

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

УХОВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК 636.09:[616.98+579.834]:636.2(477)

**ЛЕПТОСПИРОЗ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УКРАЇНІ
(ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ, ДІАГНОСТИКА
ТА СПЕЦИФІЧНА ПРОФІЛАКТИКА)**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України

Науковий консультант

доктор ветеринарних наук, доцент
Недосєков Віталій Володимирович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри епізоотології
та організації ветеринарної справи

Офіційні опоненти:

доктор ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН
Завгородній Андрій Іванович,
Національний науковий центр
«Інститут експериментальної
та клінічної ветеринарної медицини»,
завідувач відділу з вивчення туберкульозу
та бруцельозу

доктор ветеринарних наук, професор
Кассіч Володимир Юрійович,
Сумський національний аграрний університет,
завідувач кафедри епізоотології та паразитології

доктор ветеринарних наук, професор
Корнієнко Леонід Євгенович,
Білоцерківський національний
аграрний університет,
завідувач кафедри епізоотології
та інфекційних хвороб

Захист відбудеться «19» травня 2016 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий «14» квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У глобальному масштабі проблеми зоонозів, за критеріями соціально-економічного рейтингу, лептоспіроз належить до п'яти хвороб, які становлять найбільшу небезпеку для людства (Бобылева А. А. и др., 2000; Ciceroni L. et al., 2000; Felzemburgh R. D. et al., 2014). Щорічно спостерігається щонайменше 0,5 млн клінічних випадків захворювання людей на лептоспіроз, а рівень смертності коливається у межах 5–15 % (Росада М. О., 2003; Naake D. A., Levett P. N., 2015).

Пандемічне поширення лептоспірозу у світі зумовлює значний інтерес до цього природньо-осередкового захворювання. Численні випадки лептоспірозу людей, домашніх тварин і представників дикої фауни зареєстровано у багатьох країнах, у тому числі і високорозвинених (США, Великобританія, Нідерланди, Німеччина та ін.), практично в усіх заселених людиною континентах (Ratnam S., 1994; Simpson F. G. et al., 1998; Holk K. et al., 2000; Бусол В. та ін., 2002; Meites E. et al., 2004; Steneroden K. K. et al. 2011).

Лептоспіроз великої рогатої худоби значно поширений в багатьох країнах світу і в Україні зокрема (Кучерявенко О. О. та ін., 2004; Галатюк О. Є., Романюк Ж. В., 2005; Salgado M. et al., 2015; Nagalingam M. et al., 2015; Monte L. G. et al., 2015).

У великої рогатої худоби захворювання може протікати в гострій формі, призводячи до загибелі. У частини тварин хвороба зумовлює аборти, у інших – перебігає в інпаратній формі і діагностується тільки на основі позитивних результатів серологічних досліджень. Крім того, тварини які хворіють безсимптомно, тривалий час залишаються лептоспіроносіями і поширюють хворобу як серед сприйнятливих тварин, так і серед людей (Малахов Ю. А. и др., 2000; Романюк Ж. В., 2006).

Нині кількість серологічних груп і сероварів лептоспір збільшується у зв'язку з ідентифікацією нових ізолятів, виділених від тварин, людей та з навколишнього середовища. Реєструються випадки захворювання тварин лептоспірозом, спричинені екзотичними патогенними штамми лептоспір, які набувають форми епізоотії (Піотрович В. А. та ін., 2005).

Одним із експресних та чутливих методів діагностики є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка зарекомендувала себе як сучасний метод діагностики, що дозволяє виявляти лептоспіри в органах, тканинах, сечі в перші дні після інфікування, а також здійснювати контроль санації нирок після антибіотикотерапії (Vomfim M. R. et al., 2005; Земская М. С., Самсонова А. П., 2007; Pinne M., Naake D. A., 2013).

Незважаючи на значну кількість вакцин проти лептоспірозу великої рогатої худоби і декларованої виробниками їх ефективності, актуальним є розроблення сучасних імпортозамінних технологій виготовлення більш ефективних, безпечних, дешевих і зручних у застосуванні вітчизняних препаратів проти лептоспірозу даного виду тварин на основі дослідження особливостей етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні.

Зазначені факти зумовлюють теоретичну і практичну необхідність розроблення системи епізоотологічного моніторингу лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні, створення нових і вдосконалення існуючих засобів діагностики та розроблення системи специфічної профілактики захворювання, що слугуватиме підґрунтям для подальшого ефективного розвитку галузі тваринництва та збереження здоров'я людей.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась згідно із завданнями державних тематик науково-дослідних робіт лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН: «Вивчити біоценотичні зв'язки патогенних лептоспир в навколишньому середовищі, особливості перебігу лептоспірозу в сучасних умовах ведення тваринництва та розробити інтегральну систему захисту тварин від лептоспірозу» (номер державної реєстрації 0106U000385, 2006–2010 рр.); «Вивчити закономірності виникнення та розвитку природно-вогнищевих осередків лептоспірозу та розробити концепцію їх санації» (номер державної реєстрації 0111U000469, 2011–2015 рр.).

Мета і задачі дослідження. Мета дослідження – провести епізоотологічний моніторинг лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні (вивчити поширення і етіологічну структуру захворювання), теоретично обґрунтувати та вдосконалити систему заходів діагностики лептоспірозу та його специфічної профілактики.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі задачі:

- провести епізоотологічний моніторинг щодо лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні за 2005–2014 роки;
- провести ПС-аналіз циркуляції основних діагностичних серогруп лептоспир серед поголів'я великої рогатої худоби на території України;
- встановити етіологічну структуру лептоспірозу великої рогатої худоби;
- дослідити патогістологічні зміни за лептоспірозу великої рогатої худоби;
- розробити й випробувати молекулярно-генетичні тест-системи для виявлення ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень і методом ПЛР у режимі реального часу;
- розробити технологію виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби;
- підібрати серовари лептоспир для виготовлення полівалентної вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби;
- провести доклінічні та клінічні випробування полівалентної вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби;
- впровадити створену вакцину в умови виробництва;
- розробити заходи діагностики, профілактики та оздоровлення тварин від лептоспірозу.

Об'єкт дослідження – лептоспіроз великої рогатої худоби, епізоотологічний моніторинг, засоби діагностики і профілактики.

Предмет дослідження – особливості епізоотичного процесу, серотипізація, етіологічна структура, патогістологічні зміни, морфологічні показники крові, праймери та ПЛР-тест-системи, їх валідація, розроблення

вакцин проти лептоспірозу, удосконалення системи діагностики лептоспірозу великої рогатої худоби.

Методи дослідження – епізоотологічні (епізоотологічне обстеження господарств та спостереження за ними, порівняльно-географічний опис епізоотичного процесу, ГІС-аналіз); клінічні (клінічний стан тварин); серологічні (дослідження сироваток крові в реакції мікроаглютинації); гематологічні; гістологічні; молекулярно-генетичні (ПЛР); імунологічні (визначення імуногенності вакцини); статистичні (обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше вивчено сучасну епізоотичну ситуацію щодо захворювання великої рогатої худоби на лептоспіроз в Україні та з'ясовано етіологічну структуру захворювання тварин цього виду. Вперше складено «Карти-схеми позитивних випадків захворювання великої рогатої худоби на лептоспіроз» та «Карти щільності випадків захворюваності великої рогатої худоби на лептоспіроз» до восьми серогруп лептоспір за останні десять років (2005–2014), що дозволило визначати зони ризику зараження великої рогатої худоби лептоспірами основних діагностичних серогруп.

Розроблено специфічні праймерні системи, які стали підґрунтям для розроблення специфічних праймерів і створення вітчизняних протоколів детекції патогенних лептоспір у біологічному матеріалі. За проведеними біоінформативними розрахунками запропоновано метод одночасної індикації та видової диференціації патогенних лептоспір за допомогою ПЛР.

Уперше в Україні розроблено дві ПЛР-тест-системи: тест-система для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та тест-система для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР у режимі реального часу (*патенти України на корисну модель № 94104 і № 101190*).

Розроблено вітчизняну інактивовану вакцину проти лептоспірозу великої рогатої худоби з урахуванням актуальної етіологічної структури захворювання (*патент України на корисну модель № 73324*).

Вперше обґрунтовано доцільність використання штаму *Leptospira interrogans Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo* для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин (*патент України на корисну модель № 93374*).

Вивчено вплив інактивованої вакцини проти лептоспірозу на показники еритроцитопоезу (кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну, середній об'єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті, гематокритна величина) і лейкоцитопоезу (загальна кількість лейкоцитів і відсоткове співвідношення їхніх окремих форм (лімфоцити, моноцити, нейтрофіли, еозинофіли, базофіли)) периферійної крові кролів.

Вперше проведено широкомасштабне випробування створеної вакцини на території України.

Практичне значення одержаних результатів. На основі результатів наукових досліджень визначено рівень розповсюдження лептоспірозої інфекції серед поголів'я великої рогатої худоби у різних областях України, а також співвідношення різних патогенних лептоспір виду *Leptospira interrogans* у

етіологічній структурі лептоспірозу тварин цього виду. Результати досліджень використано під час підготовки та написання наукової брошури «Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти лептоспірозу в Україні» (*затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25.12.2014 р.*).

Опубліковано навчальний посібник «Лептоспіроз сільськогосподарських тварин» до лекційного курсу з дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби» (*рекомендовано вченою радою ННІ ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції тваринництва, протокол № 1 від 27 жовтня 2011 р.*). Навчальний посібник призначено для науковців, а також викладачів і студентів аграрних закладів освіти II–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина» та фахівців ветеринарної медицини.

Описано цілий ряд мікроморфологічних ознак патологічних змін в органах корів за лептоспірозу і у абортів плодів корів, хворих на лептоспіроз, виявлено набір критеріїв, які можуть бути використані для обґрунтування діагнозу на це захворювання.

У роботі фахівців ветеринарної медицини використовуються «Методичні рекомендації щодо індикації ДНК патогенних лептоспір за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» (*затверджено Державною ветеринарною та фітосанітарною службою, 2014 р.*) та «Застосування полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспір. Методичні рекомендації» (*затверджено Інститутом ветеринарної медицини НААН, 2015 р.*).

Результати наукових досліджень використано під час розроблення нормативної документації «Вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *bovis*)». На вакцину отримано реєстраційне посвідчення № ВВ-00661-02-13, видане Державною ветеринарною та фітосанітарною службою України 18 грудня 2013 року.

Вивчено ефективність застосування вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*) і визначено оптимальну імунізуючу дозу цього препарату.

Основні положення дисертаційної роботи було використано під час розробки проекту «Інструкції щодо діагностики, профілактики та оздоровлення від лептоспірозу», котрий було схвалено і взято за основу на засіданні Науково-методичної ради Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України 15 квітня 2015 р.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно провів патентний пошук, огляд літератури з обраної теми; розробив програму й етапи наукових досліджень; сформулював мету і завдання експериментальних та науково-виробничих досліджень; провів епізоотологічні дослідження лептоспірозу великої рогатої худоби, низку лабораторних дослідів із вивчення цілого ряду показників створеної вакцини (кількісні та якісні показники, імуногенні властивості, підбір оптимальної імунізуючої дози). Самостійно проаналізував й узагальнив отримані наукові результати, написав наукові праці.

Мікробіологічні та серологічні дослідження проведено у лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН. Гістологічні дослідження проводилися на кафедрі патологічної анатомії факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБіП України) разом із завідувачем цієї кафедри доктором ветеринарних наук Б. В. Борисевичем. Розроблення тест-системи для індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР з електрофоретичною детекцією проводилося у творчій співпраці із заступником директора з наукової роботи Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН (ННЦ «ІЕКВМ»), доктором ветеринарних наук А. П. Геріловичем. Розроблення тест-системи для індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу здійснено у бактеріологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН. Морфологічне дослідження крові проводилось у творчій співпраці із кандидатом ветеринарних наук А. В. Розумнюком.

Глибоку вдячність за науково-консультативну допомогу у ряді експериментів досліджень здобувач висловлює кандидату ветеринарних наук О. О. Кучерявенку, завідувачу лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН.

Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися й обговорювалися на: засіданнях Вченої ради ІВМ НААН упродовж 2009–2015 рр.; I-й Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Біотехнологія: розробка та контроль препаратів – 2009» (м. Київ, 2009 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 50-річчю заснування Інституту епізоотології УААН «Епізоотологічний моніторинг та системи ліквідації хвороб тварин» (м. Рівне, 2010 р.); конференції молодих вчених «Наукове забезпечення розвитку агропромислового комплексу центрального і північного регіонів України» (м. Київ, 2011 р.); IX Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2011 р.); Міжнародній конференції «14th International Conference Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine» (м. Йоганесбург, ПАР, 2013 р.); Всеукраїнському семінарі «Діагностика, профілактика та оздоровлення с.-г. тварин від лептоспірозу» (м. Лазурне, 2013 р.); Міжнародній конференції «62nd American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting» (м. Вашингтон, США, 2013 р.); Міжнародній науково-дослідній конференції «American Society of Microbiology Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting» (м. Вашингтон, США, 2014 р.); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології» (м. Київ, 2014 р.); Міжнародній конференції «International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance» (м. Відень, Австрія, 2014 р.); науковій конференції молодих вчених «Молодь в науці XXI століття», присвяченій 20-річчю набуття університетом статусу Національного (м. Київ, 2014 р.); щорічній науково-практичній

конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2015 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 38 наукових праць, у тому числі наукова брошура, 12 статей у наукових фахових виданнях України, 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 4 статті у наукових виданнях інших держав, стаття в іншому науковому виданні, навчальний посібник, 4 патенти на корисну модель, 3 методичні рекомендації та 7 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 425 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 47 таблицями, 109 рисунками і складається з умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків і пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел включає 640 найменувань, у тому числі 303 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Робота виконувалася упродовж 2009–2015 рр. у лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН. Гістологічні дослідження проводилися на кафедрі патологічної анатомії факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України. Розроблення тест-системи для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів проводилося на базі лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН. Розроблення тест-системи для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР у режимі реального часу проводилося у бактеріологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН. Виробничі та міжвідомчі випробування вакцини проводили у господарствах Полтавської і Хмельницької областей.

Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали за допомогою програми *Microsoft Office Excel*, 2007. Ступінь вірогідності оцінювали за критерієм Стьюдента (Плохинский М. О., 1978).

Схему досліджень представлено на рис. 1.

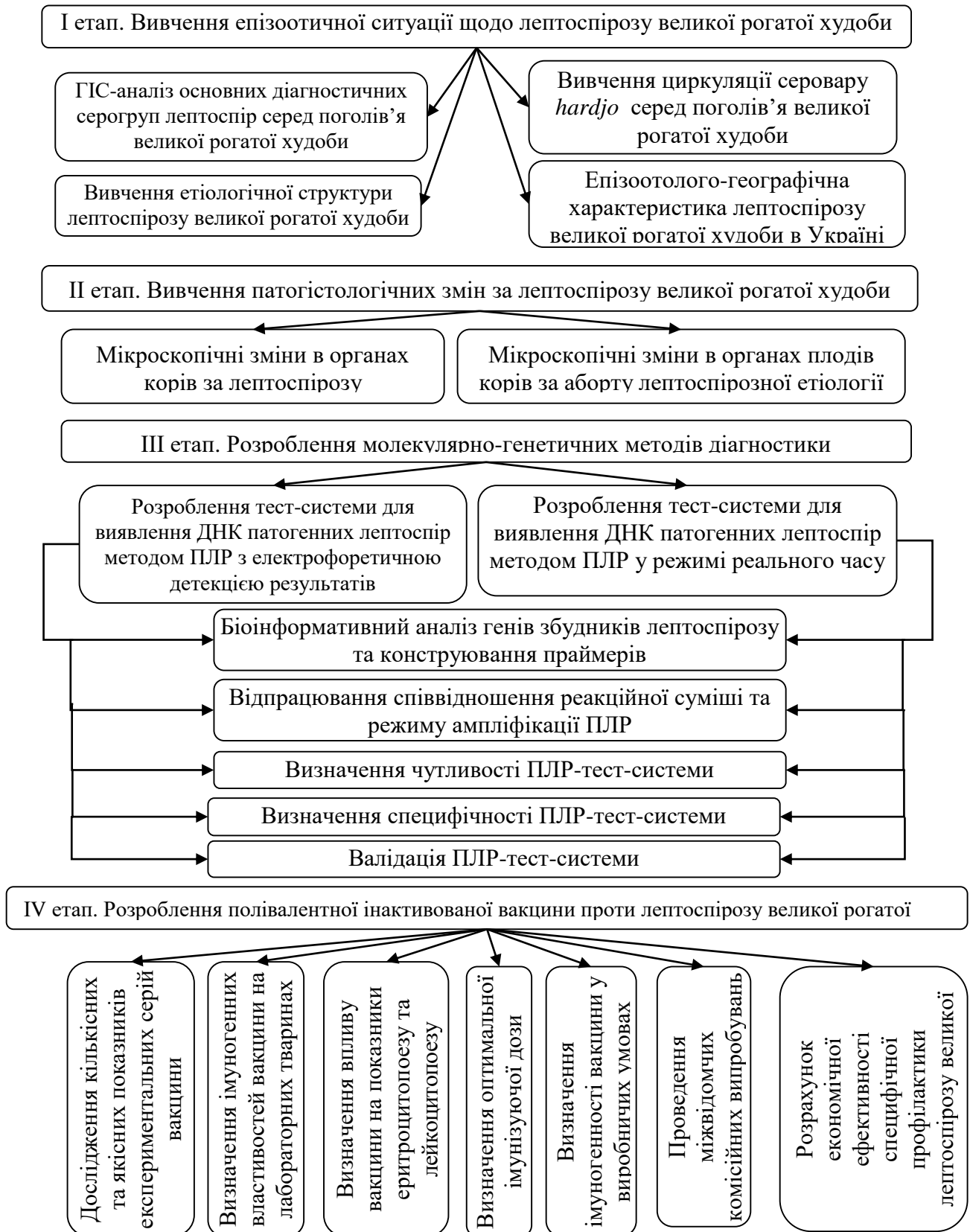


Рис. 1. Загальна схема проведених наукових досліджень

На першому етапі досліджень проводили епізоотологічний моніторинг щодо лептоспірозу великої рогатої худоби, визначали особливості його

поширення (прояву) та територіальної приуроченості спалахів, проведено картографічний та статистичний аналіз:

- епізоотичного стану з лептоспірозу великої рогатої худоби в господарствах України (досліджено 1706 проб сироваток крові тварин із 14 областей України);

- результатів лабораторних досліджень регіональних лабораторій ветеринарної медицини (за період виконання дисертаційної роботи було піддано аналізу результати досліджень 2100196 проб сироваток крові великої рогатої худоби).

