

Conclusions. Thus, the mycological researches have established a set of micromycetes that contaminate wheat grain from different physical and geographical regions. The difference in the contamination of grain with the fungi of the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* is detected, depending on the region of its cultivation. Mycotoxicological studies in the grains revealed the producers of T-2, F-2 toxins, DON, moniliformin, fumonisin B1, coev, aspergil, and penicillic acids. This information can be used to objectively assess the quality of grain products. In order to control the safety of grown crops, it is necessary to continuously monitor their contamination with mycotoxins and toxigenic micromycetes.

Key words: deoxynivalenol, DON, *Fusarium*, toxin, F-2, T-2, TTMT, fumonisin B1, kioic acid, aspergic acid, penicilic acid.

Надійшла 15.05.2017 р.

УДК 636.09:616:615.371

ПІНЧУК Н.Г., канд. вет. наук

nat_pinchuk@mail.ru

ГОЛОВКО А.М., д-р вет. наук, академік НААН

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

КОЛЕСНИКОВА К.Ю., канд. вет. наук

Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТЕСТУ ЗАРАЖЕННЯ СВИНЕЙ ШТАМАМИ *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

Висвітлено переваги і недоліки різних методів зараження свиней збудником *Er. rhusiopathiae* та проведено дослідження із встановлення еталонного методу для тесту зараження свиней за контролювання якості вакцин живих та інактивованих від бешихи свиней за показниками ефективність/імуногенність. Встановлено, що штами *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1a та 2b були патогенними для свиней в дозах $1,0 \times 10^6$ та $2,0 \times 10^7$ КУО/0,1 см³ відповідно і можуть використовуватися як контрольні.

Запропоновані моделі зараження свиней (внутрішньошкірне та скарифікація) можуть бути рекомендовані для здійснення контролювання якості вакцин від бешихи свиней за показниками ефективність/імуногенність згідно з вимогами European Pharmacopoeia 0064 та ДСТУ 6079:2009.

Ключові слова: збудник бешихи свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, імуногенність, ізоляти, патогенність, сероваріанти, штами.

Постановка проблеми. Бешиха свиней (*Swine erysipelas*) – одне з найбільш поширених і небезпечних захворювань, переважно свиней у віці від 3 до 12 місяців [1], яке щорічно спричиняє значні економічні збитки свинарству практично на всіх континентах світу [2].

Основним методом попередження в господарствах як масових спалахів, так і окремих випадків бешихи свиней залишається специфічна імунопрофілактика живими та інактивованими вакцинами, які мають забезпечувати високий рівень захисних антитіл від усіх можливих небезпечних сероваріантів збудника бешихи, серед яких 80 % становлять ізоляти сероварів 1a, 1b та 2b [3].

Вимоги *European Pharmacopoeia 0064* та *ДСТУ 6079:2009* щодо контролювання якості вакцин від бешихи свиней за показниками ефективність/імуногенність передбачають проведення дослідження на тваринах цільових видів з їх подальшим, через рекомендований термін після вакцинації, контрольним зараженням патогенними для свиней сероваріантами *Er. rhusiopathiae* [4–5].

Аналіз основних досліджень і публікацій. Тест зараження свиней має імітувати, наскільки це можливо, природні шляхи інфікування [6]. Для цього тесту описані різні методи з різними шляхами введення збудника захворювання (скарифікація, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньошкірний, оральний та в кон'юнктиву), що створює значні труднощі в оцінюванні результатів досліджень при контролюванні якості вакцин живих та інактивованих від бешихи свиней за показниками ефективність/імуногенність [6–7] (табл. 1).

Використання різних моделей зараження і різних за патогенністю штамів *Er. rhusiopathiae* є причиною виникнення різних клінічних ознак і різного за часом розвитку захворювання свиней на бешиху [7].

Вивчення даного питання відкриває шлях до розробки стандартного тесту зараження свиней, що дозволяє проводити контролювання якості вакцин від бешихи свиней за показниками ефектив-

ність/імуногенність згідно з вимогами *European Pharmacopoeia 0064* та *ДСТУ 6079:2009*. Ці актуальні положення і визначили напрям наших досліджень та методи виконання роботи.

