, огляд літератури, загальну методику та основні методи досліджень, результати експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, додатки. Робота містить 14 таблиць, 7 рисунків, 3 фотографії. Список використаної літератури налічує 194 джерела, у тому числі 120 зарубіжних авторів.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ**

**Матеріали і методи.** Дослідження виконано в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини УААН у період з 1999 по 2002 р.

У дослідженнях використовували референтні діагностичні штами лептоспір: Veldrat Bataviae 46, HS 26, Szwajizak, 493 Poland, Kabura, Perepelicyni, Pomona, Moskva V, Hond Utrecht IV, M 20, LSU, LT 821, CZ 214 K, Patoc 1, Whitcomb, Jez 1, Akiyami A, Vleermuis 3868, Salinem, Mus 127 та вакцинні штами лептоспір ВГНКИ-3, ВГНКИ-2, Hardjoprajtno, ВГНКИ-6, ВГНКИ-4, Bataviae, Усольцев, ВГНКИ-1.

Для культивування лептоспір використовували живильні середовища Терських, Кортгофа з вмістом 10% сироватки крові овець або 7-10% сироватки крові кролів, EMJH.

Сироватки лептоспірозні групоспецифічні аглютинуючі готували методом гіперімунізації кролів. Імунізацію тварин проводили в крайову вену вуха. На 19, 31 або 35 добу, залежно від титрів сироваток, кролів повністю знекровлювали. Після перевірки на стерильність, активність і родоспецифічність сироватки крові піддавали сублімаційному висушуванню. Активність та специфічність імунних сироваток контролювали в реакції мікроаглютинації.

При виділенні патологічного матеріалу гомогенізат печінки, нирок, головного мозку, легень висівали на середовища Кортгофа, Флетчера та модифіковане середовище EMJH. Для очищення культури лептоспір від сторонньої мікрофлори використовували 5-фторурацил у дозі 125 мг/дм3. Серологічну ідентифікацію збудника виконували, застосовуючи РМА та реакцію дифузної преципітації (реакція Оухтерлоні).

Імуногенну активність лептоспір підвищували 10-ти разовим пасажуванням в організмі морських свинок та 5-ти разовим пасажуванням отриманих ізолятів на щільному живильному середовищі. Для оцінки активності штамів використовували РМА.

Режими інактивації лептоспірозних культур вивчали, застосовуючи як інактиватори 37%-ний розчин формаліну в розведеннях 0,1-0,6%; 8%-ний розчин фенолу в розведеннях 0,1-0,6%; мертіолят у концентраціях 0,00005, 0,0001, 0,0002, 0, 0003%; 2%-ний розчин кристалвіолету в розведеннях 0,005-0,1 %.

Концентрування лептоспір проводили, використовуючи ультрафільтраційну установку колонкового типу з порожніми волокнами АР-0.1, та за допомогою внесення в лептоспірозну суспензію осаджуючої речовини – 10% розчину 75%-ного поліетиленгліколю (ПЕГ- 6000).

Дослідні серії протилептоспірозних вакцин створювали, використовуючи 7-10-денні культури вакцинних сероваріантів лептоспір: серовари monjakov, icterohaemorragiae, canicola, grippotyphosa, а також штами з підвищеною антигенною та імуногенною активністю (серовари monjakov та icterohaemorragiae). Культури інактивували формаліном, фенолом, кристалвіолетом у концентраціях 0,3, 0,25, 0,05% відповідно. Інактивовану лептоспірозну суспензію концентрували ультрафільтрацією, відстоюванням з внесенням поліетиленгліколю та гідрату окису алюмінію. Отримані дослідні серії вакцин перевіряли на нешкідливість, токсичність, стерильність, імуногенність, повноту інактивації.

Підчас дослідження зразків вакцин проти лептоспірозу тварин від різних виробників токсичність та нешкідливість вакцин визначали на морських свинках і золотистих ховрахах. Досліджували вакцини на ступінь інактивації за допомогою контрольних пасажів. Досліджуючи імуногенні властивості протилептоспірозних вакцин, кролям вводили вакцини внутрішньовенно. В сироватках імунізованих тварин визначали титри антитіл у РМА тричі на 14, 21,35 добу після ін’єкції**.**

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Порівняльна характеристика методів одержання сироваток групових аглютинуючих лептоспірозних.** З метою підготовки антигену для гіперімунізації кролів культуру лептоспір після 7 - 10 добового культивування концентрували для підсилення імунної відповіді при введенні антигену в організм піддослідних тварин. Для цього використоввали ультрафільтраційну установку колонкового типу на основі порожнистих волокон. Кролів імунізували концентрованими та неконцентрованими лептоспірозними суспензіями на основі середовища Кортгофа та EMJH.