З метою вивчення циркуляції *L. interrogans*, серовару *hardjo* (серогрупа *Sejroe*) серед поголів'я великої рогатої худоби на території України досліджено в реакції мікроаглютинації (РМА) проби сироваток крові від 111 тварин із 6 областей України.

Другий етап досліджень полягав у дослідженні патогістологічних змін за лептоспірозу великої рогатої худоби. Було вивчено мікроскопічні зміни в нирках, легенях, печінці та головному мозку корів, що перехворіли або загинули від лептоспірозу. Також було вивчено мікроскопічні зміни в нирках, печінці, легенях, серці та головному мозку абортіваних плодів корів, хворих на лептоспіроз.

Для гістологічного дослідження відбирали фрагменти вказаних органів та фіксували матеріал в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в розчинах етанолу зростаючої концентрації та через хлороформ заливали в парафін. Зрізи товщиною 7–9 мкм одержували на санному мікротомі і зафарбовували їх гематоксиліном Караці та еозином. Препарати вивчали за допомогою біокулярного світлового мікроскопа (*Micros 100 LED*) зі збільшенням $\times 200$, а фотографування виконували цифровою фотокамерою фірми *Canon EOS 550 D*.

Метою третього етапу експериментів було розроблення молекулярно-генетичних методів діагностики лептоспірозу.

Під час розроблення тест-системи виявлення ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів було проведено біоінформативний аналіз генів збудників лептоспірозу. З метою аналізу нуклеотидних послідовностей з баз даних *GenBank* в режимі *on-line* було зібрано опубліковані ділянки геному патогенних лептоспір, котрий кодує синтез ліпопротеїну *Lip L 32* – основного білка зовнішньої мембрани патогенних лептоспір.

Ампліфікацію проводили в поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,5 см³ на ампліфікаторі «*TProfessional TRIO*» (*Biometra*, Німеччина).

Екстракцію ДНК проводили сорбентним методом. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору «*PCR-Core*» (*IsoGene*, Російська Федерація).

Склад реакційної суміші та температурні параметри ампліфікації визначали з використанням ДНК референтного патогенного штаму лептоспір *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*) як контрольного зразку.

Вивчення чутливості та специфічності методики проводили відповідно до протоколів валідації ПЛР-методик, запропонованих МЕБ, з використанням ДНК-екстрактів восьми патогенних референтних штамів лептоспир (*493 Poland*, *Kabura*, *Perepelicyuni*, *Pomona*, *Moskva V*, *Hond Utrecht IV*, *M 20*, *Jez-bratislava*) та одного сапрофітного штаму (*Patoc 1*), референтними штамми мікоплазм (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma agalactia*) та хламідій (*Chlamidia psittaci*). Порівняльні випробування проводили з тест-системою для виявлення ДНК патогенних лептоспир виробництва *IsogeneLab. ltd.* – «Набор реагентів для ампліфікації ДНК *Leptospira spp. (pathogenic serovars)*».

Електрофоретичний аналіз здійснювали з використанням 2,0 % агарозного гелю, напруги 10 В/см, сили струму 25–100 мА впродовж 30 хв в електрофоретичній камері (*BioRad*, США).

Під час розроблення тест-системи для виявлення ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу ампліфікацію продуктів ПЛР проводили за допомогою приладу ампліфікації ДНК у реальному часі *Rotor-Gene 6000Q (QIAGEN Hilden, Німеччина)*.

Екстракцію ДНК проводили сорбентним методом з використанням комплекту реагентів для виділення ДНК «ДНК-сорб-В» (ФГУ «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Російська Федерація).

Склад реакційної суміші та температурні параметри ампліфікації визначали з використанням ДНК 7 референтних штамів патогенних лептоспир: *493 Poland*, *Kabura*, *Perepelicyuni*, *Pomona*, *Moskva V*, *Hond Utrecht IV*, *M 20*.

Вивчення чутливості методики проводили з використанням ДНК-екстракту референтного патогенного штаму лептоспир *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*).

Специфічність методики перевірено на наступних штаммах мікроорганізмів: сапрофітний вид *Leptospira biflexa*, штам *Patoc 1* (серогрупа *Semaranga*); *Chlamydophila psittaci*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Brucella abortus*; *Actinobacillus lignieresii*; *Salmonella cholerae suis*; *Salmonella dublin*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus zooepidemicus*; *Pasteurella multocida*; *Fusobacterium necrophorum*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium septicum*.

Всього під час проведення дослідів було використано 19 штамів патогенних лептоспир.

Валідацію методики ПЛР у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспир проводили відповідно до стандартів у бактеріологічному секторі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН, з рівнем біобезпеки *BSL 2* і акредитацією за міжнародним стандартом *ISO-17025*.

Четвертий етап досліджень було присвячено розробленню полівалентної інактивованої вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби.

Під час проведення досліджень використовували діагностичні та вакцинні штамми лептоспир: *493 Poland*, *Kabura*, *Perepelicyuni*, *Pomona*, *Moskva V*, *Hond Utrecht IV*, *M 20*, *Jez-bratislava*, *Hardjoprajtno*, ВГНКИ-1, ВГНКИ-2, ВГНКИ-4.

Розроблення технології виробництва вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*) включало: визначення лептоспир найпоширеніших

серогруп, які спричинюють захворювання великої рогатої худоби; визначення якості створеного препарату за показниками: концентрації водневих іонів (величина pH), стерильності, повноти інактивації, нешкідливості, залишкової кількості інактиватора; визначення впливу вакцини на показники еритроцитопоезу, лейкоцитопоезу в організмі лабораторних тварин; визначення оптимальної імунізуючої дози; визначення імуногенності препарату в лабораторних і виробничих умовах.

Концентрацію водневих іонів (величина pH) препарату визначали pH -метром марки ЕВ-74.

Стерильність створених серій вакцин визначали за ДСТУ 4483:2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації бактеріальною та грибковою мікрофлорою».

Для визначення повноти інактивації вакцини проводили три послідовних пасажі її на середовищі Кортгофа з додаванням 10 % сироватки крові кроля. Культивування проводили за температури 27–28 °С впродовж 10–14 діб. В цьому разі використовували по три пробірки на кожний пасаж для проб із кожного флакону, взятого для контролю. Наявність живих лептоспир у полі зору мікроскопу визначали під час мікроскопії в темному полі (збільшення $20 \times 10 \times 1,5$).

Нешкідливість експериментальних серій вакцин визначали на білих мишах масою 18–20 г, по 10 мишей на перевірку кожної серії. Щеплення здійснювали підшкірно, в дозі 0,3 см³. Місце введення обробляли 70 % етиловим спиртом. Спостерігали за піддослідними тваринами протягом 10 діб для визначення їх загального стану.

Визначення залишкової кількості інактиватора (фенолу) проводили згідно з МУК 4. 1/ 4. 2. 588 – 96.

Імуногенні властивості вакцини в лабораторних умовах визначали на кролях масою тіла 3,0–3,5 кг, в кількості по п'ять тварин на перевірку кожної серії вакцини. Вакцину вводили внутрішньом'язово об'ємом 0,75 см³ кожній тварині. Через 25 діб у вакцинованих кролів відбирали проби крові, отримували сироватку та досліджували в РМА зі штамми лептоспир відповідних сероварів, що входили до складу випробовуваних серій вакцин.

Вплив вакцини на показники еритроцитопоезу та лейкоцитопоезу вивчали на 14 кролях, масою тіла 3,0–3,5 кг, підібраних за принципом аналогів, розділених на дві групи: 9 кролів – дослідна група, 5 кролів – контрольна група. Тварин дослідної групи імунізували інактивованою вакциною проти лептоспірозу великої рогатої худоби. Вакцину вводили внутрішньом'язово в дозі 0,75 см³, на одну тварину. Тваринам контрольної групи вакцину не вводили.

Кров для досліджень відбирали з крайової вушної вени кролів до введення вакцини і на 7, 14, 21 та 28 добу після вакцинації. В дослідях визначали показники еритроцитопоезу (кількість еритроцитів (Т/л), концентрацію гемоглобіну (г/л), гематокритну величину (л/л), середній об'єм еритроциту (фл; розрахунково), середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті (фмоль; розрахунково)) і лейкоцитопоезу (загальна кількість лейкоцитів і відсоткове співвідношення окремих їхніх форм (лімфоцити, моноцити, нейтрофіли,

еозинофіли, базофіли)) периферійної крові кролів. Вказані показники визначали за допомогою гематологічного аналізатора (МУТНІС 22, Швейцарія).

З метою визначення оптимальної імунізуючої дози створеної інактивованої полівалентної вакцини проти лептоспірозу тварин було проведено досліді на векторних тваринах (великій рогатій худобі). Для цього дослідних телят віком до одного року щеплювали вакциною у дозі 1 см³, 3 і 5 см³, а велику рогату худобу старше одного року (віком 16–20 місяців) – 3 см³, 5 і 7 см³. Як контроль використовували полівалентну вакцину ВДНКІ проти лептоспірозу тварин, другий варіант. Оптимальну дозу вакцини визначали за показниками титру антитіл у сироватці крові тварин.

Превентивні властивості сироватки крові вакцинованих тварин визначали шляхом внутрішньом'язового введення збірної сироватки крові великої рогатої худоби по 0,5 см³ 10 золотистим хом'якам, котрих через дві години заражали патогенною культурою лептоспір у дозі 10 LD₅₀. Контрольним тваринам (золотистим хом'якам) перед зараженням вводили сироватку крові не вакцинованої великої рогатої худоби у об'ємі 0,5 см³. Після зараження за хом'яками спостерігали протягом 10 діб після загибелі контрольних тварин.

Визначення імуногенності вакцини у виробничих умовах проводили на сприйнятливих тваринах – великій рогатій худобі: 30 гол. віком старше одного року та 30 гол. віком до одного року (від 8 до 11 місяців). Тваринам старше одного року вводили вакцину внутрішньом'язово у дозі 5 см³, тваринам до року – в дозі 3 см³ також внутрішньом'язово.

Показники економічної ефективності ветеринарних заходів за лептоспірозу великої рогатої худоби з використанням вакцини розраховували згідно з «Методикой определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (затверджено Департаментом ветеринарії МСХ і П РФ 21 лютого 1997 року).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ЩОДО ЛЕПТОСПИРОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В УКРАЇНІ

З метою проведення епізотологічного моніторингу лептоспірозу великої рогатої худоби було вивчено та проаналізовано дані ветеринарної звітності Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) за період з 2005 по 2014 роки. За вказаний період ветеринарними лабораторіями України було досліджено 2100196 проб сироваток крові великої рогатої худоби та отримано 120766 позитивних реакцій, що становить 5,8 % від обстеженого поголів'я.

Аналіз інфікованості великої рогатої худоби лептоспірозом за роками наведено на рис. 2.

За період що аналізується інфікованість була найвищою у 2005 році – 8,6 %, а найменшою в 2012 році – 3,6 %. У 2005–2008 роках спостерігалось стрімке зниження інфікованості, тоді як у наступні три роки (2009–2011 роки) інфікованість була приблизно на однаковому рівні – коливання показника від 4,5 до 4,7 %. В наступні два роки (2013 і 2014) інфікованість дещо збільшилась і

становила відповідно 4,3 та 4,2 %. Загалом, за період з 2005 по 2014 роки спостерігається стійка тенденція до зменшення випадків інфікованості великої рогатої худоби лептоспірозом, що свідчить про покращення епізоотичної ситуації.

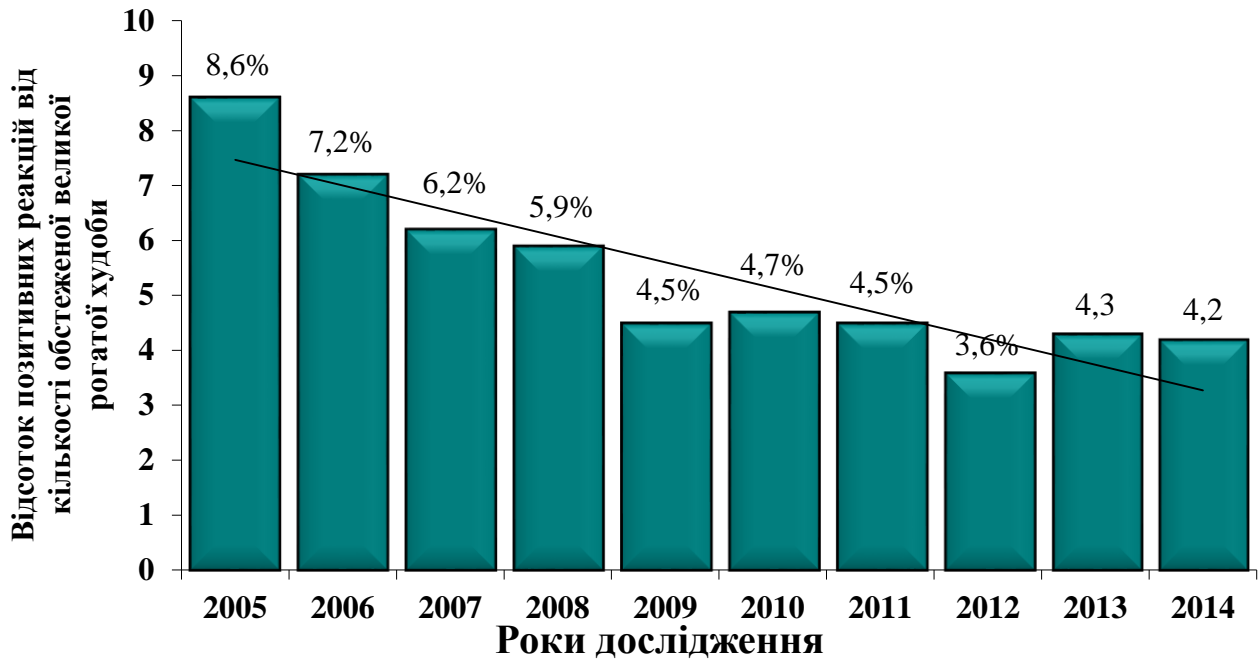


Рис. 2. Динаміка інфікованості великої рогатої худоби лептоспірозом на території України (2005–2014 рр.)

Для встановлення етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби було проведено аналіз даних щодо серогрупової приналежності серед результатів захворювання тварин на лептоспіроз (рис. 3).

