

## FACTORS PATHOGENS EXCITER AT PSEUDOMONOSIS INFECTION

Gadzevych O. V.

National Science Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

The literature review provides an analysis of virulence factors exciter pseudomonosis infection, presents the current scientific literature on the pathogenesis of the disease. Described properties *Pseudomonas aeruginosa* (adhesion, the ability to form biofilms and extracellular slime) which play a crucial role in the defeat of various organs. Understanding the biology of the pathogen and knowledge of its pathogenicity factors allow reasonably and effectively carry out therapeutic, preventive and sanitary-hygienic measures on the farm. That, in turn, will get rid of pathogenic forms of *Pseudomonas aeruginosa* in the foci of infection, eliminate bacteriocarrier and cure animals in the farms.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenicity factors, ethiopathogenesis disease

УДК: 619:616.155.392-078:57.083.33:578.828.11:636.22/.28(477)

СТАНОВЛЕННЯ ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ВІТЧИЗНЯНОГО  
ДІАГНОСТИКУМУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Горбатенко С. К., Стегній Б. Т., Вовк С. І., Корнєйков О. М., Стегній М. Ю., Дунаєв Ю. К.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Наведено матеріали про розробку та етапи удосконалення вітчизняного діагностичного набору для індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин у реакції імунодифузії, визначена економічна ефективність від впровадження.

**Ключові слова:** антиген, лейкоз, культура клітин FLK-BLV, поживне середовище, діагностикум, економічна ефективність.

У практиці індикації інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) тварин у сучасних умовах використовуються засоби серологічного плану, а саме реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД) та метод імуноферментного аналізу (ІФА) [1, 2]. В останні роки набуває значення використання з вищезначеною метою молекулярно-генетичних методів дослідження (ПЛР) у різних модифікаціях. У науковій літературі досконало визначена роль кожного вищезначеного діагностичного тесту. Перевагою реакції імунодифузії є її простота у виконанні, порівняльно низька вартість компонентів діагностичного набору. Постановка та облік результатів дослідження у РІД не потребує складного лабораторного обладнання, реакція характеризується високою специфічністю. Недоліком тесту є наявність незначного порогу чутливості при виявленні інфікованих вірусом лейкозу тварин, що не дає змоги виявляти окремих особин на перших етапах прояву етапу сероконверсії. Метод імуноферментного аналізу відрізняється підвищеною, у порівнянні з реакцією імунодифузії, чутливістю. Використання методу ІФА дає змогу більш ефективно позбуватись вірусоносіїв у стаді, особливо при завершенні оздоровчої протилейкозної програми [3]. Використовуючи метод ІФА можна контролювати благополуччя стада великої рогатої худоби щодо лейкозу дослідженням пулів сироватки крові чи молока, це полегшує зусилля фахівців тваринництва та ветеринарної мережі у питаннях діагностики та зменшує ризики розповсюдження збудника захворювання. У діагностичній практиці лабораторій ветеринарної медицини України використовуються тест-системи для ІФА-аналізу закордонного виробництва – IDEXX, VMRD, Simbiotics Corporation, НПО «Нарвак». Конкурентоспроможні тест-системи вітчизняного виробництва у стадії розробки. За цих обставин, у зв'язку з високою вартістю закордонних діагностикумів і дефіцитом обладнання для постановки та обліку ІФА, використання цього тесту в умовах державних лабораторій ветеринарної медицини України поки що обмежене.

Дослідження лейкозу ВРХ за допомогою молекулярно-генетичних методів успішно використовуються на рівні провідних діагностичних центрів ветеринарного профілю. Метод у сучасних умовах використовується на рівні оцінки благополуччя щодо лейкозу високоцінних тварин, при проведенні арбітражних досліджень [4]. Перевагою методу є визначення наявності РНК чи провірусної ДНК збудника лейкозу в організмі інфікованих тварин вже на перших етапах інкубаційного періоду, до прояву сероконверсії [5]. Метод перспективний і, безумовно, займе своє місце у діагностичній мережі при наявності необхідного обладнання та висококваліфікованих фахівців відповідного профілю [6].

**Метою** повідомлення є аналіз етапів конструювання та удосконалення вітчизняного лейкозного діагностичного набору, що використовується в РІД, доведення його до якості, яка не поступається кращим закордонним аналогам.