Імунізацію кролів проводили за трьома схемами:

* 1. Три внутрішньовенні ін’єкції в дозах 1, 2, 3 см3 з інтервалом у 3 доби, знекровлення кролів проводили на 10 добу після останньої ін’єкції ;
	2. П’ять внутрішньовенних ін’єкцій в дозах 1, 2, 4, 6, 6 см3 з інтервалом 7 діб, знекровлення - на 7 добу після останньої ін’єкції;
	3. Три внутрішньовенні ін’єкції в дозах 2, 4, 6 см3 з інтервалом 7 діб, знекровлення - на 10 добу після останньої ін’єкції (запропонована нами методика).

Встановлено, що титри антитіл у тварин, яких було імунізовано неконцентрованими антигенами, виробленими на основі середовища Кортгофа, в 1,5 - 2 рази нижчі порівняно з концентрованими, вирощеними на тому самому середовищі, або порівняно з титрами, отриманими від кролів, яких імунізовано антигенами (як концентрованими, так і не концентрованими), виробленими на середовищі ЕМGН. Отже, концентрування лептоспірозного антигену при виробництві сироваток групових аглютинуючих лептоспірозних дає змогу істотно підвищити імунологічну відповідь організму й отримати активніші специфічні сироватки.

Запропонована нами схема імунізації, яка передбачає 3 внутрішньовенні ін’єкції в дозах 2, 4, 6 см3 з інтервалом 7 діб та проведення знекровлення на 10 добу після останньої ін’єкції показала такі самі результати як і схема, що передбачає 5 внутрішньовенних ін’єкцій у дозах 1, 2, 4, 6 см3 з інтервалом 7 діб та проведенням знекровлення на 7 добу після останньої ін’єкції, і кращі (титри вище удвічі) порівняно зі схемою, яка складається з трьох внутрішньовенних ін’єкцій в дозах 1, 2, 3 см3 з інтервалом у 3 доби та наступним знекровленням кролів на 10 добу після останньої ін’єкції. Розроблена схема гіперімунізації кролів забезпечує максимальні титри аглютинуючих сироваток, економію антигену та часу на виробництво таких сироваток.

**Виділення та ідентифікація лептоспірозного антигену з патологічного матеріалу.** На предмет виділення та ідентифікації (встановлення серогрупової належності) лептоспір досліджено патологічний матеріал, одержаний від кобили (абортований плід), трьох абортованих та двох загиблих поросят, зіскоби зі шкіри 4 корів зі шкірною формою лептоспірозу. Патологічним матеріалом були печінка, нирки, головний мозок, легені загиблої тварини, серце, ексудат, що зібрався в черевній порожнині. З серця та каудальної порожньої вени було відібрано невелику кількість крові.Отриманий гомогенізат кожного з взятих до досліду органів було послідовно розведено 10-1, 10-2, 10-3, 10-4 у чотирьох пробірках з середовищами Кортгофа, Флетчера, ЕМJН.

Принциповою вимогою до культур лептоспір, що пройшли адаптаційний період культивування, було їх очищення від сторонньої мікрофлори, яка при застосуванні серологічних методів ідентифікації антигена викликає множинні неспецифічні реакції. Поряд з очищенням патологічного матеріалу від контамінуючої мікрофлори за допомогою додавання до живильного середовища 5-фторурацилу в дозі 120, 125 мг/дм3 підчас кожного пасажу (хімічний метод очищення) також використовували фільтрацію з застосуванням фільтрів “Millipore” та “Pall” з діаметром пор 0,2- 0,22 мкм.

Після отримання в процесі культивування накопичення 55-65 млн. мікробних клітин у 1 см3 проведено серологічну діагностику ізольованого збудника. Із 20 діагностичних аглютинаційних сироваток у найвищому титрі прореагувала сироватка серогрупи Australis. Культура ізольована від абортованих поросят у найвищому титрі прореагувала з сироваткою серогрупи Australis; ізоляти із шкіри корів у реакції з 20 діагностичними сироватками у найвищому титрі прореагували з сироваткою серогрупи Hebdomadis.