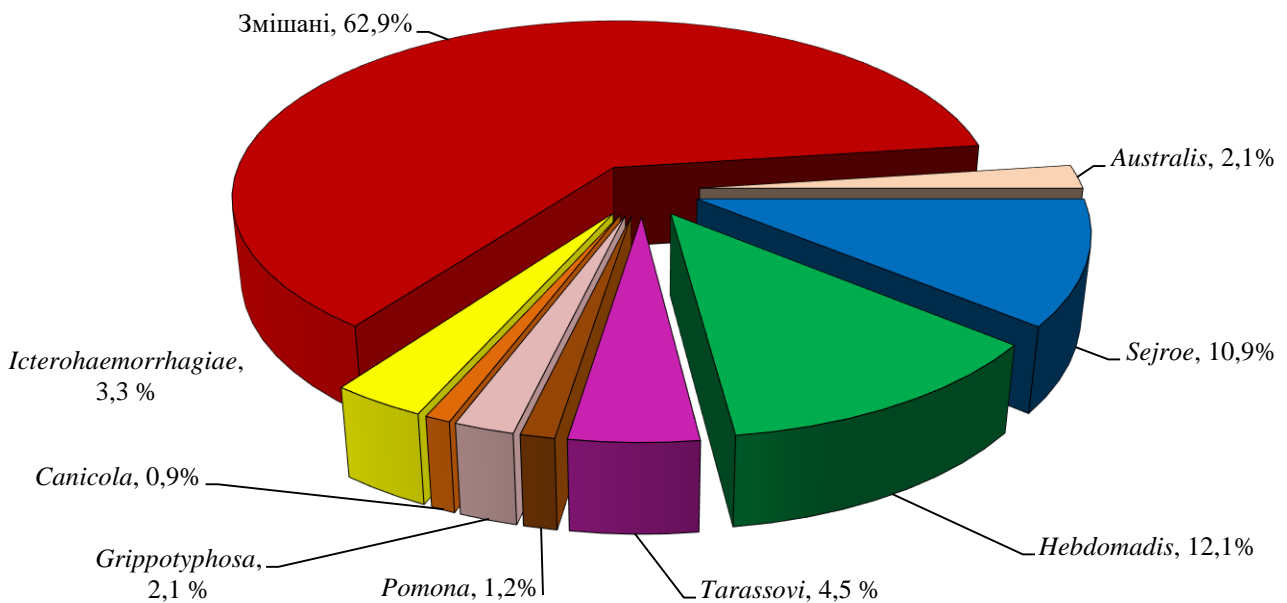


Рис. 3. Етіологічна структура лептоспірозу великої рогатої худоби на території України (2005–2014 роки)

В цілому на території України серед поголів'я великої рогатої худоби домінуючими серологічними групами лептоспір є: *Hebdomadis* – 12,1 % та *Sejroe* – 10,9 %. Позитивні реакції з іншими серогрупами лептоспір спостерігаються значно рідше: *Tarassovi* – 4,5 %; *Icterohaemorrhagiae* – 3,3 %; *Grippotiphosa* – 2,1 %; *Australis* – 2,1 %; *Pomona* – 1,2 %; *Canicola* – 0,9 %. За аналізований період спостерігалась значна кількість позитивних реакцій одразу з декількома серогрупами лептоспір (змішані реакції), що становить 62,9 % від загальної кількості позитивно реагуючих тварин.

ЕКОЛОГО-ГЕОГРАФІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕПТОСПІРОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Вивчення патогенних лептоспір, виділених у різних країнах, показує, що етіологічна структура лептоспірозу в окремих районах (областях та регіонах) неоднакова як за кількістю різних серогруп лептоспір – збудників лептоспірозу, так і за їх співвідношенням. В зв'язку з цим вкрай важливим етапом у разі розроблення конкретних диференційованих заходів боротьби з лептоспірозом для кожної окремої території (області, району) є вивчення його територіальної приналежності.

З метою вивчення територіальної приуроченості спалахів лептоспірозу серед поголів'я великої рогатої худоби в Україні було проведено еколого-географічний аналіз спалахів цього захворювання серед тварин за період з 2005–2014 рр. і складено карту етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби всіх областей України, на якій за допомогою кругових графіків відображено відсоткове співвідношення восьми серогруп лептоспір, за якими проводять дослідження сироватки крові тварин в РМА лабораторії ветеринарної медицини (рис. 4).

Як видно з матеріалів рис. 4, етіологічна структура лептоспірозу великої рогатої худоби в різних областях України не є одноманітною. Так, наприклад, в Черкаській області вона різна й представлена усіма вісьмома серологічними групами лептоспір: *Icterohaemorrhagiae* – 10,5 %; *Hebdomadis* – 7,1 %; *Sejroe* – 4,4 %; *Tarassovi* – 4,2 %; *Grippotiphosa* – 3,4 %; *Pomona* – 3,3 %; *Canicola* – 2,3 %; *Australis* – 1,8 %. Також реєструвались випадки захворюваності, коли в сироватках крові тварин виявляли антитіла одразу до декількох серогруп лептоспір – 63,0 %. Різноманітною є також етіологічна структура лептоспірозу у Миколаївській, Волинській, Івано-Франківській, Рівненській, Харківській та інших областях.

Однак, в окремих областях етіологічна структура лептоспірозу є одноманітною. Наприклад, в Житомирській остання представлена лише декількома основними серогрупами лептоспір: *Sejroe* – 40,5 %, *Hebdomadis* – 19,8 % та змішані – 37,3 %. Одноманітну етіологічну структуру виявляли також у АР Крим, Запорізькій, Хмельницькій та інших областях.

Також було проведено епізоотологічне районування території України та складено карту щільності інфікованої великої рогатої худоби на лептоспіроз (рис. 5).

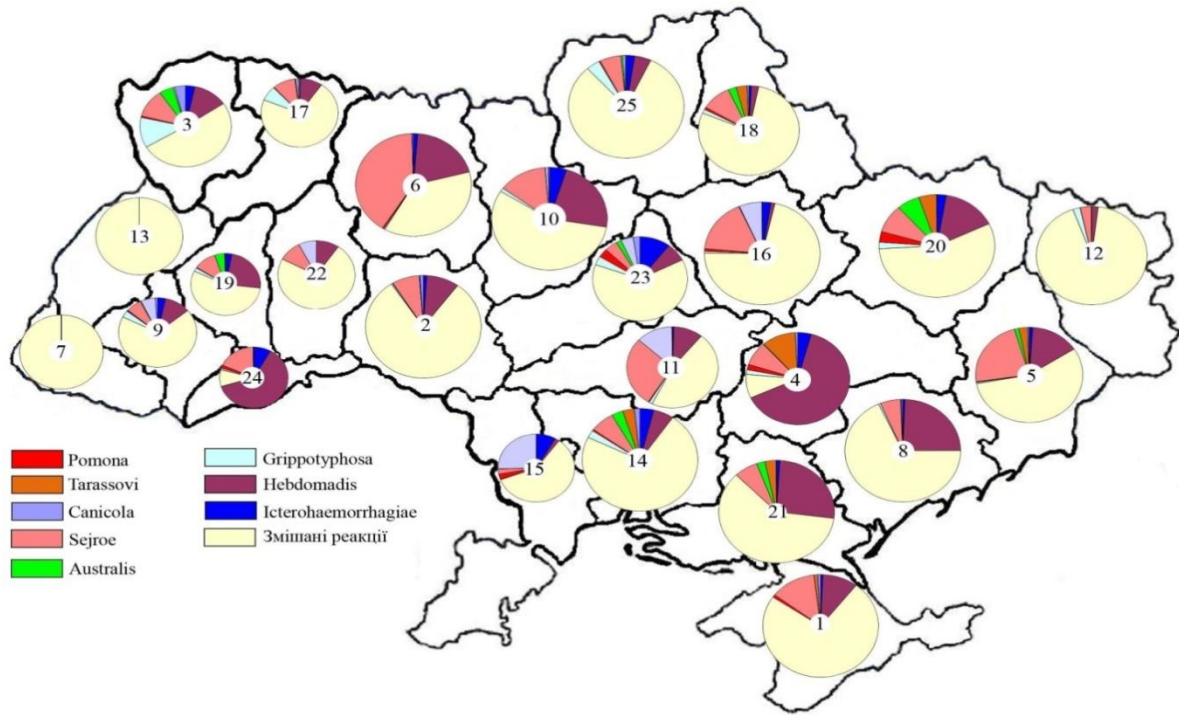


Рис. 4. Карта етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби України, області: 1 – АР Крим; 2 – Вінницька; 3 – Волинська; 4 – Дніпропетровська; 5 – Донецька; 6 – Житомирська; 7 – Закарпатська; 8 – Запорізька; 9 – Івано-Франківська; 10 – Київська; 11 – Кіровоградська; 12 – Луганська; 13 – Львівська; 14 – Миколаївська; 15 – Одеська; 16 – Полтавська; 17 – Рівненська; 18 – Сумська; 19 – Тернопільська; 20 – Харківська; 21 – Херсонська; 22 – Хмельницька; 23 – Черкаська; 24 – Чернівецька; 25 – Чернігівська.



Рис. 5. Карта щільності інфікованої великої рогатої худоби на лептоспіроз (2005–2014 рр.)

Залежно від кількості випадків захворювання великої рогатої худоби на лептоспіроз усі області країни було поділено на чотири зони ризику зараження: низького, середнього, високого та дуже високого.

До зони дуже високого ризику зараження входять п'ять областей: Донецька, Сумська, Миколаївська, Черкаська, Харківська. Сумарна кількість випадків захворюваності великої рогатої худоби, що припадають на цю зону, становить 61,95 %. Для областей, які входять до цієї зони, характерна дуже висока вірогідність захворюваності поголів'я великої рогатої худоби лептоспірозом.

В АР Крим і таких областях, як Івано-Франківська, Чернівецька, Хмельницька, Кіровоградська, Львівська та Закарпатська за останні десять років спостерігали найменшу кількість випадків позитивно реагуючої великої рогатої худоби щодо лептоспірозу й тому вони потрапили до зони низького ризику зараження, де сумарна кількість випадків захворюваності становить 2,84 %.

ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВАТОК КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В РМА З ВИКОРИСТАННЯМ МАЛОГО ДІАГНОСТИЧНОГО РЯДУ

Для поглибленого дослідження етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби та з'ясування відсоткового співвідношення серогруп лептоспір серед результатів змішаних реакцій, проведено дослідження сироваток крові великої рогатої худоби із 14 областей України (Вінницька, Волинська, Донецька, Житомирська, Запорізька, Київська, Луганська, Миколаївська, Одеська, Полтавська, Харківська, Хмельницька, Черкаська, Чернігівська).

Всього було досліджено 1706 проб сироваток крові із 43 господарств, з яких 1065 проб виявились позитивними, що становило 62,4 % (рис. 6).

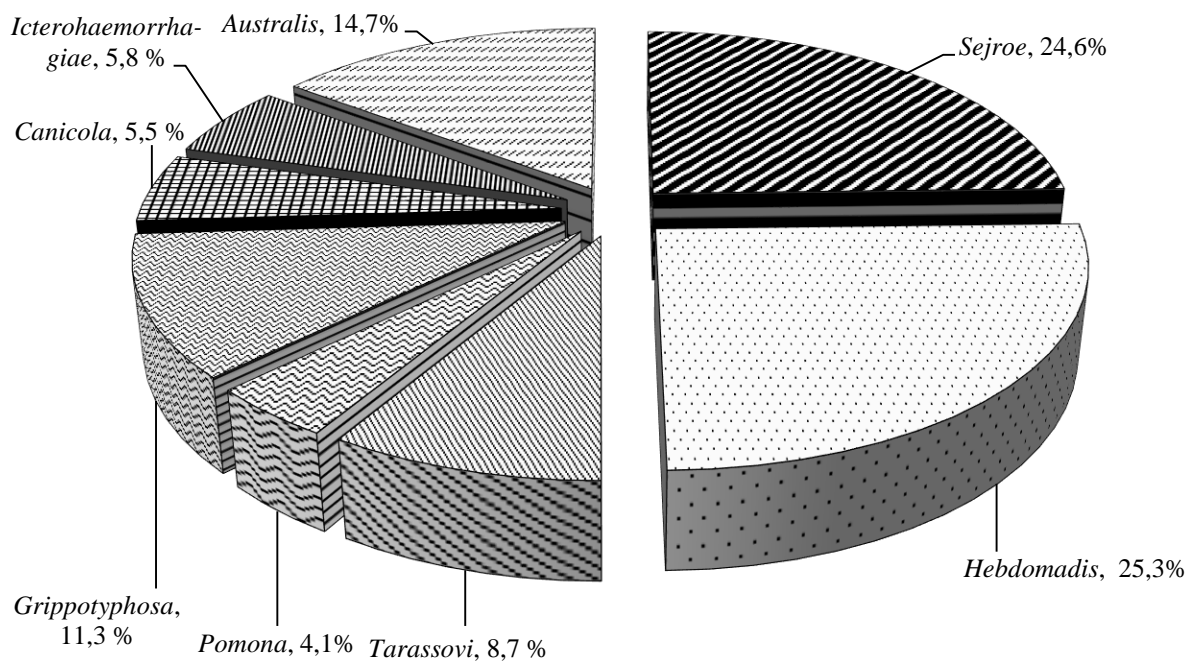


Рис. 6. Етіологічна структура лептоспірозу великої рогатої худоби (кількість всіх позитивних реакцій за результатами власних досліджень)

У результаті проведених досліджень, встановлено, що домінуючими серологічними групами лептоспир, які циркулюють серед поголів'я великої рогатої худоби на території України є: *Hebdomadis* – 25,3 % та *Sejroe* – 24,6 %. Такі серогрупи лептоспир як *Australis*, *Grippotyphosa* і *Tarassovi* відіграють другорядну роль в етіології лептоспірозу великої рогатої худоби та становлять відповідно 14,7 %, 11,3 та 8,7 %. Інші серологічні групи лептоспир реєструються в незначній кількості: *Icterohaemorrhagiae* (5,8 %), *Canicola* (5,5 %) та *Pomona* (4,1 %).

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ СЕРОВАРУ *HARDJO* (СЕРОГРУПА *SEJROE*) В ЕТІОЛОГІЧНІЙ СТРУКТУРІ ЛЕПТОСПІРОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Враховуючи значне поширення серовару *hardjo* серед поголів'я великої рогатої худоби в зарубіжних країнах (72 % – у Англії, 34,7 % – у Ірландії, 11 % – у Іспанії, 42 % – у США і тощо) та значний рівень ризику занесення цього серовару лептоспир на територію України з імпортованим поголів'ям, було проведено дослідження сироваток крові великої рогатої худоби з використанням восьми діагностичних штамів лептоспир, що є найбільш розповсюдженими на території України (малий діагностичний ряд), із доповненням еталонним штамом *Hardjopraijtno* серовару *hardjo*, серогрупи *Sejroe*.

Проби крові великої рогатої худоби було відібрано у 6 областях України (Хмельницька, Чернігівська, Київська, Волинська, Донецька та Полтавська). Всього було досліджено 111 проб сироватки крові великої рогатої худоби, з яких 76 (68,5 %) виявились позитивними.

За результатами досліджень встановлено, що у зразках сироваток крові з усіх досліджених областей було виявлено специфічні антитіла до серовару *hardjo*. З усіх досліджених проб сироваток крові антитіла до цього серовару патогенних лептоспир було виявлено у 44 зразках, що становить 39,6 %.

Серед результатів позитивних реакцій на лептоспіроз 9 проб (11,8 %) сироваток крові прореагували лише на серовар *hardjo*, 32 проби (42,1 %) – лише на серовар *polonica*, а 35 проб (46,1 %) – на обидва серовари одночасно. За результатами отриманих даних можна зробити висновок, що хоча серовари *hardjo* та *polonica* належать до однієї серогрупи *Sejroe*, вони не завжди утворюють між собою перехресні реакції. Цей факт корелює з літературними даними, що свідчать про відсутність серозахисту у тварин до серовару *polonica*, якщо вони переохворіли на лептоспіроз, спричинений сероваром *hardjo*, і навпаки.

На нашу думку, в зв'язку зі встановленням циркуляції патогенних лептоспир серовару *hardjo* серед поголів'я великої рогатої худоби в Україні, для проведення ефективної специфічної профілактики лептоспірозу тварин цього виду необхідно включати цей серовар до складу відповідних вакцин.

РОЗРОБЛЕННЯ І ВАЛІДАЦІЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР МЕТОДОМ ПЛР

Для здійснення постійного епізоотологічного моніторингу лептоспірозу необхідно удосконалювати методи його діагностики, підвищувати їх специфічність та чутливість. З цією метою, для проведення діагностичних

досліджень розроблено і випробувано тест-систему для виявлення ДНК патогенних лептоспир виду *Leptospira interrogans* методом ПЛР. В цьому разі було проведено біоінформативний аналіз генів патогенних лептоспир та розроблено дизайн олігонуклеотидних праймерів, відпрацьовано температуру їх відпалу, а також оптимальні співвідношення компонентів реакційної суміші для проведення ампліфікації.

ПЛР-тест-система для виявлення ДНК патогенних лептоспир ґрунтується на використанні пари праймерів (*Lepto F*: 5' - CGCTTGTTGGTGCTTTCGGTGGT - 3' та *Lepto R*: 5' - CTCACCGATTTCGCCTGTTGGG - 3'), що фланкують фрагмент гена *Lip L 32*, який є відповідальним за кодування структури зовнішнього мембранного білка лептоспир розміром 264 п. н., характерного лише для патогенних лептоспир виду *Leptospira interrogans*.

