

4. Вакцина «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби володіє лікувальними властивостями хворих в продромальній РІД (+) і гематологічній стадії розвитку лейкозу.

5. Вакцина «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби може з успіхом застосовуватись для оздоровлення неблагополучних стад (ферм) від лейкозу ВРХ.

Список літератури

1. Завірюха, Г.А. Лікувальні властивості вакцини «Лейкозав» проти лейкозу великої рогатої худоби/ Завірюха Г.А., Дзюба С.М., Завірюха А.І. – Ветеринарна біотехнологія, 2004. – №4. – С. 72-77.
2. Завірюха Г.А. Формування імунітету у корів, щеплених вакциною Лейкозав, в умовах епізоотологічного експерименту та його вплив на оздоровлення від лейкозу/ Завірюха Г.А. – Ветеринарна медицина. – Харків, 2009. – Вип.92. – С. 203-207.
3. Завірюха, Г.А. Профілактична імунізація корів вакциною Лейкозав – основа оздоровлення та активної боротьби з лейкозом великої рогатої худоби/ Завірюха Г.А. – Ветеринарна біотехнологія, 2009. – № 14. – С. 103-111.
4. Завірюха, А.І. Новий ефективний спосіб оздоровлення великої рогатої худоби враженої вірусом лейкозу/ А.І.Завірюха, Г.А. Завірюха. – Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Львів, 2011. – Т. – 13. – №14. – Ч.1. – С. 141-147.
5. Завірюха, Г.А. Розробка методики стандартизації інактивованих вакцин проти лейкозу великої рогатої худоби/ Завірюха Г.А. – Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – Вип. 23. – Ч.2. – Т. – С. 169-171.
6. Інструкція з профілактики та оздоровлення великої рогатої худоби від лейкозу. – Наказ Державного комітету ветеринарної медицини України. - 21.12.2007. - №21. - від 11 січня 2008р. – № 12/147003.

PREVENTIVE AND ANTICANCER PROPERTIES OF THE VACCINE LEYKOZAV AGAINST THE BOVIN LEUKEMIA

Zaviryukha H.A.

State Centre of Innovation Biotechnologies, Kyiv

To protect the young animals and those who have not been affected yet by the bovine leukemia virus is offered a prophylactic active immunization of females of large cattle with an inactivated vaccine "Leykozav" to which in the body of vaccinated animals antiviral immunity is formed with specific antibody titers 1-4 Ig2, which protects them from spontaneous infection in conditions of unfavorable for leukemia treatment. Experiments were carried out in disadvantaged for leucosis herd with the quantity of infected livestock over 35%.

At the beginning of the experiment in the herd there were 13 infected cows in the hematologic stage of infection. After vaccination with the therapeutic dose of vaccine (4sm³ 4sm³) for seven cows (54.0%), numbers of leukocytes renewed to the physiological norm. The control group of 50 cows in the course of research by RID 12 animals were shown to be RID positive. Among them three cows were in the hematologic stage of infection. In other infected cows numbers of leukocytes were within normal limits.

The vaccine Leykozav against bovine leukemia has preventive and curative properties.

УДК 619:616.98:579.881.11:612.017

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ НАБОРОВ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ КУ

Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Гильмутдинов Р.Я.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

По распространенности в мире в группе зоонозных риккетсиозов лихорадка Ку занимает одно из первых мест [1-4]. В России лихорадка Ку встречается в Саратовской, Волгоградской, Новосибирской, Ярославской областях, а также Алтайском крае [10]. Лихорадка Ку – одна из опасных инфекционных болезней животных и людей, клиника которой характеризуется значительным полиморфизмом, что затрудняет диагностирование на основании клинического симптомокомплекса. В связи с вышеизложенным, а также учитывая бессимптомное течение болезни у сельскохозяйственных животных, важное значение приобретает постановка достоверного диагноза с использованием современных методов исследований. Применяемые в настоящее время средства и методы диагностики лихорадки Ку имеют определенные недостатки: низкую чувствительность и недостаточную специфичность (световая микроскопия), длительность получения результатов экспертиз и трудоемкость (биопроба).

Целью исследований явилась разработка и усовершенствование средств и методов диагностики лихорадки Ку на основе поли- и моноклональных антител с использованием иммуноферментного анализа и метода флуоресцирующих антител, а также комплексное проведение диагностических исследований в очагах этой инфекции.