**Таблиця 1 - Порівняння росту лептоспір залежно від живильного середовища (клітин у полі зору мікроскопа, М±m; у чисельнику-ріст через 20 діб, у знаменнику- через 40 діб)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Розвед. | Печінка | ШКТ | Нирки | Мозк | Легені |
| СередовищеКортгофа+10% сиров. | 10-1 | 17±1,2 /27±2,1 | —/— | 20±0,9 /37±1,1 | 12±1,1 /19±2,3 | +/+ |
| 10-2 | 13±1,3 /25±1,1 | —/— | 14±1,2 /29±1,2 | 7±1,1 /17±1,6 | +/+ |
| 10-3 | 6±1,2 /14±1,4 | —/— | 11±1,1 /21±1,7 | +/+ | —/— |
| 10-4 | +/+ | —/— | 5±1,2 /15±1,4 | +/+ | —/— |
| Середовище Флетчера | 10-1 | 13±1,3 /14±1,4 | —/— | 17±1,4 /26±2,7 | 10±2,1 /16±1,2 | +/+ |
| 10-2 | 4±1,2 /9±1,6 | —/— | 15±1,8 /19±1,3 | 5±0,9 /13±1,9 | +/+ |
| 10-3 | +/+ | —/— | +/+ | +/+ | —/— |
| 10-4 | +/+ | —/— | +/+ | +/+ | —/— |
| Модифіковане середовище ЕМJH | 10-1 | 21±1,9 /36±1,2 | —/— | 30±1,6 /46±1,9 | 19±1,7 /26±2,3 | +/+ |
| 10-2 | 19±1,9 /33±1,2 | —/— | 20±1,5 /35±1,9 | 14±2,1 /26±1,2 | +/+ |
| 10-3 | 12±1,3 /24±1,0 | —/— | 18±1,6 /28±1,3 | 5±1,1 /9±1,6 | —/— |
| 10-4 | 4±1,7 /12±1,4 | —/— | 8±0,9 /18±1,7 | +/+ | —/— |

Примітка: + - поодинокі лептоспіри в полі зору мікроскопа; — - відсутність росту.

Отже, для виділення лептоспір з патологічного матеріалу в якості органів, з яких найбільш вірогідне ізолювання збудника доцільно відбирати нирки, печінку, мозок загиблих тварин. Для культивування патологічного матеріалу а також ізолятів з нього слід використовувати модифіковане середовище ЕМJН та середовище Кортгофа з 10 % сироватки крові кроля. При цьому термін культивування становить у середньому 3 – 5 місяців. При досягненні накопичення ізоляту з патологічного матеріалу, необхідного для проведення РМА, в якості типуючих сироваток використовували набір не менш як з 20 аглютинуючих групоспецифічних сироваток.

 **Підвищення антигенної та імуногенної активності лептоспір.** У роботі з підвищення антигенної та імуногенної активності штамів використано вакцинні штами лептоспір серогруп Pomona (серовар monjakov), Icterohaemorrahiae (серовар icterohaemorragiae) та діагностичні штами тих же серогруп, серовари рomona та copenhageni відповідно, 7-10-добового віку. Перед початком досліду перевірили вихідні значення антигенної та імуногенної активності задіяних у досліді штамів у РМА. Перевіряли антигенну активність, використовуючи як специфічні сироватки відповідні аглютинуючі лептоспірозні сироватки , отримані за власною методикою.

Лабораторними тваринами для досліджень були морські свинки віком 2-3 тижні. Піддослідним тваринам інтраперітонеально ін’єкціювали культуру лептоспір у дозі 2 см3 з накопиченням 60 - 80 лептоспір у полі зору мікроскопа. На третю добу тварину забивали, відбирали патологічні органи та гомогенізували їх. Частину одержаної гомогенізованої суспензії з патологічних органів (печінка, нирки), окрім посіву на живильні середовища, ін’єкціювали внутрішньочеревно (2 см3) наступній морській свинці, яку також витримували 3 доби, після чого забивали і т. д. Таким чином було проведено 10 пасажів по кожному з узятих до досліду сероварів.

Культивовані та очищені висіви з патологічних органів 5 разів пасажували на твердому живильному середовищі (буферно-сироватковому агарі) для отримання найбільш патогенних колоній збудника. Клоновані таким чином ізоляти знову переводили на рідке живильне середовище Кортгофа та оцінювали їх антигенну та імуногенну активність. Вихідний титр вакцинного серовару monjakov перед проведенням досліду становив 1:2000, рomona - 1:2000, іcterohaemorrahiae - 1:2000, сopenhageni - 1:2000. Після проведення дослідних сероварів через організм сприйнятливих лабораторних тварин та селекції отриманого матеріалу на твердому живильному середовищі титр серовару monjakov становив 1:12000, рomona -1:12000, іcterohaemorrahiae - 1:10000, сopenhageni -1:10000.

**Таблиця 2- Титри антитіл у сироватках крові кролів при введенні досліджуваних антигенів, М±m, n=5**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Доби Серовари  | 7 | 14 | 25 |
| Monjakov | 1:123,3 ±15,4 | 1:379,5±34,1 | 1:650,4±28,8 |
| Icterohaemorrahiae | 1:86,9±8,3 | 1:392,1±19,7 | 1:670±23 |
| Pomona | 1:97,5±7,3 | 1:365±25,3 | 1:736±34,5 |
| Copenhageni | 1:109±8,9 | 1:389,3±31,2 | 1:714,6±19,4 |

Імуногенні властивості взятих у дослід штамів перевіряли імунізацією антигеном дорослих кролів (по 3 кролі на кожний сероваріант збудника). На 7, 14, 25 добу після введення антигену від кролів відбирали кров для дослідження сироватки крові в РМА та спостереження наростання титрів антитіл.