Оптимізація умов ПЛР передбачала підбір оптимальної концентрації іонів Магнію в реакційній суміші та температурних параметрів ампліфікації.

Перший етап досліджень передбачав вивчення специфічності ампліфікації за різних температур відпалу праймерів.

Проведеними дослідженнями було встановлено оптимальні температурні параметри ампліфікації (табл. 1).

Таблиця 1

**Температурні параметри проведення ампліфікації
з праймерними системами *Lepto F/R***

№ циклу	Температура, °C	Час	Кількість циклів
1	95	3 хв	1
2	94	30 с	40
	55	30 с	
	72	30 с	
3	72	5 хв	1

Наступним етапом розроблення тест-системи виявлення патогенних лептоспир був підбір оптимального вмісту іонів Магнію у реакційній суміші. Випробовували ефективність ампліфікації з використанням реагентів, де концентрація іонів Магнію дорівнювала від 1,0 до 4,0 мМ/мкл. Оцінка результатів ампліфікації показала, що у разі накопичення фрагменту гена *Lip L 32* довжиною 264 п. н. необхідно, щоб реакційний буфер містив 2,5 мМ/мкл іонів Магнію.

Випробування розробленої ПЛР-тест-системи на аналітичну специфічність проводили з використанням восьми патогенних референтних штамів лептоспир (*493 Poland, Kabura, Perepelicyuni, Pomona, Moskva V, Hond Utrecht IV, M 20, Jez-bratislava*), які є найбільш поширеними збудниками лептоспірозу в Україні і використовуються згідно діючих нормативних документів для дослідження сироватки крові на наявність антитіл в РМА (рис. 7).

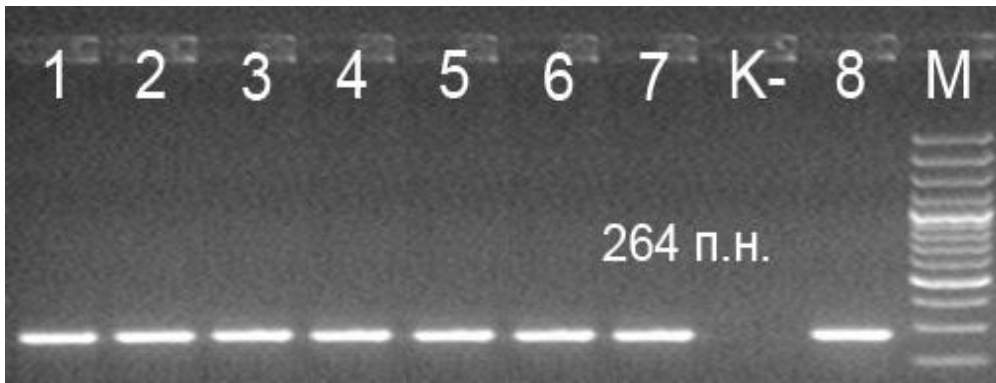


Рис. 7. Визначення аналітичної специфічності: електрофореграма ПЛР-продуктів 8 референтних штамів патогенних лептоспир. Доріжки: 1–8 – позитивний результат; «К-» – негативний контроль; М – маркер молекулярної ваги.

Результати, представлені на рис. 7, свідчать про те, що створена дослідна праймерна пара є високоспецифічною для ідентифікації генетичного матеріалу лептоспир, оскільки утворювався чіткий амплікон на довжині 264 п. н., і вона здатна виявляти вісім найпоширеніших серогруп патогенних лептоспир, які циркулюють на території України.

Наступним етапом розроблення ПЛР-тест-системи було дослідження її чутливості (рис. 8).



Рис. 8. Електрофореграма ПЛР-продуктів за визначення чутливості праймерних систем *Lepto F/R*: 1 – первинний зразок – містив кількість генетичного матеріалу відповідну 8780987 геномній одиниці – позитивно; 2 – перше розведення – 878098 геномних одиниць – позитивно; 3 – друге розведення 87809 геномних одиниць – позитивно; 4 – третє розведення 8780 геномних одиниць – позитивно; 5 – четверте розведення 878 геномних одиниць – позитивно; 6 – п'яте розведення 87 геномних одиниць – позитивно; 7 – шосте розведення 8 геномних одиниць – негативно; «К-» – негативний контроль; М – маркер молекулярної ваги.

Дослідження зразків з різною кількістю мікробних клітин патогенних лептоспир показало, що поріг детекції методики становить 87 геномних одиниць в реакції, що відповідає кількості 870 кл/см³ досліджуваної рідини.

Визначення специфічності розробленої ПЛР-тест-системи наведено на рис. 9.



Рис. 9. Електрофореграма ПЛР-продуктів за визначення специфічності праймерних систем *Lepto F/R*: 1 – *Micoplasma gallisepticum* (штам *S 6*); 2 – *Micoplasma agalactia* (штам *S-11*); 3 – *Chlamidia psittaci* (штам *PM-11*); 4 – сапрофітний (*L. biflexa*) референтний штамп *Patoc 1* серовар *patoc* (серогрупа *Semaranga*); 5 – патогенний (*L. interrogans*) референтний штамп лептоспір *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*); «К-» – негативний контроль; М – маркер молекулярної ваги.

Розроблена ПЛР-тест-система для ідентифікації генетичного матеріалу патогенних лептоспір, у експерименті з різними ДНК-матрицями підтверджує її специфічну здатність виявляти лише генетичний матеріал патогенних лептоспір, без утворення ПЛР-продукту з іншими близькими ДНК-матрицями інших видів мікроорганізмів (мікоплазм та хламідій). Також доведено внутрішньовидову специфічність тест-системи – використані праймери не гібридизувались за оптимальних умов реакції з ДНК сапрофітних (не патогенних) лептоспір на фоні успішного утворення специфічних продуктів ампліфікації з ДНК патогенних лептоспір.

Валідацію розробленої ПЛР-тест-системи проводили в порівняльних дослідженнях за допомогою комерційно-доступної ПЛР-тест-системи для виявлення ДНК патогенних лептоспір «*Lep*» виробництва *IsogeneLab. ltd.* – «Набор реагентов для амплификации ДНК *Leptospira spp. (pathogenic serovars)*», *Cat. № L2137, Lot № 20113* (Російська Федерація).

В результаті проведених досліджень було встановлено, що розроблена ПЛР-тест-система та комерційна тест-система мають ідентичну чутливість та специфічність. Це свідчить про точність створеної методики порівнянно з закордонним аналогом.

РОЗРОБЛЕННЯ Й ВАЛІДАЦІЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР МЕТОДОМ ПЛР У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

Для проведення діагностичних досліджень також було розроблено тест-систему для виявлення ДНК патогенних лептоспір шляхом постановки якісної ПЛР у режимі реального часу.

Проведено аналіз консервативних ділянок нуклеотидних послідовностей гену *Lip L 32* різних штамів патогенних лептоспір шляхом множинного вирівнювання цільових послідовностей та виявлена консервативна ділянка була використана для підбору праймерів та зонду (табл. 2).

Характеристика олігонуклеотидних праймерів для детекції ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу

Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність, 5'–3'	Координати згідно гену <i>Lip L 32</i> *
<i>Lip L 32 F</i>	CGGATAYGTAAAGCCAGGACAAG	199–221
<i>Lip L 32 R</i>	CGAACTCCCATTTCAGCGATTA	285–306
<i>Lip L 32 P</i>	FAM-CGGACGGTTTAGTTCGAYGGAACA-BHQ1	225–248

Примітка. *GenBank: KC800990, *Leptospira interrogans serovar canicola*

Зонд для детекції ампліфікації у реальному часі було мічено флуоресцентним барвником *FAM* на 5' кінці олігонуклеотиду і гасником флуоресценції *BHQ1* – на 3' кінці.

На першому етапі досліджень було вивчено специфічність ампліфікації за різної температури відпалу праймерів. Під час випробування традиційних режимів відпалу праймерів від 45 до 60 °С встановлено, що олігонуклеотидна система *Lip L 32* специфічно реагує з ДНК патогенних лептоспир в градієнті температур від 45 до 60 °С. Амплікон виявлено в усіх семи проаналізованих зразках ДНК патогенних лептоспир. Пониження робочої температури відпалу призводило до збільшення порогу чутливості появи специфічних ампліконів. У разі збільшення температури відпалу на кожні 5 °С чутливість методики знижувалась. Так, в зразках ДНК лептоспир у разі відпалу за 50 °С амплікон вже детектували на значно нижчому рівні, ніж за відпалу при 45 °С. У разі підвищення температури ще на 5 °С чутливість системи індикації знижувалась у 1000 разів. Отже, оптимальною температурою відпалу для індикації ДНК патогенних лептоспир є 45 °С, що забезпечує специфічну детекцію без втрати чутливості методики.

Наступним етапом роботи був підбір оптимального вмісту іонів Магнію у реакційній суміші.

Випробовували ефективність ампліфікації з використанням наступних кількостей *MgCl₂*: 1,5 мМ/мкл; 2,0; 2,5; 3,0 мМ/мкл.

Оцінка результатів ампліфікації показала, що оптимальною концентрацією іонів *MgCl₂*, котра дозволяє отримати специфічну ділянку ДНК патогенних лептоспир є 1,5 мМ/мкл. За інших концентрацій (2,0 мМ/мкл; 2,5; 3,0 мМ/мкл) кількісні показники *Ct* були значно вищими, що свідчить про зниження чутливості системи індикації утворення специфічного амплікону (фрагменту гену *Lip L 32*).

З метою визначення чутливості створеної ПЛР-тест-системи у режимі реального часу проводили десятикратні розведення культури референтного патогенного штаму лептоспир *M 20* (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*). В дослідженні використовувались наступні концентрації: 4×10^6 кл/см³, 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 кл/см³. Після отримання різних розведень культури

лептоспир відбирали по 0,1 см³ з кожного розведення і проводили виділення ДНК.

Результати досліджень отриманих екстрактів ДНК наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Ефективність специфічного відпалу праймерів *Lip L 32* на матрицях ДНК патогенних лептоспир за різних концентрацій мікробних клітин

Концентрація лептоспир, мікробних клітин/см ³	Кількість мікробних клітин взята для виділення ДНК	Значення <i>Ct</i> по каналу <i>FAM/Green</i>	Результати аналізу щодо виявлення ДНК патогенних лептоспир
4×10 ⁶	4×10 ⁵	20,56	позитивний
4×10 ⁵	4×10 ⁴	22,76	позитивний
4×10 ⁴	4×10 ³	26,81	позитивний
4×10 ³	4×10 ²	30,26	позитивний
4×10 ²	4×10 ¹	0	негативний
4×10 ¹	4	0	негативний
К-	0	0	негативний

За результатами проведених досліджень було встановлено: чутливість тест-системи складає 4×10² клітин, що відповідає кількості 4×10³ кл/см³ досліджуваної рідини.

Одним з показників придатності того чи іншого методу діагностики хвороби є його специфічність. Тому, було вивчено специфічність створеної ПЛР-тест-системи для виявлення ДНК патогенних лептоспир виду *Leptospira interrogans*. З цією метою, було використано референтні штами патогенних лептоспир, сапрофітних лептоспир та інших мікроорганізмів (хламідій, мікоплазм, сальмонел та ін.).

Специфічність тест-системи визначали шляхом ампліфікації екстрагованої ДНК та гібридаційно-флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації в режимі реального часу.

В результаті проведених досліджень з визначення специфічності було встановлено, що розроблена тест-система для виявлення ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу дозволяє виявляти лише ДНК штамів патогенних лептоспир (*Leptospira interrogans*). Проби культур сапрофітних лептоспир (*Leptospira biflexa*) і мікроорганізмів інших видів були негативні.

Валідацію розробленої ПЛР-тест-системи у режимі реального часу для виявлення ДНК патогенних лептоспир проводили в порівняльних дослідженнях за допомогою комерційно-доступної ПЛР-тест-системи для виявлення ДНК патогенних лептоспир «ЛПС» виробництва АмплиСенс – «АмплиСенс® *Leptospira-FL*», Cat. № VET-49-FRT (RG, iQ) (Російська Федерація).

За результатами проведених порівняльних досліджень усіх біологічних зразків, взятих для досліду, встановлено відповідність отриманих результатів,

що свідчить про точність створеної тест-системи порівняно з закордонною тест-системою.

Переваги розроблених ПЛР-тест-систем порівнянно з РМА полягають у тому, що за допомогою них є змога виявляти ДНК лептоспір у органах, тканинах, сечі в перші дні після зараження, а за допомогою РМА виявляють титри антитіл у крові хворих тварин, котрі з'являються лише на 7–10 добу і досягають максимальних показників на 14–21 добу.

СПЕЦИФІЧНА ПРОФІЛАКТИКА ЛЕПТОСПИРОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Ефективна боротьба з лептоспірозом можлива за умов впровадження комплексу заходів, включаючи своєчасну вакцинацію, дератизацію, дезінфекцію та лікування. Причому провідна роль належить вакцинації незалежно від виду тварин. Для більшої ефективності вакцинопрофілактики необхідно готувати вакцини із сероварів лептоспір, найпоширеніших серед тварин певної місцевості.

В Україні для специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби використовують полівалентну вакцину ВДНКІ проти лептоспірозу тварин – другий варіант, що містить антигени лептоспір серогруп *Pomona*, *Tarassovi*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*.

Попередніми дослідженнями було встановлено провідну роль в етіологічній структурі збудників лептоспірозу великої рогатої худоби на території України лептоспір наступних серогруп: *Hebdomadis*, *Sejroe* (серовари *polonica* і *hardjo*), *Tarassovi*, *Icterohaemorrhagiae* та *Grippotyphosa*. У зв'язку зі змінами етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні нині з метою проведення ефективної специфічної профілактики лептоспірозу цього виду тварин не можна обмежуватись використанням лише другого варіанту полівалентної вакцини ВДНКІ проти лептоспірозу тварин.

Для вдосконалення засобів специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби було розроблено та виготовлено шестивалентну інактивовану вакцину проти лептоспірозу цього виду тварин, до складу якої входять шість штамів лептоспір п'яти різних серогруп.

Технологія виготовлення вакцини складається з наступних етапів:

- використовують штами лептоспір, селекціоновані за ознаками максимальної імуногенної та антигенної активності, які належать до п'яти серологічних груп: ВГНКІ-1 (серогрупа *Grippotyphosa*), ВГНКІ-2 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*), ВГНКІ-4 (серогрупа *Tarassovi*), *Kabura* (серогрупа *Hebdomadis*), *493 Poland* (серогрупа *Sejroe*), *Hardjoprajtno* (серогрупа *Sejroe*). Зазначені штами було відібрано з урахуванням змін етіологічної структури, які відбулись в останній час;

- відібрані штами лептоспір вирощують на середовищі Кортгофа з додаванням 10 % сироватки крові овець за 27–28 °С у темному приміщенні. Для виготовлення вакцин застосовують культури, що містять не менше 75 млн лептоспір в 1 см³;

- кожен штам лептоспір культивують окремо, потім їх зливають в одну ємкість у наступному співвідношенні: *Grippotyphosa* – 20 %; *Icterohaemorrhagiae* – 20 %; *Tarassovi* – 20 %; *Hebdomadis* – 20 %; *Sejroe* (серовар *polonica*) – 10 %; *Sejroe* (серовар *hardjo*) – 10 %.

- інактивацію лептоспир проводять розчином фенолу, додаючи його до культури у кількості 0,5 % від об'єму суміші. Консервовану культуру витримують за температури 27–28 °С 12 год, після чого проводять мікроскопію культури в темному полі мікроскопу;

- з метою концентрування вакцини суміш культур лептоспир осаджують додаванням розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) 10–12 % від об'єму препарату, попередньо приготувавши 70 % стерильний маточний розчин. Після цього суміш енергійно змішують мішалкою 10–15 хв;

- отриману суміш витримують 7–10 діб за температури 2–5 °С до утворення осаду, надосадову рідину декантують в кількості 50 % від загального об'єму суміші;

- суміш енергійно перемішують і проводять розфасовку препарату у флакони за допомогою механічного змішувача. Вакцину, виготовлену цим способом, контролюють на стерильність, нешкідливість та імуногенну активність.