Таблиця 1 – Переваги та недоліки різних методів зараження свиней збудником *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Вимога	Метод зараження свиней					
	внутрішньо-шкірний	скарифікація	внутрішньо-м'язовий	внутрішньо-вентральний	в кон'юнктиву	оральний
1. Природний шлях інфікування	так	так	ні	ні	так	так
2. Можливість використання кількох сероваріантів збудника для зараження	так	так	ні	ні	ні	ні
3. Використання визначеної кількості бактерій	так	важко	так	так	важко	важко
4. Розповсюдження бактерій з місця інокуляції	ні	можливе	ні	ні	так	можливе
5. Можливість оцінювання місцевих уражень шкіри	так	так	ні	ні	важко (інші бактерії можуть бути причиною інфекції кон'юнктиви)	ні
6. Можливість виникнення труднощів за виконання	так	ні	ні	так	так (виникає болочість)	ні

Метою дослідження було встановлення еталонного методу для тесту зараження свиней штамами *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1 та 2.

Матеріал та методика дослідження. 1. Штами для тесту зараження свиней. Матеріалом для тесту зараження слугували штами збудника бешихи свиней, виділені з патологічного матеріалу загинувших свиней (*Er. rhusiopathiae* RS/1 сероваріанта 1а та *Er. rhusiopathiae* RS/2 сероваріанта 2б), які були задепоновані та отримані із НЦШМ ДНКІБШМ.

Штами *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1а та 2б були попередньо досліджені на відповідність паспортним характеристикам, відсутність контамінації сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою і ліофільно висушені в концентраціях не нижче $1,0 \times 10^9$ КУО/см³. Підрахунок кількості живих бактерій/см³ штамів *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1а та 2б у флаконі проводили за загальноприйнятою методикою [5] за 7 днів та за 24 години до проведення тесту зараження свиней. В експерименті в день зараження були використані ліофільно висушені культури *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1а та 2б, розчинені стерильним фізіологічним розчином до концентрацій *Er. rhusiopathiae* RS/1 сероваріанта 1а – $1,0 \times 10^6$ КУО/0,1 см³ та *Er. rhusiopathiae* RS/2 сероваріанта 2б – $2,0 \times 10^7$ КУО/0,1 см³.

2. Тварини та процедура зараження. Дослідження були проведені на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика, м. Херсон, Україна. В експерименті були використані клінічно здорові свині 12-тижневого віку (по 3 голови на кожний метод введення: внутрішньошкірне та скарифікацію, та сероваріанти *Er. rhusiopathiae*, що становило сумарну кількість голів у досліді – 12), вільних від антитіл до збудника бешихи свиней. Дослідним свиням було інокульовано методами внутрішньошкірного введення та скарифікації з латеральної поверхні тіла на межі черевної і грудної стінок культури *Er. rhusiopathiae* RS/1 сероваріанта 1а в дозі $1,0 \times 10^6$ КУО/0,1 см³ та *Er. rhusiopathiae* RS/2 сероваріанта 2б – $2,0 \times 10^7$ КУО/0,1 см³, з контрольним введенням відповідним методом 0,1 см³ стерильного фізіологічного розчину з протилежної сторони тварини. Місця інокуляції на поверхні шкіри тварин були попередньо продезінфіковані та промарковані водостійким маркером. Заражених тварин розташовували ізольовано в окремих станках, забезпечували в достатній кількості питною водою та повноцінними комбікормами відповідно до раціонів. Після зараження свиней щодня протягом періоду спостереження (10 діб) в 9.00 та 17.00 годин надавали клінічному огляду, термометрії та візуальній оцінці шкірного покриву на наявність/відсутність запальних процесів.

Основні результати досліджень. За результатами проведених досліджень встановлено, що у всіх дослідних свиней, заражених штамами *Er. rhusiopathiae*: RS/1 сероваріанта 1а та RS/2 сероваріанта 2б методами внутрішньошкірного зараження та скарифікації були відмічені типові ознаки захворювання свиней на бешиху (табл. 2).

Таблиця 2 – Облік клінічних ознак захворювання свиней на бешиху після зараження штамми *Er. rhusiopathiae* різних сероваріантів

Клінічна ознака захворювання	Метод зараження свиней			
	внутрішньошкірний		скарифікація	
	Штами <i>Er. rhusiopathiae</i> для тесту зараження свиней			
	RS/1	RS/2	RS/1	RS/2
Лише ураження шкіри	-	-	-	-
Лише лихоманка (>40,5 °C)	-	1/3	-	1/3
Ураження шкіри і лихоманка (>40,5 °C)	3/3	2/3	3/3	2/3
Відсутні ознаки захворювання	-	-	-	-

Захворювання у всіх дослідних свиней, заражених штамом *Er. rhusiopathiae* RS/1 сероваріанта 1a починалося в середньому через 24-36 годин після введення збудника бешихи свиней методами внутрішньошкірного зараження та скарифікації і проявлялося раптовим підвищенням температури тіла вище 40,5 °C, яка з розвитком хвороби підвищувалась до 42,0 °C, відмовою від корму, різко вираженим пригніченням. В місцях інюкуляції збудника *Er. rhusiopathiae* RS/1 методами внутрішньошкірного зараження та скарифікації спостерігали запалення шкіри, яке характеризувалося утворенням щільних, гарячих, болісних ділянок, темно-червоного кольору, різних за розміром і формою, які з розвитком патологічного процесу збільшувались в діаметрі (до 5–9 см) та зливалися між собою.