Отже, проведення вакцинних сероварів лептоспір monjakov, іcterohaemorrahiae та діагностичних сероварів рomona, сopenhageni через організм сприйнятливих тварин протягом 10 - ти пасажів з подальшим клонуванням отриманих ізолятів на твердому живильному середовищі протягом 5 пасажів дає змогу завдяки селекції відібрати найактивніші форми збудника, пристосувати їх до умов культивування на рідких живильних середовищах і в подальшому ввести до вакцинного та діагностичного ряду сероваріантів лептоспір, замінивши таким чином штами, що втратили антигенну та імуногенну активність у процесі лабораторного культивування.

**Використання лептоспірозних антигенів при створенні методу імуноферментного аналізу (ІФА) для діагностики лептоспірозу.** Для виготовлення лептоспірозних антигенів, придатних для ІФА, використовували культури лептоспір 10-14-добового віку, які вирощували на стандартному середовщі Кортгофа з додаванням 10 % сироватки крові кролів, з високим накопиченням рухомих лептоспір 1х108 і при відсутності сторонньої мікрофлори.

У склад полівалентного антигену входили 7 сероваріантів лептоспір, а саме : L. polonica (серогрупа Sejroe), L. kabura (серогрупа Hebdomadis), L. pomona (серогрупа Pomona), L. tarassovi (серогрупа Tarassovi), L. grippotyphosa (серогрупа Grippotyphosa), L. canicola (серогрупа Canicola), L. copenhageni (серогрупа Icterohaemorrhagiae).

Для тест-систем “ІФА- лептоспіроз” було виготовлено 2 варіанти імуносорбенту:

1. Імуносорбент, де як лептоспірозний поліантиген використовували 7 вищеназваних сероваріантів лептоспір.
2. Імуносорбент, який відрізняється від першого тим, що в лептоспірозному поліантигені використали L. Copenhageni та L. Рomona, що пройшли цикл дослідів з підвищення активності, які описані вище.

Після отримання дослідних зразків готової тест- системи, її перевіряли на чутливість та специфічність шляхом скринінгового тестування внутрішньовиробничих панельних сироваток крові великої рогатої худоби, свиней та коней, польових сироваток від хворих і здорових тварин, а також позитивних та негативних контролів.

Порівнюючи дослідні тест–системи “ІФА-лептоспіроз” з різними варіантами антигенів, можна зробити висновок про те, що запропонований нами варіант лептоспірозного поліантигену для ІФА дає змогу підвищити чутливість з 85 до 90% та специфічність системи - з 86 до 92 %. Усього за період проведення досліджень протестовано за допомогою дослідних тест-систем “ІФА-лептосіпроз” та РМА 1900 сироваток крові ВРХ, 850 сироваток крові коней, 1500 сироваток крові свиней.

**Порівняння дії різних хімічних інактиваторів на культуру лептоспір**. Метою наших досліджень було вивчення дії різних хімічних інактиваторів з виведенням оптимальної (мінімальної) концентрації діючої речовини, проміжку часу, за який відбувається повна інактивація лептоспір, та найсприятливішої температури для перебігу цього процесу.

Інактиваторами хімічної природи були: формалін у розведеннях 0,1 - 0,6 % з кроком 0,05 %, фенол у кінцевій концентрації 0,1 - 0,6 % з кроком 0,05 %, мертіолят (тіомеросал) - розведення 0,0003%, 0,0002, 0,0001, 0,00005%, кристалвіолет - в кінцевих концентраціях 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 %.

Строки інактивації визначали за допомогою методу мікроскопії у темному полі мікроскопа (допоміжний метод) та посіву (прямий метод) на селективні живильні середовища Кортгофа, Терських, Флетчера. Росту лептоспір не спостерігали, якщо відбулася повна інактивація антигену.

0,0002

0,05

0,25%

0.25

**Рис. 1. Термін повної інактивації лептоспір різними речовинами при**

**t=30 0 C, год.**

Отже, дослідним шляхом встановлено, що для культур лептоспір інактивуюча доза формаліну становить 0,30 % в кінцевій концентрації, фенолу - 0,25%, мертіоляту - 0,0002%, кристалвіолету - 0,05%.

**Порівняльна характеристика методів концентрування лептоспір**. Для вдосконалення існуючих методів концентрації проведено серію дослідів з розробки методів концентрації лептоспірозного антигену. В якості хроматографічного устаткування для фізичного методу розділення використано ультрафільтраційну установку колонкового типу (колонка марки АР-0.1) на основі порожнистих волокон.