Материалы и методы. В опытах применяли 2 штамма возбудителя лихорадки Ку: итало-греческий, референтный – «Грита», фазы I-II, полученный из НИИЭИМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН и эпизоотический – «Барабинский», выделенный из организма больной коровы профессором Р.Г. Госмановым и др. (1985), I фазы.

В работе использовали животных: овец (10), кроликов (30), морских свинок (50), крыс (30), белых мышей – беспородных (1000) и линии BALB/c (1000). В качестве исследуемого материала использовали паренхиматозные органы 2000 лабораторных животных, экспериментально зараженных возбудителем лихорадки Ку, а также 62 пробы сывороток крови крупного рогатого скота и 423 пробы сывороток крови овец, доставленных из неблагополучных по заболеваемости лихорадкой Ку районов РФ. Отрицательными контролями служили суспензии или мазки – отпечатки селезенки белых мышей, а также иммуноглобулин (Ig) сывороток крови интактных животных; положительными – те же органы, полученные от животных, зараженных возбудителем лихорадки Ку.

Иммунизацию кроликов проводили по Л.А. Зильберу (1979) с нашими модификациями [6]; для получения высокоактивных антирикетсиозных сывороток использовали штаммы «Барабинской» и «Грита» возбудителя лихорадки Ку (I и I-II фазы соответственно). Выделение иммуноглобулинов из сывороток крови овец и кроликов проводили по методике, описанной нами ранее [6]. Активность полученных Ig определяли в РДСК [8]. Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к возбудителю лихорадки Ку, использовали миеломные клетки Sp 2/0-Ag 4.1, и спленоциты белых мышей линии BALB/c, иммунизированных очищенным и концентрированным в градиенте сахарозы антигеном возбудителя лихорадки Ку, штамм «Барабинский» (эпизоотический, I фаза). Иммунизацию мышей проводили четырехкратно с интервалами в 30, 5 и 20 суток антигеном в смеси с полным адьювантом Фрейнда, в сочетании с внутрибрюшным и подкожным введением. Выделение лимфоцитов из селезенки мышей и последующее их слияние с миеломными клетками проводили по Л. Херценбергу (1980) в соотношении 5:1, тестирование гибридных клонов – непрямым методом ИФА с применением гомологичного антигена [5, 7].

Результаты исследований и обсуждение. Разработка иммунохимических препаратов и методов диагностики лихорадки Ку на основе поликлональных антител. Сравнительная оценка активности сывороток, полученных в результате иммунизации антигеном кокциелл Бернета различных видов животных – кроликов, морских свинок, овец, показала, что наиболее универсальным продуцентом риккетсиозных сывороток являются кролики. При этом титр комплементсвязывающих антител был максимальным

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунологічних препаратів

ным и составлял 1:320, что позволило использовать их в серологических реакциях (РДСК, МФА и ИФА) для титрования антител и обнаружения антигена возбудителя лихорадки Ку. Для определения антигена возбудителя лихорадки Ку в исследуемых образцах использовали сэндвич-вариант ИФА. Предварительно провели стандартизацию условий проведения различных вариантов ИФА для диагностики лихорадки Ку и титрования специфических к ней сывороток [6].

Разработанный прямой сэндвич – вариант ИФА позволяет обнаруживать антиген возбудителя лихорадки Ку в органах (селезенка, лимфатические узлы, печень) белых мышей, морских свинок и овец, экспериментально зараженных указанным возбудителем. При этом специфический антиген выявлен во всех исследованных органах, независимо от вида животного и штамма возбудителя, использованного при заражении. Так, показано достоверное обнаружение антигена возбудителя лихорадки Ку методом ИФА, начиная с 3-х суток после заражения в селезенке в титре 1:20 ($K_{\text{сн}} \geq 2,1$), а через 10 суток – в селезенке, печени, легких и лимфоузлах в титрах 1:40, 1:10, 1:40 и 1:20 соответственно. Максимальные титры антигена в органах больных морских свинок достигали на 40-е сутки после заражения и составили в селезенке – 1:640, в легких и печени – 1:160, а у овец – 1:160, 1:80 и 1:160 соответственно. Специфичность результатов подтверждена световой микроскопией и биопробой на белых мышах.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) в риккетсиологии не получил распространения. В медицинской литературе имеются единичные сообщения о применении для этих целей непрямого МФА [9].