Штам *Er. rhusiopathiae* RS/2 сероваріанта 2b, інюкульований 2 методами, зумовлював у однієї з трьох свиней лише підвищення температури тіла вище 40,5 °C без уражень шкіри, в той час як у інших двох свиней, використаних для кожного тесту, через 36-48 годин після зараження спостерігався небезпечний розвиток хвороби, з раптовим підвищенням температури тіла вище 40,5 °C, відмовою від корму, різко вираженим пригніченням та наявністю щільних, гарячих, болісних ділянок запалення, темно-червоного кольору, іноді з темним некротичним центром, різних за розміром і формою, які в подальшому зливались між собою. Жодна із свиней не мала уражень шкіри за контрольного введення відповідним методом стерильного фізіологічного розчину.

Вважаємо за необхідне відмітити, що за інюкуляції штамів *Er. rhusiopathiae* RS/1 та RS/2 методами внутрішньошкірного введення та скарифікації, нами було отримано практично ідентичний розвиток захворювання у дослідних свиней з однаковими клінічними проявами та часом розвитку хвороби, що свідчить про можливість використання обох методів як еталонних за проведення тесту зараження свиней (табл. 2).

Проте, за оцінювання результатів зараження свиней методом скарифікації, необхідно враховувати можливість виникнення запалення шкіри (у вигляді незначних дерматитів) внаслідок подряпин під час виконання скарифікації.

Висновки. 1. Розвиток типових клінічних ознак захворювання свиней на бешиху є відображенням успішного зараження свиней методами внутрішньошкірного введення та скарифікації.

2. Штами *Er. rhusiopathiae* сероваріантів 1a та 2b були патогенними для свиней в дозах $1,0 \times 10^6$ та $2,0 \times 10^7$ КУО_{0,1} см³ відповідно і можуть використовуватися як контрольні для встановлення якості вакцин живих та інактивованих від бешихи свиней за показниками ефективності/імуногенності.

3. Запропоновані моделі зараження свиней (внутрішньошкірне та скарифікація) можуть бути рекомендовані як еталонні за проведення контролювання якості вакцин від бешихи свиней за показниками ефективності/імуногенності згідно з вимогами *European Pharmacopoeia 0064* та *ДСТУ 6079:2009*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wood R.L. Erysipelas / R.L. Wood. // Iowa State University: Diseases of Swine. – 1992. – P. 475–486.
2. Cussler K. 100 years of erysipelas prophylaxis: significance and reduction of animal experiments / K. Cussler, E. Barks // ALTEX. – 2001. – Vol. 18 (1). – P. 29–33.
3. Wood R.L. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States / R.L. Wood, R. Harrington // Am. J. Vet. Res. – 1979. – Vol. 39 (1). – P. 1833–1840.
4. Swine erysipelas vaccine (Inactivated) / Monograph 04/2013:0064 // European pharmacopoeia. – 2014. – 8th Edition. – P. 1018–1019.
5. ДСТУ 6079:2009. Вакцина жива суха проти бешихи свиней. Технічні умови.

6. Challenge conditions for potency testing of veterinary vaccines / H. H. Lensing, H. L. Oei, L. Visser and J. Woltjes // *Pharmeuropa*. – 1995. – Vol. 7 (4). – P. 594–595.
7. Use of clinical signs in efficacy testing of erysipelas vaccines / Sigrid Johannes, Ute Roskopf-Streicher, Dorothea Hausleithner et al. // *Humane endpoints in animal experiments for biomedical research*. – 1998. – P.102–105.