ВИВЧЕННЯ ЯКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ СТВОРЕНОЇ ВАКЦИНИ

З метою визначення якості створеного препарату було проведено дослідження трьох послідовно виготовлених (за ідентичною технологією) серій вакцини за такими показниками: концентрація водневих іонів (величина pH), стерильність, повнота інактивації, нешкідливість, залишкова кількість інактиватора. Результати досліджень наведено в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати досліджень трьох експериментальних серій вакцин

Показник	Серія № 1	Серія № 2	Серія № 3
Концентрація водневих іонів	7,28	7,33	7,24
Стерильність	стерильна	стерильна	стерильна
Повнота інактивації	За триразового пасажування вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспир	За триразового пасажування вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспир	За триразового пасажування вакцини на живильному середовищі не спостерігався ріст лептоспир
Нешкідливість	Нешкідлива	Нешкідлива	Нешкідлива
Залишкова кількість інактиватора	0,48 %	0,46 %	0,48 %

За результатами досліджень встановлено, що всі три серії вакцини відповідали необхідним нормативним вимогам: величина pH усіх серій вакцини була в діапазоні 7,24–7,33, що знаходилось в межах норми (від 7,2 до 7,4); всі виготовлені препарати були стерильними; лептоспірозний антиген був повністю інактивованим; всі три серії препарату виявились нешкідливими; залишкова кількість інактиватора (фенолу) становила 0,46–0,48 %.

**ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАКЦИНИ
В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ**

Під час визначення показників імуногенності розроблених препаратів за принципом аналогів було сформовано три групи кролів (по 5 тварин у групі, масою тіла 3,0–3,5 кг), яким одноразово внутрішньом'язово вводили вакцину в дозі 0,75 см³. На 25 добу у вакцинованих кролів відбирали з вени кров і досліджували сироватку крові в РМА із штамами відповідних сероварів лептоспир, що входили до складу випробовуваних серій вакцин (табл. 5).

Таблиця 5

**Титри антитіл у РМА щодо різних серогруп лептоспир у сироватці крові
вакцинованих кролів на 25 добу після вакцинації, $M \pm m, n=5$**

№ серії	Порядковий номер	Титр антитіл до серогруп лептоспир					
		<i>Icterohaemorrhagiae</i> (штам ВГНКИ-2)	<i>Tarassovi</i> (штам ВГНКИ-4)	<i>Sejroe</i> (штам 493 Poland)	<i>Sejroe</i> (штам Hardjoprajtno)	<i>Grippytyphosa</i> (штам ВГНКИ-1)	<i>Hebdomadis</i> (штам Kabura)
Серія № 1	Кріль № 1	1:400	1:100	1:400	1:100	1:200	1:200
	Кріль № 2	1:800	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
	Кріль № 3	1:200	1:200	1:400	1:400	1:200	1:400
	Кріль № 4	1:800	1:400	1:800	1:400	1:800	1:800
	Кріль № 5	1:200	1:400	1:200	1:100	1:400	1:200
	Середній титр	1:480±107	1:300±50	1:440±60	1:280±60	1:400±67	1:400±67
Серія № 2	Кріль № 1	1:800	1:400	1:1600	1:200	1:400	1:400
	Кріль № 2	1:800	1:800	1:800	1:400	1:800	1:800
	Кріль № 3	1:400	1:800	1:400	1:400	1:200	1:800
	Кріль № 4	1:800	1:800	1:800	1:200	1:800	1:800
	Кріль № 5	1:800	1:1600	1:800	1:400	1:800	1:800
	Середній титр	1:720± 53	1:880±120	1:880±120	1:320±40	1:600±100	1: 720± 53
Серія № 3	Кріль № 1	1:400	1:400	1:400	1:800	1:800	1:400
	Кріль № 2	1:1600	1:800	1:1600	1:400	1:800	1:800
	Кріль № 3	1:800	1:800	1:1600	1:800	1:400	1:1600
	Кріль № 4	1:400	1:100	1:400	1:200	1:400	1:400
	Кріль № 5	1:800	1:400	1:800	1:800	1:800	1:1600
	Середній титр	1:800±134	1:500±100	1:960±214	1:600±100	1:640±80	1:960±214
Середній титр за трьома серіями вакцин		1:667±111	1:560±125	1:760±152	1:400±67	1:547±99	1:693±137

За вимогами нормативно-технічної документації вакцину вважають активною, якщо не менш, як у чотирьох із п'яти вакцинованих кролів, титр

антитіл у сироватці крові до таких штамів лептоспир: ВГНКИ-1 (серогрупа *Grippotyphosa*), ВГНКИ-2 (серогрупа *Icterohaemorrhagiae*), ВГНКИ-4 (серогрупа *Tarassovi*), *Kabura* (серогрупа *Hebdomadis*), 493 *Poland* (серогрупа *Sejroe*), *Hardjoprajtno* (серогрупа *Sejroe*) буде не нижче 1:100.

Введення всіх трьох експериментальних серій вакцини дослідним кролям забезпечувало утворення специфічних протилептоспірозних антитіл. Найвищі титри антитіл до серогруп лептоспир, в середньому за трьома серіями вакцин, спостерігали до серогруп *Sejroe* (штам 493 *Poland*), *Hebdomadis* та *Icterohaemorrhagiae*, що становило відповідно 1:760±152, 1:693±137 та 1:667±111. Різниця між титрами антитіл до введення вакцини та після її застосування була значною з високим ступенем достовірності ($p \leq 0,001$).

Титри антитіл сироватки крові кролів, вакцинованих експериментальними серіями вакцин, суттєво перевищували вимоги технічних умов, що свідчить про їх високу імуногенність.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВАКЦИНИ НА ПОКАЗНИКИ ЕРИТРОЦИТО- ТА ЛЕЙКОЦИТОПОЕЗУ В ОРГАНІЗМІ ЩЕПЛЕНИХ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Вивчення показників еритроцито- та лейкоцитопоезу за вакцинації є невід'ємною частиною комплексного вивчення системи імунітету і визначення імунного статусу тварин. Тому, було вивчено вплив вакцини на ці показники в організмі щеплених лабораторних тварин.

Встановлено, що після введення вітчизняної інактивованої вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби у тварин розвивався еритроцитоз, який пояснюється надходженням у кров значної кількості еритроцитів з депо, що, в свою чергу, спричиняло зростання гематокритної величини на 14 і 21 добу після вакцинації. Проте, на 28 добу експерименту відзначено тенденцію до зменшення кількості еритроцитів крові та зниження гематокриту, що вказувало на відновлення і стабілізацію еритроцитопоезу в кролів. Спостерігалось також незначне зниження вмісту гемоглобіну на 7,7 % (з 114±2,9 до 105±3,1 г/л; $p < 0,05$; 7 доба), потім зростання, аж до 21 доби (135±2,0 проти 114±2,8 г/л у контролі; $p < 0,001$), з поступовим відновленням на 28 добу (124±1,6 г/л), порівняно з тваринами контрольної групи (113±2,4 г/л). Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті протягом 28 діб експерименту вірогідно не змінювався в обох групах тварин і не виходив за межі фізіологічних коливань.

Також виявлено, що за щеплення кролів на 7 добу розвивається нейтрофільний лейкоцитоз – загальна кількість клітин збільшується на 49 % ($p < 0,001$), нейтрофілів – на 83 % ($p < 0,001$), а на 28 добу виникає еозинофілія – кількість клітин зросла у 2,3 раза, порівняно з початком експерименту ($p < 0,001$), що є закономірною реакцією організму тварин на введення інактивованого збудника лептоспірозу.

Зважаючи на вищезазначене можна стверджувати, що вакцинація кролів інактивованою вакциною проти лептоспірозу великої рогатої худоби не спричиняє суттєвих змін показників еритроцито- та лейкоцитопоезу тварин, а ті що відбуваються – є наслідком фізіологічних реакцій організму тварин на введення вакцини.

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ ІМУНІЗУЮЧОЇ ДОЗИ ВАКЦИНИ

Для визначення оптимальної імунізуючої дози створеної інактивованої полівалентної вакцини проти лептоспірозу тварин було проведено дослід на великій рогатій худобі.

Спочатку було проведено дослід з метою визначення дози вакцини для телят, віком до одного року. За принципом аналогів було сформовано чотири групи телят (по 4 тварини у групі, віком 6–8 місяців). Дослідних телят щепили вакциною у дозі 1 см³, 3 і 5 см³. Для контролю використовували полівалентну вакцину ВДНКІ проти лептоспірозу тварин, другий варіант (доза становила – 4 см³). Результати досліджень наведено на рис. 10.

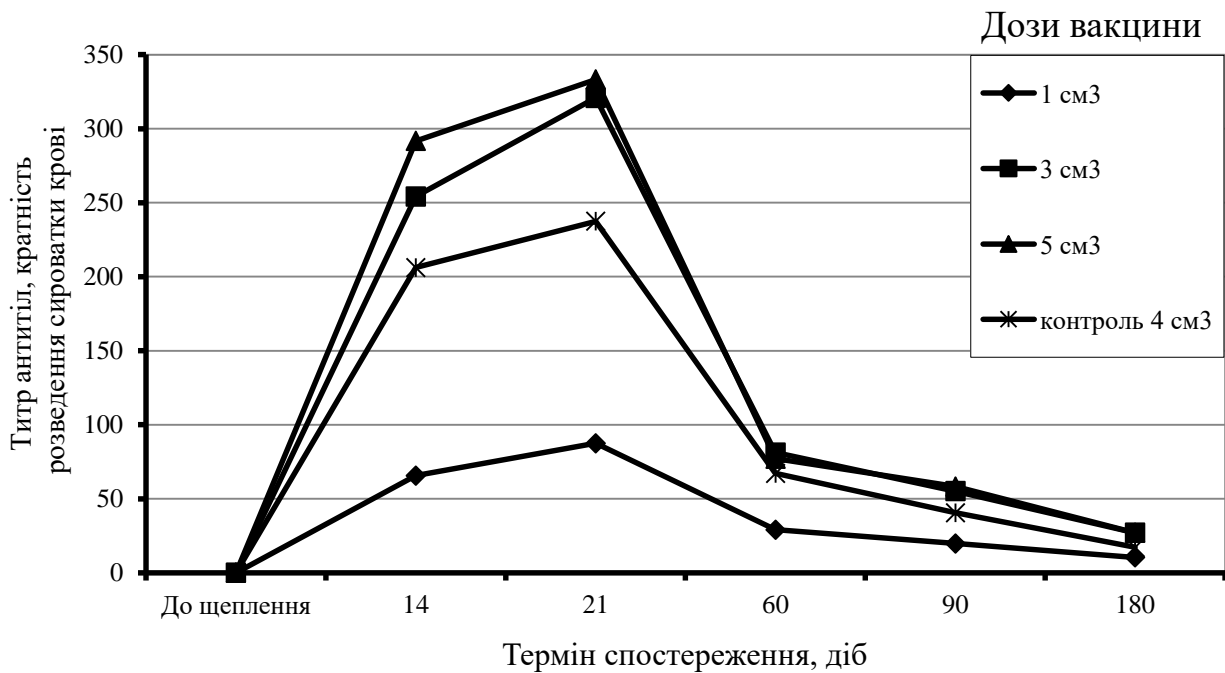


Рис. 10. Титри лептоспірозних антитіл у сироватці крові телят, щеплених різними дозами вакцини ($n=4$)

Судячи з утворення специфічних антитіл (рис. 10), у великої рогатої худоби, щепленої в дозі 3 та 5 см³, імунітет приблизно однакової напруженості формувався до всіх серогруп лептоспір, які входили до складу експериментальної серії вакцини, та перевищував або був на аналогічному рівні показників в групі тварин, щеплених полівалентною вакциною ВДНКІ проти лептоспірозу. Так, титри антитіл експериментальної вакцини на 14 добу після щеплення дозами 3 і 5 см³ становили 1:254,2±26,1 і 1:291,7±27,9 проти контрольної (ВДНКІ) 1:206,2±18,3; на 21 добу після аналогічного щеплення експериментальною вакциною – 1:320,8±43,0 та 1:333,3±44,1, проти контрольної 1:237,5±15,7.

Титри специфічних антитіл у великої рогатої худоби, щепленої в дозі 1 см³, не забезпечували формування імунітету високої напруженості і були значно нижче показників титрів вакцини ВДНКІ, яка була взята для контролю.

Наступним етапом досліджень було визначення оптимальної імунізуючої дози створеної вакцини для великої рогатої худоби старше одного року. За

принципом аналогів сформували чотири групи великої рогатої худоби старше одного року (по 4 тварини у групі (бички та телички), віком 16–20 місяців), яких щеплювали вакциною у дозі 3 см³, 5 і 7 см³. Як контрольну використовували полівалентну вакцину ВДНКІ проти лептоспірозу тварин (другий варіант). Вакцину, взяту для контролю, застосовували в рекомендованих дозах, а саме: для великої рогатої худоби віком понад один рік вона становила 8 см³. Результати досліджень наведено на рис. 11.

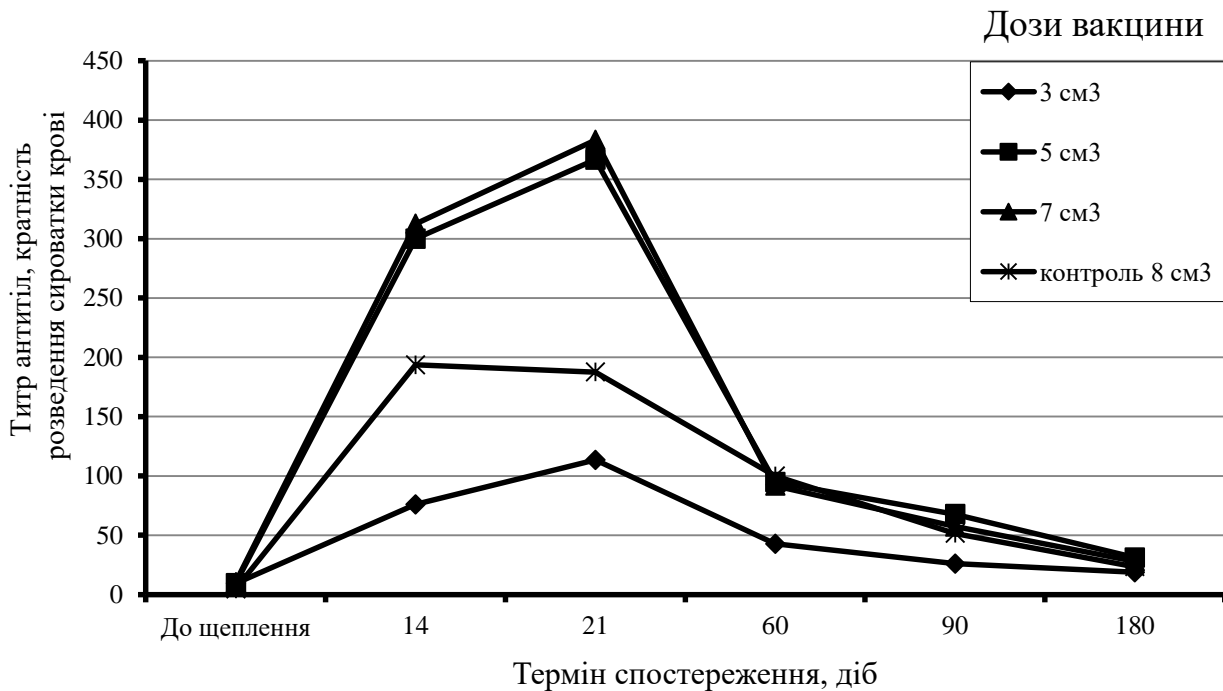


Рис. 11. Титри лептоспірозних антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби (віком понад один рік), щепленої різними дозами вакцини ($n=4$)

Імунологічними дослідженнями було встановлено, що у великої рогатої худоби старше року, щепленої у дозі 5 та 7 см³, формувався активний імунітет до всіх серогруп лептоспір, які входили до складу експериментальної серії вакцини. Імунологічні показники у відповідних дослідних групах великої рогатої худоби значно перевищували аналогічні показники контрольної групи тварин, щеплених полівалентною вакциною ВДНКІ проти лептоспірозу. Так, титри антитіл експериментальної вакцини на 14 добу після щеплення у дозах 5 і 7 см³ становили $1:300,0 \pm 27,8$ та $1:312,5 \pm 24,4$, проти контрольної (ВДНКІ) $1:193,7 \pm 13,1$; на 21 добу після аналогічного щеплення експериментальною вакциною – $1:366,7 \pm 46,4$ та $1:383,3 \pm 53,4$, проти контрольної $1:187,5 \pm 18,3$.

Показники титрів антитіл до серогруп *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Tarassovi* і *Grippotyphosa* варіювали з незначними відмінностями. Але особливо слід відзначити, що показники титрів антитіл до лептоспір серогрупи *Hebdomadis* були значно вищими за показники інших чотирьох серогруп лептоспір.

За аналізом результатів імунологічних досліджень доведено, що доза 3 см³ для щеплення великої рогатої худоби старше року не забезпечувала формування імунітету високої напруженості і показники титрів антитіл в РМА були значно

нижчими за аналогічні показники у тварин, імунізованих вакциною ВДНКІ, взятою за контроль.