**Матеріали та методи.** Піддано аналізу результативність пошуку вітчизняного конкурентоспроможного діагностичного тесту для індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин на основі серологічного обстеження погोलів'я в РІД, що проводився

в умовах лабораторії вивчення лейкозу ННЦ «ІЕКВМ» та ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина». Висвітлено етапи удосконалення елементів діагностичного набору, впровадження останнього у практику роботи державних лабораторій ветеринарної медицини та економічну ефективність заходів по викориненню лейкозу великої рогатої худоби у тваринництві України з використанням розробленої тест-системи.

**Результати досліджень.** Пошук вільних від мікробних контамінантів і баластних речовин температурно стабільних лейкозних антигенів, а також живильних середовищ для їх культивування, рецептура яких оптимізована за ростовими властивостями, розпочато за участі академіка Бусола В.О., науковців лабораторії вивчення лейкозу ННЦ «ІЕКВМ» Цимбал В.І., Кіпріча В.В., Бабкіна А.Ф. та інших ще у 80-ті роки минулого сторіччя. Розробка способу отримання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії вищеозначеними авторами була вперше в Україні підтверджена авторським свідоцтвом у 1990 році [7]. Перші варіанти діагностичного набору для виявлення інфікованих вірусом лейкозу тварин у реакції імунодифузії були недосконалими – антиген вимагав постійного зберігання у замороженому стані, а багаторазовий режим дефростації при його використанні негативно впливав на чутливість та активність останнього. У подальшому, у процесі удосконалення діагностичного набору, передбачалось вирішення ряду важливих питань.

У першу чергу, з метою забезпечення високої активності та збереження властивостей діагностичних наборів у процесі використання, необхідно було вирішити питання конструювання високоочищених концентрованих антигенів ВЛ ВРХ рідкого стабілізованого та сухого ліофілізованого, активних у реакції імунодифузії. Для цього передбачалась розробка технології виробництва сироваток крові для репродукції культури клітин ФЛК-БЛВ, яка забезпечувала отримання АГ ВЛ ВРХ на рівні світових стандартів, а в подальшому і розробка технології виробництва комплексних поживних середовищ на основі порошкових форм субстратів 199, Ігла, L-глутаміну, нормальної та аглобулінової сироватки крові ВРХ. Ці питання вирішувались у виявленні оптимальних співвідношень компонентів ростових субстратів і біодомішок до них при культивуванні клітин FLK-BLV. При реалізації завдань по вирішенню вищеозначеного було вивчено активність і специфічність антигенів, а також позитивних контрольних сироваток з вмістом 5, 10, 15, 20 і 30 % стабілізаторів. Відпрацьовано технологію одержання сухого лейкозного антигену з культуральної рідини клітин FLK-BLV, зрощених на живильних середовищах, до складу яких входила аглобулінова сироватка. Підібрано оптимальну концентрацію ПЕГ-4000 і ПЕГ-6000 в агаро-сольовій суміші для проявлення більш чіткої лінії преципітації в реакції імунодифузії. Зразки рідких стабілізованих і сухих ліофілізованих антигенів, рідких стабілізованих і сухих ліофілізованих контрольних сироваток, агаро-сольової суміші, а також агаро-сольової суміші оптимізованої сухої зберігали за температури  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ ,  $18\text{--}22 ^\circ\text{C}$  та мінус  $20 ^\circ\text{C}$ . При щомісячному випробуванні активності, специфічності та стерильності вихідні показники не змінювались протягом шести місяців.

Важливого значення набуло вивчення ростових властивостей аглобулінової (ПЕГ-обробленої) сироватки, як компоненту живильних середовищ. Після осадження комплексу глобулінів ПЕГ-115 (від 6,5 до 11,0 %), освітлення центрифугуванням при 20–22 тис. об/хв та стерилізуючої фільтрації крізь Pall-фільтри, сироватка в концентрації від 15 до 20 % у живильних середовищах «199» та «Eagle» забезпечила вихід лейкозного АГ в титрах від 1:3,8 до 1:5,2 в порівнянні з титрами від 1:1,8 до 1:2,0 для середовищ з нативною сироваткою. На основі сухих компонентів середовищ «Eagle», «199», «L-glutamin» та аглобулінової сироватки проведено виготовлення комплексного середовища для культивування клітин ФЛК+БЛВ. Контрольна перевірка середовища виявила його високу мітогенну активність для клітин ФЛК+БЛВ. Неабиякого значення набуло і підтвердження стимулюючої дії інсуліну на ріст та антиген продукуючу активність клітин FLK-BLV в концентрації  $0,0014 \text{ мг/см}^3$  поживного середовища, що дозволило підвищити вихід лейкозного антигену в 2 рази. Підібрано оптимальну концентрацію інсуліну –  $2 \text{ см}^3$  14,3 %-ного розчину на  $300 \text{ см}^3$  поживного середовища для культивування культури клітин FLK-BLV. Випробувана з позитивним результатом роста активність класичного середовища (45 % середовища 199 + 45 % середовища Ігла + 10 % сироватки крові ВРХ) з добавками триптичного гідролізату крові та м'ясного фаршу. Поряд з цим відпрацьовано технологію виготовлення атоксичних нативної та аглобулінової сироваток крові великої рогатої худоби. Антиген, одержаний з клітинно-культуральної рідини, вирощеної з використанням такої сироватки, має титр до 1:7 у порівнянні з 1:3 за звичайною технологією.

