

MYCOBACTERIA ISOLATED AT DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS CATTLE

Kotlyar A.V.

National Scientific Centre "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

From biological material bovine tuberculin reagiryuchih allocated 10 species of mycobacteria culture (*M. gordona*, *M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. flavescens*, *M. diernhoferi*) that cause the reaction to tuberculin in laboratory animals and do not cause pathological changes typical for tuberculose.

УДК 619:615.371:616.98:578:619.2

РЕЗУЛЬТАТИ КОМІСІЙНОГО ВИПРОБУВАННЯ ВАКЦИНИ ІНАКТИВОВАНОЇ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ, ПАРАГРИПУ-3 ТА ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ «РИПАВАК-3»

Кучерявенко В.В., Кучерявенко Р.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Годовський О.В.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Вірусні пневмоентерити займають провідне місце в інфекційній патології великої рогатої худоби. Головна роль в їх виникненні належить вірусам збудникам інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), парагрипу-3 (ПГ-3) та вірусної діареї (ВД) [1, 2, 3].

Вірусні пневмоентерити частіше за все спричиняються асоціацією вище вказаних вірусів і перебігають набагато важче, що часто призводить до загибелі тварин. Тваринницькі господарства таким чином несуть значні економічні збитки [4, 5].

Для профілактики захворювань, які спричинені вірусами ІРТ, ПГ-3 та ВД в ННЦ «ІЕКВМ» розроблена інактивована вакцина «Рипавак-3».

Згідно наказу № 18 від 24.04.2012 р. директора Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів проведено комісійне випробування «Вакцини інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3» на базі лабораторії вивчення вірусних хвороб рогатої худоби ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. У проведенні досліджень крім авторів даної статті приймали участь: заступник директора ДНКІБШМ, кандидат ветеринарних наук Бабкін М.В. (голова комісії); науковий співробітник Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ, кандидат ветеринарних наук Напненко О.О.

Матеріали та обладнання. Випробування проводили згідно затвердженої програми за наступними показниками: зовнішній вигляд, колір, маркування; наявність сторонніх домішок, порушення укупорки цілісності флаконів; стерильність; нешкідливість; антигенна активність; повнота інактивації та рівень рН. Для дослідження використовували: світловий мікроскоп; рН-метр; термостат з температурою підігріву (37,0–37,0) °С; холодильник побутовий; пробірки з моношаром перещеплюваних клітин нирки вівці (НВ); живильне середовище 199 та Ігла; центрифугу з частотою обертів до 8000 об/хв.; білих мишей (10 голів); мурчаків масою не менше 300 г. (10 голів).

Проведення досліджень та результати.**1. Визначення зовнішнього вигляду, кольору, маркування.**

Визначення зовнішнього вигляду, кольору та маркування проводили візуально в пронизуючому світлі.

Результат: вакцина мала вигляд рожевої рідини з пухким осадом білого кольору, який при збовтуванні легко розбивався в однорідну суспензію. Маркування відповідало ДСТУ 4614.

2. Наявність сторонніх домішок, порушення укупорки та цілісності флаконів.

Визначення сторонніх домішок, порушення укупорки та цілісності флаконів проводили візуально в пронизуючому світлі.

Результат: сторонні домішки, порушення укупорки та тріщини флаконів відсутні.

3. Визначення стерильності.

Проводили визначення контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою відповідно до ДСТУ 4483:2005.

Результат: Бактеріальна та грибна мікрофлора відсутня.

4. Визначення нешкідливості.

Нешкідливість визначали згідно СОУ 85.20-37-391 на білих мишах.

Результат: вакцина нешкідлива.

5. Визначення антигенної активності.

Антигенну активність вакцини визначали шляхом введення препарату внутрішньом'язово в ділянку стегна п'яти мурчакам у дозі 2,0 см³. П'ять тварин використовували в якості контролю, для чого вище зазначеним методом вводили середовище 199 (плацебо). Через 18 діб обом групам тварин проводили повторне введення відповідного препарату. Ще через 14 діб були відібрані сироватки крові, котрі були досліджені на наявність специфічних до вірусів ІРТ та ВД антитіл в реакції нейтралізації (РН) відповідно до СОУ 85.20-37-621, а також антитіл до вірусу ПГ-3 в реакції затримки гемаглютинації згідно СОУ 85.20-37-306.