У результаті проведених досліджень було визначено оптимальні дози створеної вакцини проти лептоспірозу, які забезпечують імунітет максимальної напруженості та тривалості. Дози становлять: для великої рогатої худоби віком до 1 року – 3 см³, для великої рогатої худоби віком 1 рік та більше – 5 см³.

ВИЗНАЧЕННЯ НАПРУЖЕНОСТІ ТА ТРИВАЛОСТІ ІМУНІТЕТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

За даними провідних вчених, котрі займаються вивченням лептоспірозу, основним критерієм напруженості та тривалості імунітету за лептоспірозу є рівень превентивної активності сироватки крові вакцинованих тварин. Так вакцина забезпечує свою захисну дію, якщо сироватка крові вакцинованих тварин захищає від зараження не менш ніж 40 % золотистих хом'яків, заражених 10 напівлетальними дозами (LD_{50}).

З метою вивчення напруженості та тривалості імунітету великої рогатої худоби за застосування експериментального зразка вакцини, було проведено вивчення превентивної активності сироватки щеплених тварин.

Превентивну активність вакцини визначали на 10 гол. великої рогатої худоби віком старше одного року (від 14 місяців до 3 років) та 10 гол. худоби віком до одного року (від 6 до 11 місяців). Тваринам вакцину вводили внутрішньом'язово у дозах, які було визначено у попередніх дослідженнях (велика рогата худоба старше одного року – 5 см³, тварини до року – 3 см³).

Згодом, після проведення профілактичного щеплення, у дослідних тварин відбирали проби крові та отримували сироватку. Результати визначення превентивної активності сироватки крові великої рогатої худоби вивчали в досліді на золотистих хом'яках (табл. 6).

Таблиця 6

Превентивна активність сироватки крові великої рогатої худоби вакцинованої експериментальною серією вакцини проти лептоспірозу, $n=10$

Вікова група тварин	Доза вакцини	Превентивна активність сироватки крові великої рогатої худоби, діб після вакцинації (% захисту хом'яків)					
		До щеплення	14 доба	21 доба	60 діб	90 діб	180 діб
До року	3 см ³	0	20	50	90	100	60
Старше року	5 см ³	0	30	60	100	100	80

Як видно з матеріалів таблиці 6, превентивна активність сироватки крові великої рогатої худоби старше року була дещо більшою ніж у тварин до року, але динаміка її утворення була однаковою у тварин обох вікових груп. Сироватка крові великої рогатої худоби на 14 добу після щеплення захищає від загибелі 20–30 % хом'яків, через 21 добу – 50–60 %, через 60 діб – 90–100 %, через 90 діб – 100 %, через 180 діб – 60–80 %.

Встановлено, що щеплення дослідної великої рогатої худоби (обох вікових груп) експериментальним зразком вакцини у дозах 3 та 5 см³ спричинює формування імунітету високої напруженості, тривалістю понад 180 діб.

ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАКЦИНИ У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

Наступним етапом досліджень було проведення дослідження імуногенності створеного імунобіологічного препарату у виробничих умовах на сприйнятливих тваринах – великій рогатій худобі.

Антигенні властивості вакцини визначали на 30 гол. великої рогатої худоби віком старше одного року та 30 гол. телят віком до одного року (віком від 8 до 11 місяців). Тваринам старше одного року вводили вакцину внутрішньом'язово у дозі 5 см³, тваринам до року – в дозі 3 см³ також внутрішньом'язово.

Після щеплення у тварин обох вікових груп не спостерігали побічних реакцій загального (підвищення температури, анафілаксії, зміни поведінки) та місцевого характеру.

Тричі, на 14, 21 та 60 добу після щеплення, у дослідних тварин відбирали кров. У сироватці крові імунізованої великої рогатої худоби визначали титри антитіл за допомогою РМА. Під час постановки реакції використовували шість вакцинних штамів лептоспир, з яких було виготовлено вакцину.

Щеплення великої рогатої худоби вакциною експериментальної серії забезпечувало появу у сироватці крові специфічних антитіл у 93,3 % тварин віком понад один рік (28 голів) та у 90 % (27 голів) – тварин віком до одного року (табл. 7 та 8).

Таблиця 7

**Динаміка титрів антитіл у РМА щодо лептоспир різних серогруп
у сироватці крові вакцинованої великої рогатої худоби
віком до одного року (доза 3 см³), $M \pm m$, $n=27$**

Серогрупа	Титр антитіл, по днях після вакцинації		
	14 доба	21 доба	60 діб
<i>Sejroe (polonica)</i>	322,2±63,6*	325,9±67,0	88,0±12,3 ^Δ
<i>Sejroe (hardjo)</i>	218,5±33,7*	292,6±52,3	69,4±12,6 ^Δ
<i>Hebdomadis</i>	359,3±68,5*	353,7±71,0	96,3±20,2 ^Δ
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	411,1±72,2*	403,7±61,3	113,0±18,9 ^Δ
<i>Grippotyphosa</i>	188,9±30,6*	174,1±26,0	63,9±12,0 ^Δ
<i>Tarassovi</i>	177,8±34,4*	187,0±36,6	63,0±12,3 ^Δ
Середній титр	279,6±35,3*	289,5±30,4	82,3±7,0 ^Δ

Примітки: * – різниця достовірна відносно початку дослідження за $p \leq 0,001$;
^Δ – різниця достовірна відносно 21 доби дослідження за $p \leq 0,001$.

**Динаміка титрів антитіл у РМА щодо лептоспир різних серогруп
у сироватці крові вакцинованої великої рогатої худоби
віком понад один рік (доза 5 см³), $M \pm m$, $n=28$**

Серогрупа	Титр антитіл, по днях після вакцинації		
	14 доба	21 доба	60 діб
<i>Sejroe (polonica)</i>	396,4±61,6*	389,3±65,2	97,3±13,5 ^Δ
<i>Sejroe (hardjo)</i>	271,4±49,9*	360,7±55,8	82,1±15,9 ^Δ
<i>Hebdomadis</i>	425,0±67,2*	414,3±57,6	139,3±31,9 ^Δ
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	450,0±94,0*	464,3±70,2	114,3±20,5 ^Δ
<i>Grippotyphosa</i>	210,7±33,9*	164,3±30,7	75,9±15,4 ^Δ
<i>Tarassovi</i>	160,7±23,6*	242,9±49,5	62,5±8,9 ^Δ
Середній титр	319,0±43,7*	339,3±37,8	95,2±9,1 ^Δ

Примітки: * – різниця достовірна відносно початку дослідження за $p \leq 0,001$;
^Δ – різниця достовірна відносно 21 доби дослідження за $p \leq 0,001$.

Аналіз результатів імунологічних досліджень свідчить про те, що створена полівалентна вакцина проти лептоспірозу великої рогатої худоби є високоефективною, адже вона має виражену імуногенність проти серогруп лептоспир, які є основними етіологічними чинниками лептоспірозу цього виду тварин. У великої рогатої худоби обох вікових груп титр антитіл в РМА досягав максимальних показників на 21 добу після вакцинації 1:289,5±30,4 та 1:339,3±37,8, а потім на 60 добу він різко знижувався до 1:82,3±7,0 та 1:95,2±9,1 у великої рогатої худоби відповідно віком до року та корів дійного стада (віком понад один рік). Така динаміка утворення антитіл у відповідь на введення лептоспірозного антигену є стандартною за лептоспірозу, що пов'язано з утворенням різних класів імуноглобулінів.

Виходячи з досвіду застосування полівалентної вакцини ВДНКІ, відомо, що поствакцинальний імунітет необхідної напруженості до зараження лептоспірами зберігається впродовж 6–7 місяців. Показники титрів антитіл, які утворились в сироватці крові великої рогатої худоби у відповідь на введення вакцини (за період двох місяців після введення препарату) орієнтовно такі ж, як і у разі застосування полівалентної вакцини ВДНКІ, і навіть дещо вищі за певними серогрупами. Тому на основі наведених показників можна зробити висновок, що тривалість поствакцинального імунітету до створеної вакцини зберігається не менше 6 місяців.

За аналізом результатів проведених досліджень можемо стверджувати, що створена на базі лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів ІВМ НААН експериментальна серія полівалентної інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин характеризується високою імуногенною активністю та є ефективним засобом профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби.

КОМІСІЙНІ МІЖВІДОМЧІ ВИПРОБУВАННЯ БІОПРЕПАРАТУ «ВАКЦИНА ПРОТИ ЛЕПТОСПИРОЗУ ТВАРИН ПОЛІВАЛЕНТНА (ВАРІАНТ *BOVIS*)»

За результатами комісійних міжвідомчих випробувань «Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)» на відповідність показникам і вимогам нормативної документації було встановлено, що цей препарат відповідає вимогам розробленої науково-технічної документації й придатний до використання. Вакцина зареєстрована в Україні за № ВВ-00661-02-13 від 18 грудня 2013 року.

ВПРОВАДЖЕННЯ ВАКЦИНИ У ВИРОБНИЦТВО

Вакцина введена в промислове виробництво (виробником є ІВМ НААН, ПрАТ «Новогалещинська біофабрика» та Сумська державна біологічна фабрика).

Виробництво біопрепарату «Вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *bovis*)» за нормативною документацією ІВМ НААН здійснюється з 2010 року на ПрАТ «Новогалещинська біофабрика» та Сумській державній біологічній фабриці.

Всі серії вакцини проходять комісійне випробування за показниками якості згідно нормативної документації в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Аналіз використання вакцини показав її ефективність як в Україні, так і за її межами.

Так, нижче представлено дані (рис. 12), які свідчать про об'єм виробництва препарату під авторським науковим контролем.

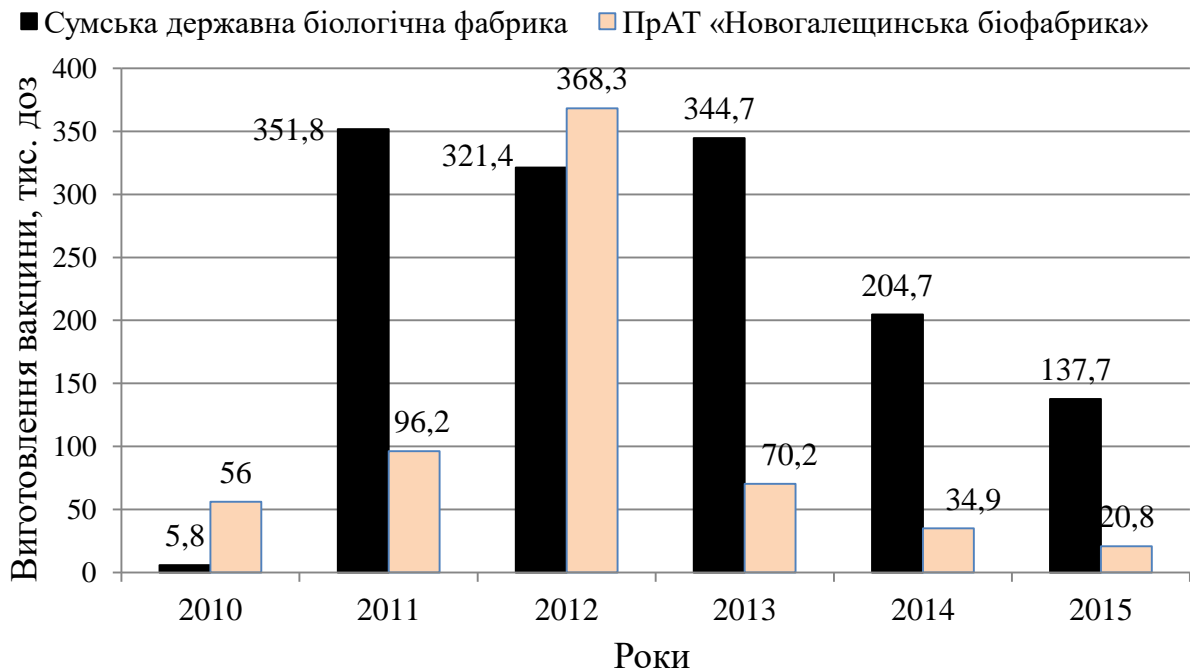


Рис. 12. Обсяги промислового виробництва «Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)»

Всього за період з 2010 по 2015 роки біологічними фабриками України було виготовлено 2012,5 тис. доз вакцини, у тому числі: Сумською державною біологічною фабрикою – 1366,1 тис. доз (2010 р. – 5,8 тис. доз; 2011 р. – 351,8 тис.

доз; 2012 р. – 321,4 тис. доз; 2013 р. – 344,7 тис. доз; 2014 р. – 204,7 тис. доз; 2015 р. – 137,7 тис. доз) та ПрАТ «Новогалещинська біофабрика» – 646,4 тис. доз (2010 р. – 56,0 тис. доз; 2011 р. – 96,2 тис. доз; 2012 р. – 368,3 тис. доз; 2013 р. – 70,2 тис. доз; 2014 р. – 34,9 тис. доз; 2015 р. – 20,8 тис. доз). Виробничі об'єми впровадженого у виробництво вітчизняної біологічної промисловості препарату для специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби повністю забезпечують потреби тваринництва України.

У 2012 році вакцина поставлялась за межі України у Республіку Киргизія в кількості 300 тис. доз, що дало змогу вакцинувати 26 % загального поголів'я великої рогатої худоби цієї країни.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично та експериментально обґрунтовано систему епізоотологічного моніторингу лептоспірозу великої рогатої худоби та вирішено проблему розроблення і удосконалення науково-методичних підходів щодо одержання вітчизняних діагностичних тест-систем та засобів специфічної профілактики хвороби. На основі результатів серопревалентності встановлено поширення лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні, його територіальну приналежність та етіологічну структуру. Розроблено, валідовано та випробувано дві ПЛР-тест-системи для індикації і видової диференціації збудників патогенних лептоспір. Розроблено, випробувано і впроваджено у практику ветеринарної медицини вакцину для специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби.

1. Встановлено, що лептоспіроз серед великої рогатої худоби значно поширений на території України, середня серопревалентність поголів'я за 2005–2014 роки становить 5,8 %. За аналізований період спостерігається тенденція до покращення епізоотичної ситуації.

2. Встановлено, що серогруповий профіль лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні має виражені відмінності як за набором серогруп, так і за їх значенням у сумарній структурі хвороби. Так, домінуючу роль в етіологічній структурі лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні відіграють дві серогрупи лептоспір: *Hebdomadis* – 12,1 % та *Sejroe* – 10,9 %. Позитивні реакції з іншими серогрупами лептоспір спостерігаються значно рідше: *Tarassovi* – 4,5 %; *Icterohaemorrhagiae* – 3,3 %; *Grippotiphosa* – 2,1 %; *Australis* – 2,1 %; *Pomona* – 1,2 %; *Canicola* – 0,9 %. У 62,9 % серопозитивних випадків встановлено реакції одразу з декількома серогрупами лептоспір (змішані реакції), що свідчить про інфікування тварин кількома збудниками або є результатом перехресних імунних реакцій.

3. Встановлено гетерогенність етіологічної структури лептоспірозу великої рогатої худоби в різних областях України, що представлена вісьмома серологічними групами лептоспір. Аналіз епізоотичної ситуації показав, що лептоспіроз перебігає не лише у вигляді моноінфекції (АР Крим, Житомирська, Запорізька, Хмельницька області), реєструють так само поліетіологічні спалахи – до 63,0 % (Миколаївська, Волинська, Івано-Франківська, Рівненська,

Харківська та інші області), що обґрунтовує необхідність дослідження територіальної приналежності серогруп лептоспир в системі профілактичних заходів.

4. На основі результатів статистичного і картографічного аналізу проведено ранжування напруженості епізоотичної ситуації щодо лептоспірозу великої рогатої худоби на території України за 2005–2014 роки. За рівнем напруженості епізоотичної ситуації з лептоспірозу великої рогатої худоби встановлено чотири зони ризику зараження: зона дуже високого ризику (Донецька, Сумська, Миколаївська, Черкаська, Харківська області), зона високого ризику (Вінницька, Одеська, Дніпропетровська, Волинська та Чернігівська області), зона середнього ризику (Полтавська, Херсонська, Житомирська, Київська, Запорізька, Луганська, Рівненська та Тернопільська області) та зона низького ризику (АР Крим, Івано-Франківська, Чернівецька, Хмельницька, Кіровоградська, Львівська та Закарпатська області).

5. Проведено ГІС-аналіз циркуляції основних діагностичних серогруп лептоспир серед поголів'я великої рогатої худоби за 2005–2014 рр. на території України та створено «Карти-схеми лептоспірозу великої рогатої худоби» і «Карти щільності лептоспірозу великої рогатої худоби» до восьми серогруп лептоспир.

6. За результатами серологічних досліджень сироватки крові РМА встановлено циркуляцію лептоспир серовару *hardjo* серед поголів'я великої рогатої худоби. Враховуючи низький рівень перехресного захисту індукованого сероварами лептоспир *hardjo* та *polonica*, які належать до однієї серогрупи *Sejroe*, обґрунтовано необхідність включення серовару *hardjo* до складу вакцин проти лептоспірозу великої рогатої худоби.