Підчас хроматографічного розділення дослідженої суспензії забезпечувався ламінарний режим руху рідини, лінійна швидкість протоку знаходилась у межах 0,1-0,8 м/с. Ультрафільтрація відбувалася під постійним тиском 0,0005 МПа. Таким чином, при застосуванні запропонованого режиму фільтрації час концентрування зменшився до 4 год. порівняно з застосуванням швидкості в проміжку 0,9 – 1,8 м/с, який забезпечує тривалість фільтрації 5,5 год.

 Початковий об’єм лептоспірозної суспензії, який підлягав концентруванню – 4 дм3. Кінцевий об’єм (об’єм отриманого концентрату) - 330 см3. Ступінь концентрації за об’ємом – 12 разів.

При відділенні лептоспір від рідкої фази суспензії як осаджуючу речовину використали ПЕГ-6000 у концентрації 10% та витримували його при + 4 - +80С протягом 4- 5 діб, при рН 7,0- 7,4. Інактивовану суспензію лептоспір штаму Icterohaemorrhagiae, яка містила до 200 клітиин у полі зору мікроскопа, розливали в ряд флаконів, та додавали осаджуючу речовину. У дослідному флаконі після 4-добового відстоювання в надосаді із 200±4,7 лептоспір у полі зору залишилось лише 11,2±1,2, тобто лептоспіри знаходились в осаді і їхня кількість становила 95% від загальної кількості лептоспір у суспензії. У контрольному флаконі протягом 5 діб практично не було зареєстровано осадження лептоспір. Під час проведення досліду рН середовища утримували на рівні показника 7,0-7,4.

Порівняння імуногенних властивостей лептоспірозного антигену, сконцентрованого за допомогою різних методів та неконцентрованою лептоспірозною суспензією проводили на кролях.

**Рис. 2. Динаміка антитілоутворення у відповідь на введення лептоспірозного антигену, концетрованого різними методами**

Отже, оптимальними методами концентрування лептоспірозного антигену є ультрафільтрація та відстоювання лептоспірозної суспензії.

**Порівняльна характеристика дослідних серій протилептоспірозних вакцин.** Застосовуючи вищенаведені методи обробки лептоспірозного антигену та лептоспірозної суспензії, нами проведено роботу по створенню дослідних серій моновалентних протилептоспірозних вакцин, що мало на меті опрацювання кількох рецептур складання вакцини, а саме:

1. Використання як концентруючу речовину ПЕГ та інактиватори: фенолу в концентрації 0,25%, формаліну - 0,30%, кристалвіолету - 0,05%.
2. Концентрування гідроокисом алюмінію (ГОА) та інактивація тими самими інактиваторами в зазначених концентраціях.
3. Використання як методу концентрації ультрафільтрації за допомогою порожнистих волокон та інактивації фенолом 0,25%, формаліном - 0,30%, кристалвіолетом - 0,05%.

До досліду були взяті такі культури лептоспір вакцинного ряду: серовар monjakov (серогрупа Pomona), серовар icterohaemorragiae (серогрупа Icterohaemorrahiae), серовар canicola (серогрупа Canicola), а також один із штамів з підвищеною антигенною та імуногенною активністю - серовар icterohaemorragiae (серогрупа Icterohaemorrahiae).

**Таблиця 3- Титри антитіл кролів у відповідь на застосування вакцин, які були інактивовані різними речовинами і сконцентровані за різними методами, М±m, n=9**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Сероваріант Icterohaemorrhagae** |  | ГОА | ПЕГ | Ультрафільтрація |
| Фор-малін | Фе-нол | КВ | Фор-малін | Фе-нол | КВ | Фор-малін | Фе-нол | КВ |
| М±m | 1:135±15 | 1:167±14 | 1:95±11 | 1:130±12 | 1:125±19 | 1:126±33 | 1:130 | 1:167±17 | 1:132±20 |

Застосування вакцини, виготовленої на основі лептоспірозних антигенів, інактивованих фенолом та концентрованих за допомогою метода ультрафільтрації, забезпечує найвищі аглютинаційні титри в сироватках крові кролів.

Отже, вакцина, до складу якої входить антиген з підвищеною антигенною та імуногенною активністю, в усіх варіантах дослідних вакцин виявився у 2,86 раза більш імуногенним з високим ступенем достовірності (P>0,005), ніж той, активність якого не підвищували.

**Таблиця 4 - Титри антитіл кролів у відповідь на застосування вакцин, які були інактивовані різними речовинами і сконцентровані за різними методами (після підвищення антигенної та імуногенної активності сероваріанта), М±m, n=9**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Сероваріант Icterohaemorrhagiae** |  | ГОА | ПЕГ | Ультрафільтрація |
| Фор-малін | Фе-нол | КВ | Фор-малін | Фе-нол | КВ | Фор-малін | Фе-нол | КВ |
| М±м | 1:356±12 | 1:320±67 | 1:285±44 | 1:400 | 1:370±67 | 1:385±44 | 1:435±67 | 1:434±23 | 1:470±76 |

Готові зразки дослідних вакцин перевіряли на нешкідливість, токсичність, стерильність, імуногенність за відомими методиками, повноту інактивації - за розробленою нами методикою. Нешкідливість і реактогенність вакцин визначали на лабораторних тваринах протягом 10 діб. Для визначення імуногенної активності новостворених дослідних зразків протилептоспірозних вакцин була проведена імунізація лабораторних тварин, в якості яких використовували кролів.