Результат: титр антитіл до ВД становив 1:32, до ІРТ – 1:64, до ПГ-3 – 1:160.

6. Визначення повноти інактивації.

Зразок вакцини у стерильних умовах центрифугували 25 хв за 4000 об./хв. Для відокремлення вірусної маси від ад'юванту, стерильною піпеткою відбирали надосад, який використовували для визначення повноти інактивації. Повнота інактивації оцінювалась за відсутністю розмноження вірусу в чутливій культурі клітин нирки вівці впродовж трьох пасажів, що визначали за його цитопатогенною дією (ЦПД).

Результат: вакцина інактивована.

7. Визначення рівня рН.

Визначення рівня рН виконували за допомогою рН-метра згідно з інструкцією по експлуатації приладу.

Результат: рівень рН становив 7,4.

Висновки. 1. Вакцина інактивована проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3» відповідає вимогам ТУ У.

2. Розроблена в лабораторії вивчення вірусних хвороб рогатої худоби ННЦ «ІЕКВМ» вакцина інактивована проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї великої рогатої худоби «Рипавак-3» антигенно активна, що дозволяє її використання для профілактики вище зазначених захворювань.

Список літератури

1. Мищенко, В.А. Проблема респираторних смешаних інфекцій молодняка КРС [Текст] / В.А. Мищенко //Матеріали Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ», 30-31 октября 2003г. – Владимир, 2003. – С. 73–77. 2. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота [Текст]/А.Г. Готов [и др.]//Ветеринария. – 2002. – №3. – С. 17–21. 3. Кучерявенко, Р.О. Інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби (епізоотологія, діагностика та специфічна профілактика) [Текст] : дис. ... канд. вет. наук / Р.О. Кучерявенко. – Х., 2003. – 168 с. 4. Кучерявенко, В.В. Специфічна профілактика вірусних пневмоентеритів великої рогатої худоби – запорука отримання біологічно безпечної продукції тваринництва [Текст] / В.В. Кучерявенко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2010. – Вип. 94. – С. 83–84. 5. Вакцинація против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 как важное звено в цепи профилактики ассоциированных вирусно-бактериальных инфекций крупного рогатого скота [Текст] / В.И. Стеценко [и др.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 272–274.

THE RESULTS OF COMMISSION TESTING OF INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS, PARAINFLUENZA-3 AND BOVINE VIRAL DIARRHEA INACTIVATED VACCINE "RYPAVAK-3"

Kucheryavenko V.V., Kucheryavenko R.O.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

Godowsky O.V.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains, Kyiv

Were presents the results of commission testing of infecti us rhinotracheitis, parainfluenza-3 and bovine viral diarrhea in active at edvaccine "Rypavak-3"

УДК 576.851.47.078.39

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ОЗНАЧЕННЯ ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У МІКРООРГАНІЗМІВ, ЗДАТНИХ ДО РОЙННЯ (НА ПРИКЛАДІ БАКТЕРІЙ РОДУ *PROTEUS*)

Мартиросян І.О.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ», м. Харків

Вивчення особливості патогенезу протейних гнійно-запальних інфекцій та роль у ньому лецитинази збудника. Лецитиназу активність серед штамів *P. vulgaris* виявили 44,44 %, серед штамів *P. mirabilis* – 91,66 %. Було розроблене тверде поживне середовище, високочутливе та придатне для використання для одночасного виявлення лецитиназної активності та пригнічення роїння. Використання запропонованого середовища в мікробіологічній практиці дозволить підвищити якість досліджень.

У патогенезі гнійно-запальних процесів все більше значення надається позаклітинним ферментним системам бактерій, які суттєво пригнічують захисні сили макроорганізму та підвищують агресивність патогену. До таких ферментів належать фосфоліпази. Указані ферменти каталізують гідролітичне розщеплення фосфоліпідів, фосфоліпаза А діє безпосередньо на лецитин, у практиці мікробіології вона означена терміном лецитиназа.