7. У результаті проведених гістологічних досліджень внутрішніх органів корів, що загинули від лептоспірозу та внутрішніх органів абортіваних плодів корів хворих на лептоспіроз, встановлено системне ураження клітин ендотелію кровоносних судин та виразні деструктивні зміни в нирках, печінці, легенях і головному мозку.

8. Біоінформативним аналізом консервативних ділянок гена ліпопротеїну зовнішньої мембрани *Lip L 32* патогенних лептоспир виявлено консервативні ділянки, які дозволили провести підбір специфічних праймерів *Lepto F/R*, фланкуючих ділянку розміром 264 п. н., що мають високі показники ПЛР-якості та гібридизуються специфічно з таргетними матрицями ДНК:
Lepto F: 5' - CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT - 3' та *Lepto R*:
 5' - CTCACCGATTTCGCCTGTTGGG - 3'.

9. Розроблено тест-систему індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР з електрофоретичною детекцією. Оптимізовані умови постановки реакції: 40-циклічна ампліфікація з температурою відпалу 55 °С та вмістом іонів Магнію в реакційній суміші на рівні 2,5 мМ/мкл. Встановлено, що діагностична тест-система є специфічною і забезпечує детекцію ДНК патогенних лептоспир в зразках з кількістю 87 геномних одиниць і вище, що відповідає кількості 870 кл/см³ досліджуваної рідини. Валідація тест-системи показала, що вона є чутливою та специфічною, порівняно з закордонним аналогом.

10. Для індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу, було розроблено специфічні праймери *Lip L 32 F/R*, які фланкують ділянку розміром 107 п. н.: *Lip L 32 F*: 5' - CGGATAUGTAAAGCCAGGACAAG - 3' та *Lip L 32 R*: 5' - CGAACTCCCATTTCAGCGATTA - 3' та зонд для детекції ампліфікації, котрий було мічено флуоресцентним барвником *FAM*, на 5' кінці олігонуклеотиду і гасником флуоресценції *BHQ1* – на 3' кінці: *Lip L 32 P*: 5' - FAM-CGGACGGTTTAGTTCGAYGGAAACA-BHQ1 - 3'.

11. Розроблено ПЛР-тест-систему для індикації ДНК патогенних лептоспир у режимі реального часу на основі розроблених праймерів та зонду (*Lip L 32 F*, *Lip L 32 R* та *Lip L 32 P*). Оптимізовано умови постановки реакції: 40-циклічна ампліфікація з температурою відпалу 45 °С та вмістом іонів Магнію в реакційній суміші на рівні 1,5 мМ/мкл. Розроблена діагностична тест-система є специфічною і забезпечує детекцію ДНК патогенних лептоспир в зразках з кількістю 400 клітин в пробі, що відповідає 4000 кл/см³. Валідація створеної тест-системи показала, що вона є чутливою і специфічною, порівняно з закордонною тест-системою.

12. Розроблена технологія промислового виготовлення «Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)» на основі інактивованої фенолом біомаси шести патогенних лептоспир (відібраних за значенням в етіологічній структурі лептоспірозу великої рогатої худоби та селекціонованих за ознаками максимальної імуногенної активності), концентрованої розчином поліетиленгліколю, дозволяє отримувати стерильний, нешкідливий, антигенноактивний та екологічно безпечний для довкілля препарат, який створює імунітет тривалістю 6 місяців.

13. Доведено, що щеплення кролів створеною вакциною призводить до характерних змін у периферійній крові, а саме: на 7 добу розвивається нейтрофільний лейкоцитоз – загальна кількість клітин збільшується на 49 % ($p < 0,001$), нейтрофілів – на 83 % ($p < 0,001$), а на 28 добу з'являється еозинофілія – кількість клітин зросла у 2,3 рази, порівняно із початком експерименту ($p < 0,001$), що є закономірною реакцією організму тварин на введення інактивованого збудника лептоспірозу. Спостерігається також незначне зниження вмісту гемоглобіну на 7,7 % (з $114 \pm 2,9$ до $105 \pm 3,1$ г/л; $p < 0,05$; 7 доба), потім зростання аж до 21 доби ($135 \pm 2,0$ проти $114 \pm 2,8$ г/л у контролі; $p < 0,001$), з поступовим відновленням на 28 добу ($124 \pm 1,6$ г/л), порівняно з тваринами контрольної групи ($113 \pm 2,4$ г/л). Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті протягом 28 діб експерименту вірогідно не змінювався в обох групах тварин і не виходив за межі фізіологічних коливань, що свідчить про доброякісний поствакцинальний процес.

14. Розроблена вакцина характеризується високою імуногенністю для лабораторних тварин (введення вакцини забезпечує високі аглютинаційні титри в сироватці крові щеплених кролів). Найвищі титри антитіл до серогруп лептоспир, в середньому по трьом серіям вакцин, спостерігали до серогруп *Sejroe* (штам 493 *Poland*), *Hebdomadis* та *Icterohaemorrhagiae*, останні становили відповідно $1:760 \pm 152$, $1:693 \pm 137$ та $1:667 \pm 111$. Найменший титр, у відповідь на введення

експериментальних серій вакцин, спостерігали до лептоспир серогруп *Sejroe* (штам *Hardjoprajtno*) – 1:400±67. В усіх кролів, які використовувались для дослідження трьох серій вакцин, титр антитіл до використаних штамів (на які досліджувалась сироватка) був вищим за 1:100.

15. Щеплення великої рогатої худоби визначеними дозами «Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)» (віком до одного року – 3 см³, віком один рік і більше – 5 см³) створює імунітет високої напруженості і тривалості. У великої рогатої худоби віком до року та корів дійного стада (віком понад один рік) титр антитіл досягав максимальних показників на 21 добу після вакцинації – 1:289,5±30,4 та 1:339,3±37,8, а на 60 добу він знижувався відповідно до 1:82,3±7,0 та 1:95,2±9,1, що свідчить про доцільність використання вакцини у системі заходів профілактики лептоспірозу.

16. Розроблено «Інструкцію по виготовленню і контролю Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)», що впроваджена у промислове виробництво на Сумській державній біологічній фабриці та ПрАТ «Новогаleshинська біофабрика». За період з 2010 по 2015 роки, біологічними фабриками України виготовлено 2012,5 тис. доз вакцини.

17. Розроблена «Вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *bovis*)» і запропоновані науково-обґрунтовані пропозиції, включено до «Інструкції щодо діагностики, профілактики та оздоровлення від лептоспірозу» дозволять ефективно управляти епізоотичним процесом і профілакувати лептоспіроз великої рогатої худоби в межах епізоотичних вогнищ неблагополучних територій, регіонів, країн.

18. Розроблено систему епізоотологічного моніторингу лептоспірозу, яка включає в себе: аналіз епізоотичної ситуації, геоінформаційний аналіз поширення хвороби серед поголів'я великої рогатої худоби з визначенням пріоритетних зон ризику зараження, аналізу етіологічної структури збудника, серологічних й молекулярно-генетичних досліджень, аналізу протиепізоотичних заходів. Створена система дозволить забезпечити ефективне функціонування галузі скотарства з урахуванням ландшафтно-географічних та природньо-кліматичних умов в Україні.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Отримані результати з вивчення розповсюдження лептоспірозу великої рогатої худоби на території України, висвітлені у науковій брошурі «Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти лептоспірозу в Україні» (затверджено Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25.12.2014 р.), доцільно використовувати у навчальному процесі під час читання лекцій з курсу «Епізоотологія та інфекційні хвороби».

2. Для діагностики лептоспірозу великої рогатої худоби запропоновано використання цілого ряду мікроморфологічних ознак патологічних змін в органах корів та у абортіваних плодів корів з підозрою на це захворювання.

3. Для проведення індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР з електрофоретичною детекцією пропонуються «Методичні рекомендації щодо

індикації ДНК патогенних лептоспир за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» (затверджено Науково-технічною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 19.12.2013 р.).

4. Під час здійснення індикації ДНК патогенних лептоспир методом ПЛР у режимі реального часу пропонуються методичні рекомендації «Застосування полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспир» (затверджено методичною комісією та вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 5 від 19.03.2015 р.).

5. Для виготовлення вакцин проти лептоспірозу великої рогатої худоби рекомендуються патогенні лептоспири штаму *Hardjoprajtno*, серовару *hardjo*, серогрупи *Sejroe* (патент на корисну модель № 93374 від 25.09.2014 р.).

6. Для проведення специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні рекомендуємо застосовувати біопрепарат «Вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *bovis*)» (Реєстраційне посвідчення № ВВ-00661-02-13, від 18.12.2013 р.).

7. Для промислового виготовлення вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби рекомендуємо використовувати «Інструкцію по виготовленню і контролю Вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*)».

8. З метою оздоровлення тварин від лептоспірозу запропоновано проект «Інструкція щодо діагностики, профілактики та оздоровлення від лептоспірозу» (схвалено та взято за основу на засіданні Науково-методичної ради Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України 15 квітня 2015 р.).

Виробничі об'єми впровадженого у виробництво вітчизняної біологічної промисловості препарату для специфічної профілактики лептоспірозу великої рогатої худоби повністю забезпечують потреби тваринництва України.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукова брошура

1. Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти лептоспірозу в Україні. Наукова брошура / [Мандигра М. С., Ничик С. А., Уховський В. В., Алексеєва Г. Б., Кучерявенко О. О., Задорожна В. І., Протас С. В., Гопко Н. В., Рубан О. М.]. – Київ: Видавничий центр «Принт-центр», 2014. – 46 с. (Затверджено і прийнято до впровадження Науково-технічною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25.12.2014 р. Здобувач є співавтором розділів 1–3).

Статті у наукових фахових виданнях України:

2. Засоби специфічної профілактики лептоспірозу тварин в Україні / [Піотрович В. А., Кучерявенко О. О., Кучерявенко О. О., Уховський В. В.] // Ветеринарна медицина України. – 2008. – № 8. – С. 39–42. (Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів, формуванні висновків та написанні статті).

3. Уховський В. В. Епізоотолого-географічна характеристика лептоспірозу ВРХ на території України / В. В. Уховський // Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних

препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. – 2010. – Вип. 11. – № 2–3. – С. 263–268.

4. Уховський В. В. Розробка нового твердого живильного середовища для культивування лептоспир / В. В. Уховський // Ветеринарна біотехнологія. – 2010. – № 17. – С. 232–237.

5. Уховський В. В. Визначення сорбційних властивостей хітозану по відношенню до лептоспир / **В. В. Уховський**, Ю. С. Голуб, О. І. Албулов // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 20. – С. 197–201. *(Здобувач провів мікробіологічні дослідження, узагальнив результати і підготував статтю до друку).*

6. Голуб Ю. С. Екологічний маркетинг. Визначення бактерицидної та ростостимулюючої активності водорозчинних серій хітозану до патогенних лептоспир / Ю. С. Голуб, **В. В. Уховський**, О. І. Албулов // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 21. – С. 110–113. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні мікробіологічних досліджень, аналізі результатів досліджень та написанні статті).*

7. Уховський В. В. Порівняльна характеристика сучасних методів лабораторної діагностики лептоспірозу С/Г тварин та перспектива розробки ДОТ-ІФА з метою її удосконалення / **В. В. Уховський**, О. О. Кучерявенко, А. В. Пискун // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 23. – С. 258–259. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих даних та написанні статті).*

8. Уховський В. В. Вивчення імуногенних властивостей експериментальних серій полівалентної вакцини проти лептоспірозу тварин «варіант *bovis*» в лабораторних умовах / В. В. Уховський // Наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Кримський агротехнологічний університет» Ветеринарні науки. – 2013. – Вип. 155. – С. 270–278.

9. Уховський В. В. Патологістологічні зміни в органах корів за лептоспірозу / **В. В. Уховський**, Б. В. Борисевич // Науковий вісник ветеринарної медицини. – 2013. – Вип. 12. – С. 76–80. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, брав безпосередню участь у проведенні гістологічних досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

10. Уховський В. В. Природні вогнища лептоспірозу в Україні / **В. В. Уховський**, О. О. Кучерявенко, О. О. Степна // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 24. – С. 262–265. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих даних та написанні статті).*

11. Уховський В. В. Вивчення імуногенності концентрованої полівалентної вакцини проти лептоспірозу тварин варіант «*bovis*» в виробничих умовах / В. В. Уховський // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 25. – С. 122–125.

12. Розробка протоколу виявлення патогенних лептоспир методом полімеразної ланцюгової реакції / [**Уховський В. В.**, Герілович А. П., Солодянкін О. С., Куликова В. В.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна

медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2014. – № 201. – Ч. 1. – С. 185–191. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми експериментів, брав безпосередню участь у проведенні досліджень та написанні статті).*

13. Analysis of the circulation of pathogens on leptospirosis in cattle in Ukraine using GIS-technology / [Uhovskiy V. V., Alekseeva G. B., Bezymennyu M. V., Kulykova V. V.] // Veterinary biotechnology. – 2015. – № 26. – P. 250–262. *(Здобувач провів статистичний аналіз даних серологічних досліджень, сформував висновки та приймав безпосередню участь у написанні статті).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

14. Уховський В. В. Виявлення антитіл проти *L. interrogans* серовару *hardjo* у великої рогатої худоби на території України / В. В. Уховський, А. В. Пискун // Тваринництво України. – 2014. – № 6. – С. 22–25. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні серологічних досліджень, провів аналіз отриманих даних, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

15. Уховський В. В. Мікроскопічні зміни в органах плодів корів абортіваних при лептоспірози / В. В. Уховський, Б. В. Борисевич // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». – 2014. – Вип. 6 (35). – С. 125–131. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, брав безпосередню участь у проведенні гістологічних досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

16. Уховський В. В. Лейкоцитограма кролів за внутрішньом'язового введення інактивованої полівалентної вакцини проти лептоспірозу ВРХ / В. В. Уховський, А. В. Розумнюк, В. В. Недосеков // Тваринництво України. – 2014. – № 11. – С. 23–27. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання робочої схеми експериментів, брав безпосередню участь у проведенні досліджень та написанні статті).*

17. Уховський В. В. Визначення оптимальної імунізуючої дози концентрованої полівалентної інактивованої вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби: [електронний ресурс] / В. В. Уховський // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2015. – № 2 (51). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_2/22.pdf.

18. Полімеразна ланцюгова реакція для виявлення ДНК патогенних лептоспір / [Уховський В. В., Музикіна Л. М., Галка І. В., Спиридонов В. Г.] // Тваринництво України. – 2015. – № 3. – С. 25–31. *(Здобувачу належить ідея, яка покладена в основу статті, брав безпосередню участь у проведенні досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

Статті у наукових виданнях інших держав:

19. Уховский В. В. Этилогическая структура лептоспироза крупного рогатого скота в хозяйствах Украины / В. В. Уховский // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2013. – № 2. – С. 8–13.