**Оцінка якості протилептоспірозних вакцин.** Досліджено 45 зразків різних серій вакцин проти лептоспірозу тварин, від різних виробників (Ставропольської біофабрики – 28 серій, Вітебської – 3, Армавірської – 10, Вангард (США)- 2, Нобівак - 2 серії). Підчас контролю протилептоспірозних вакцин різних виробників до уваги брали їхню імуногенність, нешкідливість, відсутність токсичності, стерильність, повноту інактивації.

Дослідження на нешкідливість проводили на лабораторних тваринах. Реактогенність дослідних вакцин не підтвердилась у жодному випадку, крім вакцин виробництва Ставропольської біофабрики (серія № 37) та Вітебської біофабрики (серія № 58).

Імуногенність вакцин перевіряли, вводячи її лабораторним тваринам вакцини внутрішньовенно в дозі 0,75 см3. Кров для досліджень від кролів відбирали шляхом пункції серця. В сироватках імунізованих тварин визначали титри антитіл у РМА, триразово на 14, 21, 35 добу після ін’єкції.

Усі взяті до досліду вакцини підлягали перевірці на ступінь інактивації пасажуванням їх на селективних середовищах. Відсутність живих лептоспір після триразового пасажування (по 10 діб кожне) свідчило про повну інактивацію лептоспірозного антигену. В окремих випадках після проведення циклів пассажування дослідних вакцин під час мікроскопії досліджуваних зразків виявляли поодиноких рухомих лептоспір з характерною морфологією. Цей факт свідчить про можливість неповної інактивації досліджуваної вакцини.

Звідси, враховуючи виняткову важливість перевірки протилептоспірозних вакцин на інактивацію, нами було запропоновано метод дослідження на ступінь інактивації як додатковий показник перевірки біопрепаратів на нешкідливість.

ВИСНОВКИ

1. Удосконалено лептоспірозні антигени, що забезпечують виготовлення якісних вітчизняних діагностичних та профілактичних протилептоспірозних препаратів.
2. Оптимальною схемою виготовлення високоспецифічних групових аглютинуючих лептоспірозних сироваток є метод гіперімунізації, що передбачає три внутрішьовенні ін’єкції в дозах 2, 4, 6 см3 з інтервалом 7 діб, та знекровлення на 10 добу після останньої ін’єкції.
3. Для виділення збудника лептоспірозу з патологічного матеріалу слід використовувати нирки, печінку, мозок тварин, що загинули; середовища EMGН та Кортгофа потрібно використовувати для культивування ізолятів.
4. Десятиразове пасажування вакцинних штамів Monjakov та Іcterohaemorrhagiae та діагностичних штамів Рomona та Copenhageni через організм морськиих свинок і подальше клонування отриманих ізолятів на твердому живильному середовищі (буферно-сироватковому агарі) протягом 5 пасажів забезпечило підвищення антигенної (в 5,2 раза) та імуногенної (в 3,4 раза) активності штамів лептоспір.
5. Використання штамів лептоспір, антигенну та імуногенну активність яких підвищено пасажуванням через організм морських свинок, для лептоспірозного поліантигену в ІФА забезпечує підвищення чутливості системи з 85 до 90% та її специфічності з 86 до 92%.
6. Встановлено оптимальні концентрації на культуру лептоспір інактивуючих речовин, що становлять для формаліну 0,3%, фенолу - 0,25, мертіоляту - 0,0002, кристалвіолету - 0,05% при температурі 320С.
7. Обов’язковим критерієм якості вакцин проти лептоспірозу тварин вважати перевірку на повноту інактивації, що полягає у 3-разовому пасажуванні зразка вакцини на живильних середовищах для культивування лептоспір.
8. Концентрування лептоспірозного антигену доцільно проводити фізико-хімічним методом розділення лептоспірозної суспензії за допомогою внесення ПЕГ у концентрації 10% та фізичним методом, за допомогою ультрафільтраційної установки на основі порожнистих волокон при швидкості протоку 0,1 – 0,8 м/с та внутрішньому тиску в роздільній системі 0,0005 МПа.
9. Застосування вакцини, виготовленої на основі лептоспірозних антигенів, інактивованих фенолом та концентрованих за допомогою методу ультрафільтрації, забезпечує найвищі аглютинаційні титри в сироватках крові кролів, що становлять в середньому 1:435±6; 1:434±23; 1:470±76.