На следующем этапе исследований изготавливали флуоресцирующий антирикетсиальный глобулин путем конъюгирования неконсервированной глобулиновой фракции антирикетсиальной сыворотки кроликов с ФИТЦ с последующим освобождением от избытка красителя путем диализа. Глобулиновую фракцию выделяли насыщенным раствором сульфата аммония из сывороток крови кроликов с титром в РДСК не менее 1:80-1:160. Показано, что антиген коксиилл Бернета обнаруживается у овец через 7 суток после заражения в мазках-отпечатках из лимфатических узлов, селезенки и печени. На 14-е сутки исследования, кроме перечисленных органов, антиген выявлялся в надпочечниках, и повысилась интенсивность свечения препаратов из печени. При исследовании с помощью МФА проб органов морских свинок положительные результаты получены в 100 % случаев.

В мазках-отпечатках из селезенки белых мышей положительные результаты получены в 96 случаях из 100 (штамм «Барабинский») и в 97 случаях из 100 (штамм «Грита»). Таким образом, полученные результаты показывают, что разработанный нами флуоресцирующий антирикетсиальный глобулин обеспечивает выявление антигена возбудителя лихорадки Ку в патологическом материале зараженных животных методом флуоресцирующих антител, независимо от штаммовой характеристики и рекомендуется для диагностики данного заболевания.

Основным лабораторным тестом для диагностики лихорадки Ку животных является реакция длительного связывания комплекса (РДСК).

Нами разработан не прямой метод ИФА для обнаружения специфического антигена и антител. Риккетсиальный антиген, штамм «Барабинский» или «Грита», очищенный и концентрированный дифференциальным центрифугированием, обработанный 0,1 М/л НСІ, применяли в качестве контрольного положительного антигена [9].

Результаты исследований 138 сывороток крови иммунизированных и зараженных животных показали, что титр в ИФА варьировал в пределах от 1:800 до 1:204800 ($K_{\text{сн}} = 2,1$ и более). Контрольные сыворотки крови от интактных животных давали отрицательные результаты.

Анализ данных по обнаружению антител к коксииллам Бернета свидетельствуют, что из 138 положительных по ИФА сывороток РДСК выявлено 137 положительных проб. При этом чувствительность ИФА в 80...800 раз и более превышает таковую РДСК.

Установлена возможность обнаружения риккетсиальных антигенов в патматериале непрямым ИФА с применением антирикетсиозных глобулинов и использования этого метода для контроля активности Ку-рикетсиозных вакцин М-44 производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

С использованием диагностических наборов, разработанных в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», проведены лабораторные исследования сывороток крови и патологического материала, взятых от животных в период карантинирования и их перегруппировке, а также из неблагополучных по лихорадке Ку хозяйств РФ, в том числе Саратовской, Волгоградской, Новосибирской, Ярославской областей, а также Алтайского края и даны соответствующие рекомендации по купированию неблагополучных очагов [5].

Разработка диагностических препаратов с использованием моноклональных антител. Для получения гибридом, продуцирующих МКА к возбудителю лихорадки Ку, использовали миеломные клетки Sp2/0 Ag 4.1 и спленоциты белых мышей линии BALB/c, иммунизированных очищенным и концентрированным в градиенте плотности сахарозы возбудителем лихорадки Ку, штамм «Барабинский» (1 фазы) [7, 9]. Активность сывороток крови мышей, полученных по оптимальной схеме, составила в РДСК 1:80, в ИФА – 1:3200 соответственно. Установлена специфичность и активность пероксидазных конъюгатов (КГ), полученных на основе моноклональных антител (МКА), в прямом иммуноферментном анализе (ИФА). Показана фазовая специфичность полученных МКА при постановке диагноза на лихорадку Ку. Так, антирикетсиальные пероксидазные конъюгаты, изготовленные на основе МКА к возбудителю лихорадки Ку, штамм «Барабинский» (I фаза), выявляли гомологичный антиген I фазы в одинаково высоких титрах (1:1024), также как и конъюгат, изготовленный на основе поликлональных антител (ПКА). В то же время риккетсиальный антиген II-ой фазы выявлялся КГ сер. 2 в высоких титрах – 1:5120, а КГ сер. С₇ в низких – 1:2, или не выявлялся вообще КГ сер. А₇, что свидетельствует о фазовой специфичности конъюгатов, изготовленных на основе МКА. Установленная фазовая специфичность МКА к возбудителю лихорадки Ку, штамм «Барабинский» (I фаза), позволяет проводить дифференциальную диагностику данного заболевания.