REFERENCES

1. Wood R.L. (1992). *Erysipelas. Diseases of Swine*, Iowa State University, pp. 475–486.
2. Cussler K., Balks E. (2001). 100 years of erysipelas prophylaxis: significance and reduction of animal experiments. *ALTEX*, vol. 18 (1), pp. 29–33.
3. Wood R.L., Harrington R. (1979). Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, vol. 39 (1), pp. 1833-1840.
4. Swine erysipelas vaccine (Inactivated) / Monograph 04/2013:0064 (2014). *European pharmacopoeia*, 8th Edition., pp. 1018-1019.
5. Veterinary immunobiological preparats. Live dried vaccine against swine erysipelas. Specifications : SSTU 6079:2009 (2010) [Preparaty veterynarni imunobiolohichni. Vaktsyna zhyva sukha proty beshykyh svynei. Tekhnichni umovy. DSTU 6079:2009.], Kiev, State Committee for Standardization of Ukraine, III, 11 p.
6. Lensing H. H., Oei H.L., Visser L. and Woltjes J. (1995). Challenge conditions for potency testing of veterinary vaccines, *Pharmeuropa*, vol. 7 (4), pp. 594-595.
7. Sigrid Johannes, Ute Roskopf-Streicher, Dorothea Hausleithner, Heike Gyra & Klaus Cusslei (1998). Use of clinical signs in efficacy testing of erysipelas vaccines. *Humane endpoints in animal experiments for biomedical research*, pp.102-105.

Стандартизація теста зараження свиней штаммами *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Н.Г. Пинчук, А.Н. Головка, К.Ю. Колесникова

Освещено переваги та недоліки різних методів зараження свиней збудителем *Er. rhusiopathiae* і проведено дослідження встановлення еталонного методу для теста зараження свиней при контролі якості вакцин живих і інактивованих проти рожи свиней по показателям ефективності/імуногенності. Встановлено, що штамми *Er. rhusiopathiae* сероварів 1а і 2б були патогенними для свиней в дозах $1,0 \times 10^6$ і $2,0 \times 10^7$ КОЕ/0,1 см³ відповідно і можуть використовуватися в якості контрольних. Предложені моделі зараження свиней (внутрикожное і скарифікація) можуть бути рекомендовані при проведенні контролю якості вакцин проти рожи свиней по показателям ефективності/імуногенності згідно вимог *European Pharmacopoeia 0064* і *ГСТУ 6079: 2009*.

Ключевые слова: збудитель рожи свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, імуногенність, ізоляти, патогенність, сероваранти, штамми.

Standardization of the pigs with challenge test strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

N. Pinchuk, A. Holovko, K. Kolesnikova

This article describes the advantages and disadvantages of different methods of challenge of pigs with the pathogen *Er. rhusiopathiae* and conducted a study to establish a reference method for the test of challenge of swine in the quality control of live and inactivated vaccines against swine erysipelas on indicators of efficacy/immunogenicity.

Test infected pigs should mimic, to the extent possible, the natural route of infection. For this test, we described different methods with different routes of administration of the causative agent (scarification, intravenous, intramuscular, unotron, oral and conjunctiva), which creates significant difficulties in the assessment of research results for the quality control of live and inactivated vaccines against swine erysipelas on indicators of efficiency/immunogenicity.

Different models of challenge and pathogenicity of different strains of *Er. rhusiopathiae* is the cause of the different clinical signs and different time of development of the swine disease erysipelas.

The study of this question opens the way for the development of a standard test of pigs, challenge which allows the quality control of vaccines against swine erysipelas on indicators of efficiency/immunogenicity according to the requirements of the *European Pharmacopoeia 0064* and *DSTU 6079:2009*. These relevant provisions and determined the choice of directions of our research and methods of performance.

The purpose of this work was to establish a reference method for the test of pigs challenge with strains of *Er. rhusiopathiae* serovars 1 and 2.

1. Strains for the test of challenge the pigs. Material for test of challenge were strains of the causative agent of swine erysipelas isolated from pathological material of dead pigs (*Er. rhusiopathiae* RS/1 serovar 1a and *Er. rhusiopathiae* RS/2 serovar 2b).

2. Animals and procedure of challenge. Studies were conducted at the Kherson state enterprise – biological factory, Kherson, Ukraine. In the experiment, we used clinically healthy pigs 12 weeks of age (3 heads on each input method: intradermal methods and scarification, and serovars *Er. rhusiopathiae*, which was the total number of pigs in the experiment – 12), free from antibodies to the causative agent of swine erysipelas. Experimented pigs were introduced methods and intradermal methods and scarification with the lateral surface of the body at the border of the abdominal and chest walls of the culture *Er. rhusiopathiae* RS/1 serovar 1a in a dose of 1.0×10^6 CFU per 0.1 cm³ and the *Er. rhusiopathiae* RS/2 serovar 2b is 2.0×10^7 CFU/0.1 cm³, with control introduction appropriate method of 0.1 cm³ of sterile saline on the opposite side of the animal.

Results of the conducted researches it is established that in all the experimental pigs challenge with strains of *Er. rhusiopathiae*: RS/1 serovar 1a and *Er. rhusiopathiae* RS/2 serovar 2b intradermal methods of challenge and scarification were observed typical signs of the disease swine erysipelas.