Як результат цієї кропіткої роботи були позитивні наслідки комісійного випробування в умовах ННЦ «ІЕКВМ» рівня активності, специфічності та чистоти відносно мікробної забрудненості зразків компонентів діагностичного набору, розробленого науковцями установи. Зразки за усіма показниками співвідносились з референтним набором Курської біологічної фабрики (Росія). У подальшому випробування проводились на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). На підставі державних випробувань, проведених згідно з програмою досліджень у порівнянні з «Набором для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» (виробництва ФДПУ «Курская биофабрика») було доведено, що компоненти наборів, виготовлені у ННЦ «ІЕКВМ», перевершують аналогічні компоненти, виготовлені Курською біофабрикою за активністю в РІД та розчинністю сухих компонентів. Завершенням цих порівнянь були висновки комісійного випробування біологічних якостей діагностичного набору, розробленого у ННЦ «ІЕКВМ», проведеного в умовах референс-лабораторії МЕБ (Польща, Пулава) паралельно з аналогічними зразками кращих європейських виробників – інституту Pourquier, D-r Bommeli AG., Simbiotics Corporation. За висновками комісійного порівняння, діагностичний набір для індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин у реакції імунодифузії виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» нічим не поступається кращим закордонним препаратам-аналогам. Усе це дало змогу мінімізувати, а у подальшому взагалі припинити забезпечення державних лабораторій ветеринарної медицини України імпортними діагностичними засобами за рахунок нарощування виробництва вітчизняного діагностичного, що не поступається біологічними властивостями, але значно знижує бюджетні витрати на його виробництво та практичне впровадження.

Виробництво діагностичних наборів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в РІД організоване на базі ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків). Передбачалось виробництво діагностичного в обсягах, що забезпечували

б на перших порах переважну частину діагностичних лабораторій ветеринарної медицини в Україні – це пов'язувалось з тим, що на перших етапах впровадження діагностикуму його виробництво, за харківською технологією, було освоєне ще у двох закладах – Інституті епізоотології (м. Рівне) та підприємстві «Лейконад» (м. Полтава). Частково два останні заклади і забезпечували діагностичну мережу в обмежених регіонах. Останні чотири роки виробництво лейкозного діагностикуму в межах м. Рівне припинене, а підприємство «Лейконад» переймається сьогодні виробництвом діагностикуму лише для забезпечення діагностичних підрозділів Полтавської області. Таким чином, на ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» покладена відповідальність стосовно забезпечення діагностичними наборами по індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин у РІД в усіх, за винятком Полтавської області, державних лабораторіях ветеринарної медицини України.

Варто зазначити, що із року в рік обсяги виробництва лейкозного діагностикуму в умовах Харківського підприємства нарощувались. У період з 1988 по 2005 роки чисельність лейкозних наборів у перерахунку на діагностичну дозу коливалась у межах від 3–4,8 млн. доз на початковому етапі виробництва до 10–15 млн. доз при максимальному попиті на препарат та інтенсивному впровадженню програми ірадикації лейкозу великої рогатої худоби у тваринництві України. Після 2005 року обсяги виробництва діагностикуму значно скорочені у порівнянні з попередніми роками до рівня 3–3,5 млн. доз – це обумовлено як зменшенням чисельності поголів'я, так і покращенням епізоотичної ситуації у тваринництві України щодо лейкозу великої рогатої худоби. Як наслідок – зниження попиту на діагностикум. Усього за період з 1988 по 2015 роки ТОВ «НДП» «Ветеринарна медицина» вироблено та впроваджено у виробництво 21806 тисяч доз лейкозного антигену сухого та 141253 тисячі доз рідкого стабілізованого. При цьому розмір заощаджень за рахунок уникнення імпортозалежності при застосуванні вітчизняного діагностикуму щорічно складав, за економічними розрахунками, 1870 тисяч гривень, а загальна сума заощаджень державних коштів від вищезазначеного за увесь період впровадження становить 48 932 тисячі гривень.