Выводы. 1. Разработаны средства и методы диагностики лихорадки Ку на основе поли- и моноклональных антител, обеспечивающие достоверное обнаружение и идентификацию возбудителя болезни в патологическом материале, а также выявление специфических антител в сыворотках крови вакцинированных животных.

2. Установлено, что сэндвич-вариант ИФА и МФА позволяют обнаруживать антиген возбудителя лихорадки Ку в паренхиматозных органах, экспериментально зараженных животных не зависимо от штаммовой принадлежности в 100 % случаев за 3-7 ч. и в 95-100 % случаев за 2-3 ч. соответственно.

3. Впервые получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к возбудителю лихорадки Ку, штамм «Барабинский» (I фаза), и показана возможность применения МКА в не прямых вариантах МФА и ИФА. Установлена фазовая специфичность

иммуноферментных конъюгатов, изготовленных на основе МКА, что открывает перспективу для дифференциальной диагностики данного заболевания.

4. Созданные для практического применения Наборы препаратов для диагностики лихорадки Ку способствуют успешному проведению противоэпизоотических мероприятий и ликвидации этого зооноза.

Список литературы

1. Вербицкий, П.П. Довідник лікаря ветеринарної медицини / П.П.Вербицкий, П.П.Достоевський // – К.: «Урожай», 2004. – П.І. – 1280 с. 2. Гавриш, В.Г. Справочник ветеринарного врача / В.Г.Гавриш // 4 изд. Ростов-на-Дону: "Феникс", 2003. – 576 с. 3. Дайтер, А.Б. Эпидемиология лихорадки Ку / А.Б.Дайтер, И.В.Тарасевич // Тр. института им. Пастера. Риккетсиозы. – Л. – 1989. – С.5-36. 4. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф.Бессарабов, Е.С.Воронин // Под ред. А. А. Сидорчука. — М.: Колос С, – 2007. – 671с. 5. Хисматуллина, Н.А. Комплексная диагностика лихорадки Ку в эпизоотическом очаге / Н.А.Хисматуллина, Р.Х.Юсупов, И.А.Курбанова // Тез. докл. межд. коорд. совещания. – Воронеж. – 1997. – С.366-367. 6. Хисматуллина, Н.А. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга и мер борьбы при бешенстве и лихорадке Ку животных / Н.А. Хисматуллина: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Казань, 2000. – 45 с. 7. Хисматуллина, Н.А. ТУ-9394-009-000080-96 к "Набору компонентов на основе моноклональных антител для лабораторной диагностики лихорадки Ку методом иммуноферментного анализа (ИФА)" / Н.А. Хисматуллина, И.А. Курбанова, Р.Я. Гильмутдинов и соавт. // утв. ДВ МСХиП РФ 18.03.96 г. 8. Юсупов, Р.Х. Методические указания по лабораторной диагностике лихорадки Ку животных / Р.Х.Юсупов, Н.А.Хисматуллина, Р.Г.Госманов, Р.Р.Юсупов, И.А. Курбанова // № В.-6-2/600, утв. ДВ МСХиП РФ 13.05.96 г. 9. Яблонская, В.А. Выявление *Coxiella burnetii* в смывах шерсти естественно инфекционных коз с помощью иммунофлуоресцентного анализа / Риккетсиозы / В.А. Яблонская, Р.Г. Дюйсалиева, И.В. Тарасевич // – Л. – 1989. – С. 137-139. 10. Tokarevich, N.K. Q fever in Russia. In: Contemporary state of the rickettsioses in the world and in Bulgaria. / N.K.Tokarevich, Ed. E. Alexandrov, J.Kazar, K. Hechemy, T.Kantardjiev // Sofia, 2007. P. 268-279.

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF Q-FEVER DIAGNOSTIC KIT

Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Yusupov R.H., Gilmudinov R.Ya.