20. Изучение физико-химических и иммунобиологических показателей поливалентной вакцины против лептоспироза крупного рогатого скота / [Уховский В. В., Пиотрович В. А., Кучерявенко О. О., Алексеева Г. Б.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2014. – № 1. – С. 22–26. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів, формуванні висновків і написанні статті).*

21. Prevalence and dynamics of the etiological structure of leptospirosis in cattle in Ukraine / [Ukhovskiy V. V., Kucheryavenko O. O., Kulykova V. V., Alekseeva G. B., Gerilovych A. P., Nedosekov V. V., Potkonja A.] // Veterinarski glasnik, časopis fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. – 2014. – № 68 (1–2). – Р. 23–30. *(Здобувачу належить ідея, яка покладена в основу статті, брав безпосередню участь у проведенні досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

22. Microscopic changes in the kidneys of cows infected with Leptospira spp. / [Ukhovskiy V., Borisevich B., Kulykova V., Zmudzki J., Jabłoński A.] // Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. – 2014. – Vol. 58. – № 4. – Р. 517–520. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, брав безпосередню участь у проведенні гістологічних досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

Стаття в іншому науковому виданні

23. Кучерявенко О. О. Науково-дослідний референс-центр з питань вивчення та профілактики лептоспірозу в Україні / О. О. Кучерявенко, **В. В. Уховський**, В. В. Куликова // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 9 (199). – С. 13–14. *(Здобувач провів дослідження та аналіз отриманих даних, підготував статтю до друку).*

Навчальний посібник

24. Недосєков В. В. Лептоспіроз сільськогосподарських тварин / В. В. Недосєков, **В. В. Уховський**, О. О. Кучерявенко // Навчальний посібник до лекційного курсу з дисципліни епізоотологія та інфекційні хвороби. – Київ, 2011. – 140 с. – *Рекомендовано вченою радою ННІ ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції тваринництва, протокол № 1 від 27.10.2011 р. (Дисертант опрацював матеріал та підготував його до друку).*

Патенти:

25. Пат. U201200648 Україна, МПК А61К 39/02 (2006.01) С12N 5/00 (2006.01). Вакцина проти лептоспірозу тварин полівалентна (варіант *bovis*) / **Уховський В. В.**, Кучерявенко О. О., Піотрович В. А., Кісіленко Л. С., Мужичський Я. В., Дяченко Г. В.; заявник та патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН. – № 73324; заявл. 20.01.2012; опубл. 25.09.2012, Бюл. № 18. – 5 с. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

26. Пат. U201404858 Україна, МПК С12N 1/20 (2006.01). Штам бактерій *Leptospira interrogans Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo* для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин та діагностикумів / **Уховський В. В.**, Пискун А. В., Кучерявенко О. О.,

Дяченко Г. В., Куликова В. В., Степна О. О.; заявник та патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН. – № 93374; заявл. 07.05.2014; опубл. 25.09.2014, Бюл. № 18. – 4 с. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

27. Пат. U201405849 Україна, МПК (2014.01) C12N 1/00. Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води / **Уховський В. В.**, Куликова В. В., Кучерявенко О. О., Пискун А. В., Скалига М. Л.; заявник та патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН. – № 94104; заявл. 30.05.2014; опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20. – 4 с. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

28. Пат. U201503071 Україна, МПК C07K 14/20 (2006.01). Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу / **Уховський В. В.**, Куликова В. В., Кучерявенко О. О.; заявник та патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН. – № 101190; заявл. 03.04.2015; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16. – 5 с. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

Методичні рекомендації:

29. Методичні рекомендації щодо індикації ДНК патогенних лептоспір за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / **[Уховський В. В., Кучерявенко О. О., Куликова В. В., Герілович А. П., Солодянкін О. С., Пискун А. В., Скалига М. Л.]**. – Ніжин: ПП Лисенко М. М., 2014. – 16 с. *(Затверджено Науково-технічною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 19.12.2013 р. Здобувачу належить ідея, яка покладена в основу розробки, участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні рекомендацій).*

30. Романішина О. О. Методичні рекомендації з профілактики та оздоровлення сільськогосподарських тварин в умовах Миколаївської області / О. О. Романішина, М. С. Мандигра, **В. В. Уховський** – Миколаїв: ПП Коваленко А. Г., 2014. – 18 с. *(Затверджено та рекомендовано до друку головним управлінням ветеринарної медицини у Миколаївській області, протокол № 6 від 4.09.2013 р. Здобувач брав участь у підготовці та написанні чотирьох розділів рекомендацій).*

31. Застосування полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для детекції ДНК патогенних лептоспір. Методичні рекомендації / **[Уховський В. В., Музикіна Л. М., Кучерявенко О. О., Куликова В. В., Галка І. В., Спиридонов В. Г., Пискун А. В., Степна О. О.]**. – Київ: ЦП «Компринт», 2015. – 16 с. *(Затверджено методичною комісією та вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 5 від 19.03.2015 р. Здобувачу належить ідея, яка покладена в основу розробки, участь у проведенні досліджень, підготовка та написання рекомендацій).*

Тези наукових доповідей:

32. Піотрович В. А. Випробування вакцини проти лептоспірозу тварин полівалентної (варіант *bovis*) / В. А. Піотрович, О. О. Кучерявенко, **В. В. Уховський** // IX Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини, 6–8 жовтня 2011 р.: тези доповіді. – Київ, 2011. – С. 136–138. *(Здобувач брав участь у проведенні досліджень, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

33. Skrypnyk V. G. Seromonitoring of leptospirosis amongst bovine and swine in Ukraine / V. G. Skrypnyk, **V. V. Ukhovsky**, A. A. Kucheryavenko // 14th International Conference Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine, 25–29 Aug. 2013, Johannesburg, South Africa. – Johannesburg, 2013. – P. 59–60. *(Здобувач провів серомоніторинг лептоспірозу великої рогатої худоби, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

34. Nychyk Serhiy Research of immunogenicity of experimental series of polyvalent vaccine against leptospirosis in bovine using laboratory animals / Serhiy Nychyk, **Vitalii Ukhovskyi**, Oleksandr Kucheriavenko // 62nd American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting, Nov. 13–17, 2013, Washington. – Washington, 2013. – P. 424. *(Здобувач провів імунологічні дослідження, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

35. Ukhovskyi V. Study of immunogenic activity of polyvalent vaccine against bovine cattle leptospirosis / **V. Ukhovskyi**, A. Kucheriavenko, S. Nychyk // 2014 American Society of Microbiology Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, Jan. 27–29, 2014, Washington. – Washington, 2014. – P. 219. *(Здобувач провів імунологічні дослідження, узагальнив результати і підготував роботу до друку).*

36. Уховський В. В. Виявлення антитіл проти *L. Interrogans* серовару hardjo у великої рогатої худоби на території України / **В. В. Уховський**, А. В. Пискун // Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології: науково-практична конференція молодих вчених, 26 червня 2014 р.: тези доповіді. – Київ, 2014. – С. 49–51. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні серологічних досліджень, аналізі отриманих даних, формуванні висновків та підготовці роботи до друку).*

37. Serological monitoring of leptospirosis in the population of wild boars killed in the territory of Ukraine / [**Ukhovskyi V.**, Nychyk S., Sytiuk M., Kulykova V., Polupan I., Stepna O.] // International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Oct. 31–Nov. 3, 2014. Vienna, Austria. – Vienna, 2014. – P. 159. *(Здобувач брав безпосередню участь у проведенні серологічних досліджень, аналізі отриманих даних, та написанні тез).*

38. Уховський В. В. Розробка методики полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для виявлення ДНК патогенних лептоспір / **В. В. Уховський** // Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених, 24 червня 2015 р.: тези доповіді. – Київ, 2015. – С. 74–76.

АНОТАЦІЯ

Уховський В. В. Лептоспіроз великої рогатої худоби в Україні (епізоотологічний моніторинг, діагностика та специфічна профілактика). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена вивченню епізоотичної ситуації щодо лептоспірозу великої рогатої худоби в Україні, розробленню та вдосконаленню системи засобів діагностики і специфічної профілактики захворювання.

На основі проведених досліджень визначено рівень поширення лептоспірозної інфекції серед поголів'я великої рогатої худоби та встановлено етіологічну структуру збудників захворювання. Вперше проведено епізоотологічне районування території України та складено карту напруженості епізоотичної ситуації лептоспірозу великої рогатої худоби. Встановлено, що епізоотична ситуація з лептоспірозу великої рогатої худоби в різних областях України не одноманітна і має свої особливості як за кількістю випадків зараження, так і за кількістю збудників лептоспірозу.

У результаті епізоотологічного моніторингу шести областей України, встановлено циркуляцію лептоспір серовару *hardjo* серед поголів'я великої рогатої худоби.

Встановлено, що у корів під час лептоспірозу внаслідок дії токсинів збудника хвороби виникають виразні деструктивні зміни в нирках, печінці, легенях і головному мозку, а також системне ураження клітин ендотелію кровоносних судин. Смерть тварин настає в результаті розвитку синдрому токсичного шоку, який виникає як внаслідок дії токсинів лептоспір, так і внаслідок розвитку ниркової недостатності.

Уперше в Україні розроблено дві ПЛР-тест-системи: тест-система для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та тест-система для індикації ДНК патогенних лептоспір методом ПЛР у режимі реального часу.

В роботі теоретично обґрунтовано необхідність розроблення вітчизняної вакцини проти лептоспірозу великої рогатої худоби з урахуванням етіологічної структури захворювання, яка склалась останнім часом і розроблено «Вакцину проти лептоспірозу тварин полівалентну (варіант *bovis*)». Вивчено вплив інактивованої вакцини проти лептоспірозу на показники еритропоезу та лейкопоезу периферійної крові кролів. Визначено оптимальну імунізуючу дозу вакцини та рівень антитіл до серогруп лептоспір у сироватці крові щеплених тварин. Проведено дослідження щодо імуногенності створеної вакцини в лабораторних та виробничих умовах. Розроблено нормативну документацію на вакцину та проведено її комісійні випробування.

Ключові слова: лептоспіроз великої рогатої худоби, лептоспіра, етіологічна структура, серогрупа, штам, антитіла, реакція мікроаглотинації,

діагностика, гістологічні зміни, полімеразна ланцюгова реакція, вакцина, імуногенність.

АННОТАЦІЯ

Уховский В. В. Лептоспироз крупного рогатого скота в Украине (эпизоотологический мониторинг, диагностика и специфическая профилактика). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению эпизоотической ситуации по лептоспирозу крупного рогатого скота в Украине, разработке и совершенствованию системы средств диагностики и специфической профилактики заболевания.

На основе проведенных исследований определен уровень распространения лептоспирозной инфекции среди поголовья крупного рогатого скота и установлена этиологическая структура лептоспироза. Впервые проведено эпизоотологическое районирование территории Украины и составлена карта напряженности эпизоотической ситуации по лептоспирозу крупного рогатого скота. Установлено, что лептоспироз среди крупного рогатого скота значительно распространен на территории Украины, средняя серопревалентность поголовья за 10 лет (2005–2014) составляет 5,8 %. За анализируемый период наблюдается тенденция к улучшению эпизоотической ситуации. Определено, что серогрупповой профиль лептоспироза крупного рогатого скота в Украине имеет выраженные различия как по набору серогрупп, так и по их значению в суммарной патологии заболевания. Доминирующими серогруппами лептоспир, которые циркулируют среди поголовья крупного рогатого скота на территории Украины, являются: *Hebdomadis* – 12,1 % и *Sejroe* – 10,9 %. Положительные реакции с другими серогруппами лептоспир наблюдаются значительно реже: *Tarassovi* – 4,5 %; *Icterohaemorrhagiae* – 3,3 %; *Grippotiphosa* – 2,1 %; *Australis* – 2,1 %; *Pomona* – 1,2 %; *Canicola* – 0,9 %. У 62,9 % серопозитивных случаев установлены положительные реакции сразу с несколькими серогруппами лептоспир (смешанные реакции), что свидетельствует об инфицировании животных несколькими возбудителями или является результатом перекрестных иммунных реакций.

В результате мониторинга шести областей Украины установлено циркуляцию лептоспир серовара *hardjo* среди поголовья крупного рогатого скота. Учитывая низкий уровень перекрестной защиты индуцированной сероварами лептоспир *hardjo* и *polonica*, которые относятся к одной серогруппе *Sejroe*, обоснована необходимость введения серовара *hardjo* в состав вакцин против лептоспироза крупного рогатого скота.

Установлено, что у коров при лептоспирозе в результате действия токсинов возбудителя болезни возникают отчетливые деструктивные изменения в почках, печени, легких и головном мозге, а также системное поражение клеток эндотелия

кровеносных сосудов. Смерть животных наступает в результате развития синдрома токсического шока, который возникает как в результате действия токсинов лептоспир, так и вследствие развития почечной недостаточности.

С помощью биоинформационного анализа консервативных участков гена липопротейна внешней мембраны (*Lip L 32*) патогенных лептоспир, обнаружены консервативные участки, которые позволили провести подбор специфических праймеров *Lepto F/R*, фланкирующих участок размером 264 п. н., которые имеют высокие показатели ПЦР-качества и гибридизируются специфически с целевыми матрицами ДНК:

<i>Lepto F:</i>	<i>5' - CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT - 3'</i>
<i>Lepto R:</i>	<i>5' - CTCACCGATTTTCGCCTGTTGGG - 3'</i>

Разработана тест-система индикации ДНК патогенных лептоспир методом ПЦР с электрофоретической детекцией. Оптимизированы условия постановки реакции: 40-циклическая амплификация с температурой отжига 55 °С и содержанием ионов магния в реакционной смеси на уровне 2,5 мМ/мкл. Разработанная диагностическая тест-система является специфической, точной и обеспечивает детекцию ДНК патогенных лептоспир в образцах с количеством 87 геномных единиц и выше, что соответствует количеству 870 клеток/см³ исследуемой жидкости. Валидация тест-системы показала, что она является чувствительной и специфической по сравнению с зарубежным аналогом.

С целью индикации ДНК патогенных лептоспир методом ПЦР в режиме реального времени были разработаны специфические праймеры *Lip L 32 F/R*, которые фланкируют участок размером 107 п. н.: *Lip L 32 F:* *5' - CGGATAUGTAAAGCCAGGACAAG - 3'* и *Lip L 32 R:* *5' - CGAACTCCCATTTCAGCGATTA - 3'* и зонд для обнаружения амплификации, который был мечен флуоресцентным красителем *FAM*, на 5' конце олигонуклеотида, и гасителем флуоресценции *BHQ1* – на 3' конце: *Lip L 32 P:* *5' - FAM-CGGACGGTTTAGTTCGAYGGAAACA-BHQ1 - 3'*.

Созданная ПЦР-тест-система для индикации ДНК патогенных лептоспир в режиме реального времени на основе разработанных праймеров и зонда (*Lip L 32 F*, *Lip L 32 R* та *Lip L 32 P*). Оптимизированы условия постановки реакции: 40-циклическая амплификация с температурой отжига 45 °С и содержанием ионов Магния в реакционной смеси на уровне 1,5 мМ/мкл. Разработанная диагностическая тест-система является специфической, точной и обеспечивает детекцию ДНК патогенных лептоспир в образцах с количеством 400 клеток в пробе, что соответствует 4000 кл/см³. Валидация созданной тест-системы показала, что она является чувствительной и специфической по сравнению с зарубежной тест-системой.

В работе теоретически обоснована необходимость разработки отечественной вакцины против лептоспироза крупного рогатого скота с учетом этиологической структуры заболевания, которая сложилась в последнее время и разработана «Вакцина против лептоспироза животных поливалентная (вариант *bovis*)». Изучено влияние инактивированной вакцины против лептоспироза на показатели эритроцитопоеза (количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците,

гематокритная величина) и лейкоцитопоза (общее количество лейкоцитов, и процентное соотношение их отдельных форм (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы)) периферической крови кроликов. Определена оптимальная иммунизирующая доза вакцины и уровень антител к серогруппам лептоспир в сыворотке крови привитых животных. Проведено исследование иммуногенности созданной вакцины в лабораторных и производственных условиях. Разработана нормативная документация на вакцину и проведены ее комиссионные испытания.

Ключевые слова: лептоспироз крупного рогатого скота, лептоспира, этиологическая структура, серогруппа, штамм, антитела, реакция микроагглютинации, диагностика, гистологические изменения, полимеразная цепная реакция, вакцина, иммуногенность.

ANNOTATION

Ukhovskiy V. V. Leptospirosis in cattle in Ukraine (epizootological monitoring, diagnostics and specific prevention). – Manuscript.

The thesis is for the degree of doctor of veterinary sciences for specialty 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the study of the epizootic situation on leptospirosis among cattle in Ukraine, creation, development and improvement of diagnostic tools and disease specific prevention.

On the basis of the studies the prevalence of leptospirosis infection among cattle was determined and etiological structure of causative agents of disease was established. For the first time epizootic zoning of Ukraine was created and a map tension epizootic situation of leptospirosis in cattle was presented. It was established that the epizootic situation on leptospirosis in cattle in different regions of Ukraine is not monotonous and has the features, both on the number of cases of infection and also the number of pathogens of leptospirosis.

As a result of six regions' monitoring of Ukraine, circulation of leptospira serovar *hardjo* among cattle was established.

It were established that the cows with leptospirosis infection as a result of the toxins causative agent acting expressive destructive changes occur in the kidneys, liver, lungs and brain, as well as systematic destruction of endothelial cells of blood vessels. The death of animals occurs as a result of toxic shock syndrome, which occurs as a result of leptospira toxins, and because of kidneys' failure.

For the first time in Ukraine two PCR test-systems were developed: test- system for indicating DNA of pathogenic leptospira by PCR with electrophoretic detection results of research and test-system for indicating pathogenic leptospira DNA by Real-time PCR.

The paper theoretically proved the need to develop domestic vaccine against leptospirosis in cattle considering etiological patterns of disease that has developed in recent years and it was created «The polyvalent vaccine against leptospirosis of animals (variant *bovis*)». The effect of inactivated vaccine against leptospirosis was studied on parameters of erytrotsytopoesis and leukotsytopoesis in peripheral blood of rabbits.

The optimum immunizing dose of vaccine and the level of antibodies to serogroup leptospira in the blood serum of vaccinated animals were established. The study on immunogenicity of the developed vaccine in the laboratory and production conditions was conducted. The normative documentation on vaccine was created and commission tests were conducted.

Key words: leptospirosis in cattle, leptospira, etiological structure, serogroup, straine, antyodies, microagglutination test, diagnostics, histological changes, polymerase chaine reaction, vaccine, immunogenicity.