**Пропозиції виробництву.**

Для виготовлення високоспецифічних групових аглютинуючих лептоспірозних сироваток пропонуємо використовувати метод гіперімунізації кролів, що передбачає три внутрішьовенні ін’єкції в дозах 2, 4, 6 см3 з інтервалом 7 діб, та знекровлення на 10 добу після останньої ін’єкції.

Для виготовлення якісного лептоспірозного антигену в ІФА пропонуємо використовувати штами лептоспір, імуногенну та антигенну активність яких підвищено пасажуванням через організм сприйнятливих тварин.

Концентрування лептоспірозного антигену для виготовлення вакцини проти лептоспірозу тварин пропонуємо проводити методом ультрафільтрації на порожнистих волокнах та відстоюванням за допомогою ПЕГ.

Для контролю лептоспірозної вакцини пропонуємо використовувати обов’язковий тест на повноту інактивації, що полягає у 3-разовому пасажуванні зразка вакцини на живильних середовищах для культивування лептоспір.

**Перелік робіт, опублікованих за темою дисертації:**

1. Еверт В.В. Порівняльна інактивація лептоспір серогруп Pomona, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiaeрізними хімічними факторами // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: Збірник наукових праць.-Біла Церква, 2001.– Вип.18. –С. 43-48.
2. Еверт В.В. Порівняльна характерисика вакцин різних виробників проти лептоспірозу тварин // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: Збірник наукових праць.-Біла Церква, 2002.– Вип.21. –С. 62 - 66.
3. Еверт В.В. Порівняння методів одержання сироваток групових аглютинувальних лептоспірозних // Ветеринарна медицина України. – 2002.- №7. – С.45.
4. Еверт В.В., Кучерявенко О.О. Виділення та ідентифікаця лептоспіри з тканин абортованого плоду // Науковий вісник Національного аграрного університету. – Київ, 2001. – Вип. 36. – С.162 – 164.
5. Резуненко Є. В., Кучерявенко О-й. О., Еверт В.В. Спосіб концентрування лептоспірозного антигену. Патент України №2001031538. Бюл.№7, 2001.
6. Кучерявенко О-й. О., Кучерявенко О-р. О., Еверт В.В., Д’яченко Г.В. Спосіб концентрування лептоспірозного антигену. Патент України № 2001021255. Бюл.№7, 2001.
7. Кучерявенко О.О., Еверт В.В. Спосіб інактивації лептоспірозного антигену. Рішення про видачу патенту України за заявкою № 2002010385, вих. № 28089, 2002.

**Еверт В.В. Удосконалення діагностичних та профілактичних препаратів при лептоспірозі тварин. — Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16. 00. 03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. Національний аграрний університет, К., 2002.

Дисертація присвячена питанню підвищення антигенної та імуногенної активності лептоспірозних антигенів. Розроблено оптимальний метод виготовлення високоспецифічних групових аглютинуючих сироваток, що передбачає гіперімунізацію кролів. Запропоновано схему виділення лептоспір з нирок, головного мозоку, висів гомогенізату цих органів на середовища Кортгофа та ЕМGН, застосування не меньш 20 аглютинуючих сироваток для ідентифікації ізолятів. Підвищено антигенну та імуногенну активність вакцинних штамів лептоспір Monjakov та Іcterohaemorrahiae, діагностичних штамів Рomona та Copenhageni шляхом 10-разового пасажування їх в організмі сприйнятливих тварин, та наступним пасажуванням ізолятів на твердому живильному середовищі.

Запропонований варіант лептоспірозного поліантигену для діагностичної тест-системи “ІФА-лептоспіроз” дав змогу підвищити специфічність з 86 до 92% та чутливість системи з 85 до 90%. Встановлено, що інактивуюча концентрація формаліну на культуру лептоспір становить 0,3%, фенолу - 0,25, мертіоляту - 0,0002, кристаллвіолету - 0,05%. Концентрувати лептоспірозну суспензію можна за допомогою методу ультрафільтрації та відстоюванням з внесенням 10% ПЕГ. Застосування вакцини, виготовленої на основі лептоспірозних антигенів, інактивованих фенолом та концентрованих за допомогою методу ультрафільтрації, забезпечує аглютинаційні титри 1:434±23, 1:435±67 у сироватках крові кролів.

Ключові слова: лептоспіри, сироватка крові, антиген, антитіло, ультрафільтрація, ізоляти.

**Эверт В.В. Усовершенствование диагностических и профилактических препаратов при лептоспирозе животных. — Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология. Национальный аграрный университет, К., 2002.

Диссертация посвящена вопроосу повышения антигенной и иммуногенной активности лептоспирозных антигенов.