Federal State Non-Profit Organization « Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety » («FCTRBS - ARRVI»), Kazan

The aim of presentation is to provide an optimal scheme to produce poly-and monoclonal antibodies against Q fever causative agent and their implementation to produce immune fluorescent and immune peroxide preparation kits. The diagnostic kit is shown to provide reliable detection and identification of causative agent in pathological material and specific antibodies detection in sera from various animal species in laboratories and infected areas in Russian Federation.

УДК 619:579.861.2:636.7:616-076

ВИВЧЕННЯ ПРОТЕКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СТАФІЛОКОКОВИХ АНАТОКСИНІВ В ДОСЛІДАХ НА БІЛИХ МИШАХ

Келеберда М.І., Обуховський Ю.М., Обуховська О.В.

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

Стафілокози дрібних домашніх тварин є досить розповсюдженими захворюваннями на сьогоднішній день [1, 3, 9, 10]. Найчастіше практичні ветеринарні лікарі реєструють стафілококові піддермії або запалення слизових оболонок респіраторного та сечо-статевого трактів [2, 4, 7, 11]. Застосування тільки антибактеріальних препаратів для лікування цих патологій не завжди призводить до бажаного результату. Причиною цього є той факт, що лікарі зазвичай не враховують стан імунної системи, хоча загально відомо, що бактеріальні піддермії виникають на фоні імунодефіцитного стану [5, 8, 12]. Найбільш ефективними визнані терапевтичні схеми, які включають застосування імунізуючих препаратів, виготовлених з культур грампозитивних коків, зокрема стафілококових анатоксинів [6, 10, 11]. Однак, подібних препаратів вітчизняного виробництва на сьогоднішній день не існує.

Метою наших досліджень було вивчення протективних властивостей стафілококових анатоксинів, виготовлених з музейних культур найбільш розповсюджених збудників стафілококозів дрібних домашніх тварин.

Матеріали та методи. Моно- та полівалентні стафілококові анатоксини виготовляли за оригінальною авторською методикою з 3-ох музейних культур *Staphylococcus aureus* I, *Staphylococcus epidermidis* S та *Staphylococcus intermedius* C.

Протективні властивості вивчали в серії дослідів на білих мишах. Для чого формували групи по 20 голів дорослих білих мишей вагою 20 гр за принципом аналогів. Тваринам дослідних груп вводили анатоксини підшкірно, в об'ємі 0,3 см³, двічі, через 7 діб. Контрольні групи залишалися інтактними.

Через 14 діб тварин дослідних і контрольних груп заражали відповідними культурами стафілококів підшкірно в об'ємі 0,3 см³ (див. табл.).

Таблиця – Схема контрольного зараження білих мишей

№ дослідної групи	Препарат, що був застосований для імунізації	Культура або суміш культур, що були застосовані для контрольного зараження	Доза
1.	Анатоксин моновалентний (<i>Staphylococcus aureus</i> I)	<i>Staphylococcus aureus</i> I	1 млрд. КУО
2.	Анатоксин бівалентний (<i>Staphylococcus aureus</i> I та <i>Staphylococcus epidermidis</i> C)	<i>Staphylococcus aureus</i> I та <i>Staphylococcus epidermidis</i> S	По 0,5 млрд. КУО кожної культури
3.	Анатоксин полівалентний (<i>Staphylococcus aureus</i> I, <i>Staphylococcus epidermidis</i> S та <i>Staphylococcus intermedius</i> C)	<i>Staphylococcus aureus</i> I, <i>Staphylococcus epidermidis</i> S та <i>Staphylococcus intermedius</i> C)	По 0,3 млрд. КУО кожної культури

За тваринами спостерігали упродовж 10 діб, при цьому враховували кількість хворих та загиблих особин, наявність певних клінічних та патологоанатомічних ознак.

Від загиблих та клінічно хворих тварин відбирали патологічний матеріал (серце, печінку, селезінку, трубчасту кістку) для проведення бактеріологічних досліджень за стандартною методикою.

Результати досліджень. У процесі проведення експериментальних досліджень за оригінальною методикою авторів було виготовлено 3 експериментальні серії стафілококових анатоксинів.

Перша – анатоксин моновалентний з культури *Staphylococcus aureus* I.