The strains of *Er. rhusiopathiae* serovars 1a and 2b were pathogenic to pigs in doses of 1.0×10^6 CFU /0.1 cm³ and 2.0×10^7 CFU/0.1 cm³, respectively, and can be used as a control.

It should be noted that, with inoculation of strains of the *Er. rhusiopathiae* RS/1 & RS/2 methods, intradermal challenge and scarification, we obtained almost identical development of the disease in the research of pigs with similar clinical manifestations and time of development of the disease, indicating the possibility of using both methods as a reference when conducting the test of pigs challenge.

However, in the evaluation of infected pigs by scarification, it is necessary to consider the possibility of inflammation of the skin (in the form of minor dermatitis) as a result of scratches during the scarification.

The development of typical clinical signs of the swine disease erysipelas is a reflection of a successful infection of pigs intradermal methods of challenge and scarification.

The proposed model of challenge of pigs (intradermal methods and scarification) can be recommended for quality control of vaccines against swine erysipelas on indicators of efficacy/immunogenicity according to the requirements of the European Pharmacopoeia 0064 and DSTU 6079:2009.

Keywords: pathogen of swine erysipelas, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, immunogenicity, isolates, pathogenicity, serovars, strains.

Надійшла 30.05.2017 р.

УДК 619:616.981.51:615.373/.383:636.1

РУБЛЕНКО І.О., канд. вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

rubs@ukr.net

ВИЗНАЧЕННЯ СЕРОПОЗИТИВНОСТІ ЗА ІМУНІЗАЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ РІЗНИМИ ДОЗАМИ ВАКЦИНИ

Наведені результати досліджень щодо визначення оптимальної імунізуючої дози вакцини Антравак, виготовленої із штаму *Bacillus anthracis* UA-07. Під час проведення дослідження у тварин всіх вікових груп після введення вакцини виготовленої із штаму *Bacillus anthracis* UA-07 не виявляли пригнічення, підвищення температури тіла, почервоніння слизових оболонок, анафілактичного шоку, місцевих реакцій. У групі тварин із 6 місяців і старших титри специфічних антигенів були найвищими через 14, 21 та 180 діб після вакцинації, порівняно з тваринами інших вікових груп.

За аналізом результатів імунологічних досліджень доведено, що доза 7,82–10,42 млн. спор експериментальної вакцини із штаму *Bacillus anthracis* UA-07 (серія №1) від сибірки тварин виявилася менш ефективною, а доза 20,85–24,76 млн спор – не раціональною. Найбільш оптимальна та ефективна доза застосування вакцини із штаму *Bacillus anthracis* UA-07 для великої рогатої худоби (віком із 3 міс. і старше) за отриманими результатами становила 11,73–19,55 (16,0±4) млн/см³ спор.

Ключові слова: сибірка, профілактика, вакцина, доза, імунізація, *Bacillus anthracis*, Антравак, тварини, штам, велика рогата худоба.

Постановка проблеми. Серед найбільш небезпечних зоонозних збудників виділяють збудник сибірки. Одним із основних заходів захисту і профілактики від сибірки тварин є вакцинація. Спалахи цього захворювання серед тварин і людей є проблемою для багатьох країн [1–6]. Це призводить до втрати поголів'я тварин та значних економічних збитків внаслідок виникнення захворювання [7].

На території України сибірка тварин виникає спорадично [8–9]. За результатами систематизації і аналізу даних щодо випадків та спалахів сибірки спостерігається стабільна динаміка зниження, але існує небезпека у виникненні спалахів [10]. Це пов'язано із фізіологічними властивостями збудника, наявністю худобомогильників, біотермічних ям, сприятливих тварин тощо.

Останній випадок захворювання було зареєстровано, відповідно до повідомлення Головного управління Держпродспоживслужби в Сумській області 29.06.2017 року №01–12/2826 на березі річки Псел в с. Миропілля Краснопільського району (за два кілометри від кордону з Російською Федерацією), у трупів двох овець. Територіальними органами було встановлено відсутність проведення вакцинації тварин від сибірки, які випасалися вздовж русла цієї річки на суміжній території [11].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Механізм формування несприйнятливості під дією протисибіркових вакцин – процес створення антитоксичного імунітету [12]. Із місця введення вакцини сибірковий протективний антиген, що міститься у вакцинному штамі, потрапляє в організм тварини і зумовлює подразнення лімфоїдних і ретикулярних елементів лімфатичних вузлів і селезінки. Через добу відбувається гіперплазія зародкових центрів вторинних вузликів,