Головне значення має та позитивна роль, яку відіграла розробка науковців ННЦ «ІЕКВМ» стосовно вирішення питання ранньої діагностики лейкозу в інфікованих тварин, освоєння виробництва вітчизняного конкурентоспроможного препарату з подальшим його забезпеченням діагностичної ветеринарної мережі України. Впровадження широкомасштабної системи протилейкозних оздоровчих заходів на основі серологічної диспансеризації поголів'я з метою видалення із стада інфікованих вірусом лейкозу тварин забезпечило значне скорочення інтенсивності розповсюдження захворювання, а на кінець 2015 року – ліквідацію лейкозу великої рогатої худоби у тваринництві України.

**Висновки.** 1. Уперше в Україні сконструйовано компоненти діагностичного набору для індикації інфікованих вірусом лейкозу тварин у реакції імунодифузії, освоєно виробництво препарату в рідкій стабілізованій та ліофілізованій (сухий) формах в обсягах, що забезпечують потребу мережі державних лабораторій ветеринарної медицини України.

2. Впровадження у ветеринарну практику України конкурентоспроможного вітчизняного діагностикуму забезпечило позбавлення залежності від закордонних аналогів, при цьому загальна сума заощаджень державних коштів від впровадження розробки становить 48 932 тисячі гривень.

#### Список літератури

1. Choi, K.Y. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle [Text] / K.Y. Choi, R.B. Liu, G.C. Buehring // J. Virol. Methods. – 2002. – № 104. – Р. 33–39.
2. Домбровський, О.Б. Використання сучасних методів діагностики лейкозу в неблагополучних господарствах [Текст] / О.Б. Домбровський // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин та ДННДКІ вет. препаратів та кормових добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10, № 4. – С. 258–262.
3. Порівняльна оцінка серологічних та молекулярно-генетичного методів прижиттєвої діагностики лейкозу великої рогатої худоби [Текст] / В. О. Бусол [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2007. – Вип. 88. – С. 37–42.
4. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу [Текст]: затв. наказом Держ. ком. вет. медицини України 21.12.2007, № 21 ; зареєстр. в Мін. юстиції України 11.01.2008 р., № 12/14703. – К., 2008. – 8 с.
5. Молекулярно-генетичний контроль результативності протилейкозних оздоровчих заходів [Текст] / С.К. Горбатенко та ін. // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2007. – Вип. 88. – С. 77–83.
6. Діагностика лейкоза крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции [Текст] / А.И. Ломакин [и др.] // Тр. ВНИИЗВ. – М., 1999. – Т. 72. – С. 192–202.
7. А. с. 1585951 СССР. Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии [Текст] / Цымбал В.И., Киприч В.В., Бусол В.А., Шишков В.П., Бурба Л.Г., Валихов А.Ф. (СССР). – № 4627393/30–13; заявл. 27.12.88; опубл. 15.04.1990. – ДСП. – 2 с.

#### FORMATION AND IMPROVEMENT OF THE DOMESTICALLY-PRODUCED KIT FOR BOVINE LEUCOSIS DIAGNOSTICS

**Gorbatenko S. K., Stegnyy B. T., Vovk S. I., Korneykov A. N., Stegnyy M. Yu., Dunaev Yu. K.**  
*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

*The materials concerning the development and improvement of the national diagnostic kit for indication of infected animals by BLV using precipitation reactions in agar-gel diffusion test are presented. It was determined the cost-effectiveness of its implementation.*

*Materials and methods. The analysis of experimental studies according to development of optimal culture media, the ratio of its components and cultivation regime of FLK-BLV cultivating were carried out. The technological approaches for the design and improvement of diagnostic kits and the effectiveness of its implementation in manufacturing were analyzed.*

*Results. A growth activity of the classic medium – mix of medium 199, Eagle Medium and bovine serum (45%+45%+10%) was tested with the positive result. The technology of globulin-free non-toxic native bovine blood serum production was worked out. The antigen derived from cell-culture fluid which was grown using such serum characterized by a titer 1:7 compared to 1:3 after conventional technology. It was studied the properties of the globulin-free (PEG-treated) serum as a component of culture media. On the basis of the dry components of the «Eagle», «199», «L-glutamin» and globulin-free serum a manufacturing of the complex medium for the FLK-BLV culturing was conducted.*