Разработан оптимальный метод изготовления высокоспецифичных групповых агглютинирующих сывороток, который предусматривает три внутривенные иньекции в дозах 2, 4, 6 см3 с интервалом 7 суток, обескровливание - на 10-е сутки после последнего введения. Для иммунизации была использована концентрированная и неконцентрированная лептоспирозная суспензия, выращенная на средах Кортгофа, EMJH. Установлено, что титры антител у животных, которых иммунизировали неконцентрированными антигенами, выращенными на среде Кортгофа,в 1,5 - 2 раза ниже, чем концентрированные на той же среде, или по сравнению с титрами, полученными от кролей, которых иммунизировали антигенами, выращенными на среде ЕМGН (как концентрированными так и не концентрированными).

Предложено схему выделения лептоспир из почек, головного мозга, посев гомогенизатов этих органов на среду Кортгофа с 10 % сыворотки крови овец, и твин-альбуминовою среду ЕМGН. Культивирование проводилось на протяжении 3-5 месяцев. Для серологической идентификации изолятов использовали набор из не менее чем 20 агглютинирующих сывороток.

Повышение антигенной и иммуногенной активности лептоспир проводили путем 10-кратного пассажирования каждого из взятых в опыт штаммов в организме молодых морских свинок, с последующим 5-кратным пассажем на твердой питательной среде, после чего дана оценка их антигенной и иммуногенной активности. Для сероварианта monjakov антигенная активность повысилась в 6 раз, для рomona – 6, для сopenhageni – 5, для іcterohaemorrahiae – в 5 раз. Исходные штаммы повысили свою иммуногенную активность, по сравнению с данными в начале опыта, в среднем в 3,4 раза.

Сероварианты лептоспир, имуногенная и антигенная активность которых была повышена, использовались для изготовления диагностической тест-системы «ИФА – лептоспироз». Предложенный нами вариант лептоспирозного полиантигена позволяет повысить чувствительность системы с 85 до 90% и специфичность системы с 86 до 92 %.

Установлено, что инактивирующая концентрация формалина на культуру лептоспир составляет 0,3%, фенола - 0,25, мертиолята - 0,0002, кристаллвиолета 0,05%. Полная инактивация лептоспир проходит за 36, 24, 48 часов соответственно. Установлено, что наиболее приемлемой температурой для инактивации лептоспирозной суспензии является 320С.

Проведенные исследования позволили предложить способ концентрирования лептоспирозного антигена с помощью физико-химического метода разделения лептоспирозной суспензии с помощью внесения ПЕГ в концентрации 10% и способ концентрирования физическим методом, который предусматривает использование ультрафильтрационной установки на основе полых волокон, при скорости потока в пределах 0,1-0,8 м/с и внутреннем давлении в разделительной системе 0,0005 МПа.

Используя вышеназванные методы обработки лептоспирозного антигена и лептоспирозной суспензии, нами проведна робота по созданию опытных серий моновалентных противолептоспирозных вакцин, что позволило отработать определенные рецептуры составления вакцины. Готовые образцы опытных вакцин проверяли на безопасность, отсутствие токсичности, стерильность, иммуногенность по известным методикам, полноту инактивации - по предложенной нами методике. Разработаны нормативные документы по изготовлению и использованию агглютинирующих сывороток, тест-систем «ИФА-лептоспироз», моновалентной противолептоспирозной вакцины, при составлении которых использованы результаты диссертационной работы.

Ключевые слова: лептоспиры, сыворотка крови, антиген, антитело, ультрафильтрация, изоляты.

**Evert V.V. Improvement of diagnostic and prophylactic tools for leptospirosis in animals.**

Dissertation for the scientific degree of doctoral candidate of veterinary science, specializing in 16.00.03 - veterinary microbiology and virology. National Agricultural University, Kiev, 2002.

The dissertation considers the question of raising the antigenic and immunogenic activity of leptospires. It describes the optimal method of preparing hyperimmune rabbit serume, which is highly specific for particular serogroups. It proposes an optimal scheme for extracting leptospires from kidney and brain tissue, by sowing tissue homogenate on Korthoff or EMJH media, and identifying the isolates using 20 types of agglutinating serum. The antigenic and immunogenic activity of the following strains was raised using 10 passages through animals that were susceptible to that strain: diagnostic strain -Pomona, vaccine strains - Monjakov and Icterohaemorrhagiae. These strains were subsequently isolated and grown on solid culture media. A polyantigen for a leptospirosis ELISA test is proposed, which raises the specificity of the test from 86% to 92%, and its sensitivity from 85% to 90%. The following optimal concentrations of chemicals were needed to inactivate leptospire culture: formalin 0.3%, phenol, 0.25%, merthiolate, 0.0002%, crystal violet, 0.05%. Ultrafiltration and 10% PEG were used to concentrate leptospiral culture. Vaccines prepared using leptospiral antigens inactivated with phenol and concentrated using ultrafiltration give high agglutination titres in blood serum of rabbits (1:434±23, 1:435±67).

Key words: leptospires, blood serum, antigen, antibody, ultrafiltration, isolates.

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