На сьогодні чітко означено чотири види лецитиназ: А, В, С і D. Патогенні бактерії в більшості своїй продукують лецитиназу С, яка характеризується типовими властивостями бактеріальних токсинів, проявляє гемолітичну дію та антигенну активність. Розщеплюючи лецитин оболонки та мембран еукаріотних клітин на гліцерол, жирні кислоти, фосфорну кислоту та холін, цей фермент відіграє роль одного з провідних факторів патогенності клінічно значущих бактерій [1].

Відносно повно та всебічно вивчено роль лецитинази в патогенезі патологічних процесів, обумовлених грамположитивними мікробами (збудники газової анаеробної гангрени, стафілококи, коринебактерії та ін.) [2–5]. Значення ж цього ферменту в розвитку хвороб, обумовлених грамнегативними бактеріями, перш за все родів *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter* тощо висвітлена в науковій літературі вельми недостатньо.

За мету дослідження означено розробку простого, досить економічного та вельми доступного для практичного мікробіолога методу визначення продукції лецитинази грамнегативними бактеріями, здатними до роїння на щільному поживному середовищі (на прикладі бактерій роду *Proteus*).

Матеріали та методи досліджень. Диференційною ознакою протей є здатність до роїння (Н-форма). Роїння здійснюється за рахунок утворення клітин-швермерів довжиною 20–30 мкм вже через 3–4 години росту на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Клітинна стінка швермерів утворює єдину оболонку без перетинок, по всій довжині швермеру рівномірно розташовані одинарні або парні ядерні структури. Вже через годину культивування швермери трансформуються в звичайні клітини, серед яких знову каскадно утворюються подовжені структури так званого «роїння».

При деяких умовах, наприклад, підвищенні концентрації поживних речовин, культивуванні при $t=45^{\circ}\text{C}$, додаванні до живильного середовища поверхнево-активних речовин тощо протей може переходити з Н- до О-форми. При цьому він вже не здатен до роїння, на поверхні агару утворює ізольовані колонії з рівним краєм [6].

Відоме на теперішній час тверде поживне середовище для визначення лецитиназної активності мікроорганізмів – жовтково-сольовий агар (ЖСА) – селективне для протей, пригнічує їх ріст і тому не може бути використаним з метою означення їх лецитиназної активності. Отже, на першому етапі дослідження поставлено задачу створити нове живильне середовище для одночасного вияву лецитиназної активності та пригнічення роїння протей.

Для пригнічення феномену роїння протей дослідження проведено на двох сконструйованих щільних поживних середовищах; з метою порівняння лецитиназної активності протей у О- та Н-формах застосовано метод, оснований на просвітленні жовткової суміші (з наявністю лецитину) під дією фосфоліпази (лецитинази) центрифугатів бульйонних культур бактерій.

Використано поживне середовище із гідролізату еритроцитарної маси, скомпоноване науковцями ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20, до якого нами додано 20 % жовткової суміші (один жовток на 150 мл фізіологічного розчину кухонної солі) [7].

Експериментальне живильне середовище характеризується наступним складом: глюкоза – 4 %; пептон ферментативний – 7 %; агар мікробіологічний – 3,5 %; NaCl – 2,5 %; жовткова суміш – 20 % (рН 7,2). Основу автоклавують 20 хв при 1 атм., після досягнення $t=45^{\circ}\text{C}$ до неї додають вказані вище 20 % жовткової суміші та розливають в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Високі концентрації агару, пептону та цукру сприяють накопиченню поживних речовин в середовищі і перешкоджають прояву феномену роїння.

Перед посівом бактерій чашки підсушували у термостаті, залік результатів проводили впродовж 4 діб щоденно.

Для реалізації одного з етапів дослідження, оснований на просвітленні жовткової суміші, готову суміш розводили фізіологічним розчином до отримання оптичної щільності 1,6 (ФЕК, фільтр № 6, кювета 3 мм). До 5 мл розведеної жовткової суміші додавали па 1 мл. центрифугату