*The studies in in the OIE reference laboratory in Pulawy confirmed that kit from the company «Veterinary Medicine» Ltd is not inferior to the best European producers such as Pourquier Institute, D-r Bommeli AG., Symbiotics Corporation.*

*Conclusions. 1. For the first time in Ukraine diagnostic kit was constructed for indication of infected animals by BLV using immune diffusion test. Manufacture of the components are provided as liquid and lyophilized forms that satisfy the needs of the national laboratory network of Veterinary Medicine in Ukraine.*

*2. An implementation of the competitive domestic diagnosticum in Ukrainian veterinary practice relieved dependence of foreign analogues, while the total savings of public funds from the introduction of the development is 48.9 million UAH.*

**Keywords:** Bovine leucosis, FLK-BLV cell culture, medium, diagnosticum, economic efficiency

УДК: 619:579.831:616-076

## **ОЦІНКА ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИМІКРОБНОГО ЗАСОБУ «ВЕРМІБАК-ПЛЮС» ПРИ ЛІКУВАННІ АЕРОМОНОЗУ РИБ**

**Євтушенко А. В., Євтушенко І. Д.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: aevt@ukr.net*

**Воловик Т. П., Збожинська О. В.**

*Рівненська дослідна станція, м. Рівне, Україна*

*У статті представлені результати досліджень з розробки протимікробного засобу на основі флорфеніколу із природним сорбентом вермикулітом – препарату «Вермібак-плюс». Терапевтична ефективність препарату «Вермібак-плюс» спостерігається при застосуванні його у дозі 7,0 мг/кг маси (за ДР). Результати проведених випробувань експериментальної серії препарату «Вермібак-плюс» в умовах виробництва свідчать про те, що він не поступається за ефективністю імпортованим препаратам та звільняє організм риб від інфекції вже на сьому добу лікування.*

**Ключові слова:** аеромонади, вермикуліт, флорфенікол, риба, терапевтична ефективність

Бактеріальні захворювання риб залишаються актуальною проблемою для промислового рибництва. За останні десятиріччя в умовах аквакультури та природних водоймах спостерігається тенденція до зростання рівня захворюваності риби на бактеріальні хвороби. Поширенню інфекційних хвороб сприяє безконтрольне завезення риби з рибогосподарств з невизначеною епізоотичною ситуацією, незадовільний санітарний стан водойм, а також несвоєчасна діагностика захворювань. Система контролю при аеромонозі риб включає проведення ветеринарно-санітарних заходів із застосування протимікробних засобів. Розробка і впровадження нових лікарських форм протимікробних засобів для лікування бактеріальних захворювань риб є актуальним питанням і потребує вирішення.

**Метою** роботи було розробити лікарську форму протимікробного засобу на основі флорфеніколу із природним сорбентом вермикулітом - препарату «Вермібак-плюс», визначити його терапевтичну дозу за аеромонозу коропа, провести порівняльну оцінку терапевтичної ефективності з іншими протимікробними засобами, випробувати експериментальну серію препарату «Вермібак-плюс» в умовах виробництва.

**Матеріали та методи.** Було розроблено декілька варіантів порошкоподібної лікарської форми препарату на основі діючої речовини – флорфеніколу з різною концентрацією наповнювачів – вермикуліта та крохмалю. Для визначення ефективності та терапевтичної дози препарату було створено п'ять груп риб (короп лускатий дволітнього віку масою 200-250 г) по 10 особин у кожній. Рибу заражали збудником аеромонозу із застосуванням штаму *Aeromonas hydrophila* K5-06. Для зараження використовували змиви з (24–48)-годинної агарової культури стандартизовані до концентрації  $10^9$  мікробних клітин за оптичним мікробіологічним стандартом ДНКІБШМ. Культуру вводили внутрішньочеревно в дозі  $0,1 \text{ см}^3$  ( $1 \times 10^8$  мікробних клітин). Через п'ять діб рибам дослідних груп індивідуально за допомогою катетера на основі 2 %-го крохмального клейстеру задавали різні лікарські форми протимікробного засобу: рибам I-групи – флорфенікол (наповнювач – крохмаль) у добовій дозі 10,0 мг/кг (за ДР) протягом семи діб, II-групи – флорфенікол (наповнювач – крохмаль) у добовій дозі 7,0 мг/кг (за ДР) протягом семи діб; III-групи – флорфенікол