

situation on infectious rinotracheitis of cattle at the breeding enterprise]. *Veterinarija – Veterinary Medicine*, 8, 27–29 [in Russian].

13. Cresswell, E.A. et al. (2014). Questionnaire-based survey on the uptake and use of cattle vaccines in the UK. *Vet Rec Open*, Vol. 1, No. 1. *vetrecordopen.bmj.com*. Retrieved from <http://vetrecordopen.bmj.com/content/1/1/e000042.full.pdf+html>.

14. Kapil, S., & Basaraba, R.J. (1997). Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, Vol. 13, No. 3, 455–69.

15. O'Toole, D. et al. (2014). Kennedy, the early sixties, and visitation by the angel of death. *Vet Pathol.*, Vol. 51, No. 6, 1051–1062.

16. Hage, J.J. et al. (1996). Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet Microbiol.*, Vol. 53, No. 1/2, 169–180.

17. Rypuła, K. et al. (2012). Seroprevalence of BHV-1 (bovine herpesvirus type 1) among non-vaccinated dairy cattle herds with respiratory disorders. *Pol J Vet Sci.*, Vol. 15, No. 3, 561–563.

УДК:639:616.981.55

РИЖЕНКО Г.Ф., канд. біол. наук, доц., e-mail: anaerob12@ukr.net,
АНДРІЯЦУК В.О., канд. вет. наук, e-mail: and_valentina@hotmail.com,
ЖОВНІР О.М., канд. вет. наук, e-mail: zhovnir73@ukr.net,
ГОРБАТЮК О.І., канд. вет. наук, доц., e-mail: goroliva@ukr.net,
УХОВСЬКА Т.М., канд. вет. наук, e-mail: tanyavet@ukr.net,
ТЮТЮН С.М., e-mail: anaerobsveta@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

РСЗНІЧЕНКО Л.С., канд. біол. наук, ст. наук. сп., e-mail: reznichenko_ls@mail.ru,
ДИБКОВА С.М., канд. біол. наук, ст. наук. сп., e-mail: sdybkova@gmail.com
Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України

ВИВЧЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ВАКЦИН З НАНОЧАСТИНКАМИ МЕТАЛІВ ПРОТИ ЗАХВОРЮВАНЬ, ШО ВИКЛИКАЮТЬСЯ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, ЗА ПОКАЗНИКАМИ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ

У статті наведені результати досліджень вакцин з наночастинками металів – «Вельшісан+FeNP», «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AgNP», «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP+стимул» проти захворювань, викликаних C. perfringens, а саме інфекційної (анаеробної) ентеротоксемії тварин і птиці, некротичного ентериту поросят, анаеробної дизентерії ягнят.

За показниками: зовнішнього вигляду, рівня рН – 7,2±0,04, залишковій кількості формальдегіду – 0,028±0,01% вакцини відповідали вимогам ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ); були стерильними, нетоксичними, нешкідливими; не цитотоксичними та не генотоксичними.

Ключові слова: вакцина, FeNP, CuNP, AgNP, AuNP, стерильність, нетоксичність, нешкідливість.

Вступ. Незважаючи на широкий спектр застережливих заходів, що вживаються як в Україні, так і у світі, анаеробні інфекції тварин наразі набули значного поширення, створюючи реальну загрозу як для сільськогосподарського сектору, так і для диких тварин. Економічне та

соціальне значення цієї проблеми підкреслюється небезпечністю для людини більшості інфекційних хвороб тварин.

Джерелами біологічної загрози можуть бути природні вогнища збудників анаеробних інфекцій, біологічний тероризм з використанням збудників ботулізму, перфрингіозів, правцю та ін., застосування біологічної зброї у воєнний час, трансграничних перенесень збудників та імпортування тварин і сировини тваринного і рослинного походження.

Епізоотична ситуація погіршується як через розповсюдження збудників резистентних до широкого спектру традиційних препаратів, так і завдяки все частішому виділенню одночасно декількох збудників у хворих тварин на фоні загального ослаблення їх імунітету та інших супутніх патологічних станів.

Усі зазначені фактори, у свою чергу, значно ускладнюють дієвість існуючих профілактичних та лікувальних заходів та спонукають до пошуку нових агентів, значно ефективніших та більш дієвих при застосуванні у профілактиці і терапії захворювань тварин.

Вчені вважають, що у XXI столітті майбутнє біотехнології і самої біології пов'язане з переходом на новий рівень розвитку науки – рівень нанотехнологій [1].

Чисельні відомості щодо високої біологічної активності наночастинок металів, різних за природою, розміром і формою, свідчать про значні перспективи їх використання у якості такого роду агентів [2–4].

Вивчення дії наночастинок у ветеринарній медицині в Україні тільки починається. Але уже відмічена їх ефективність у хірургії. Наноаквахелати *Ag*, *Cu*, *Zn* виявлялися ефективними при лікуванні ран – скорочуються строки заживлення за рахунок інтенсифікації гемопоеза, самоочищення, рубцювання та епітелізації [5, 6]. Є дані про застосування елементів нанотехнології у лікуванні інфекційних кератокон'юнктивітів у тварин [7, 8].

Україна має вакцини, діагностичні та лікувальні препарати для профілактики і ліквідації анаеробних інфекцій. Але зважаючи на асоційований перебіг бактеріозів тварин, у т. ч. анаеробної етіології, імунопрофілактичні засоби потребують постійного удосконалення з урахуванням можливостей новітніх перспективних технологій, до яких належать і нанотехнології [9].

Метою нашої **роботи** було проведення контролю якості експериментальних вакцин «Вельшісан+FeNP», «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AgNP», «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP+стимул» за показниками якості та безпечності (визначення рівня рН, залишкової кількості формальдегіду, стерильності, нетоксичності, нешкідливості, цитотоксичності та генотоксичності), вивчення антигенної активності.

Матеріали і методи досліджень. Робота виконана у лабораторії анаеробних інфекцій ім. В. Риженка. Наночастинки металів синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України у вигляді колоїдних розчинів за вихідних концентрацій за металом: AuNP – 38,6 мг/мл, розмірністю 30,0 нм; AgNP – 80 мг/мл, розмірністю 30,0 нм; CuNP – 32,0 мг/мл, розмірністю 20,0 нм; FeNP – 5,0 мг/мл, розмірністю 40,0 нм.

Визначення стерильності вакцин здійснювали згідно ДСТУ 4483:2005 [10].

Оцінку безпечності експериментальних вакцин з наночастинками металів здійснювали шляхом дослідження генотоксичності – методом ДНК-комет у лужних умовах; цитотоксичності – методом оцінки життєздатності клітин у тесті з кристалічним фіолетовим та в МТТ-тесті [11, 12].

Результати досліджень та їх обговорення. Для оцінки цитотоксичності експериментальних зразків вакцин готували тестовані їх зразки у розведеннях:

1. «Вельшісан», розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
2. «Вельшісан+FeNP» №1, розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
3. «Вельшісан+FeNP» №2, розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
4. «Вельшісан+CuNP» №1, розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
5. «Вельшісан+CuNP» №2, розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
6. «Вельшісан+AuNP», розведення: 100, 50, 20, 10, 5;
7. «Вельшісан+AuNP+стимул», розведення: 100, 50, 20, 10, 5.

Тест об'єктом були клітини перещеплювальної культури клітин тестикул поросят (ST).

Дослідження на генотоксичність експериментальних вакцин проводили із виготовленими експериментальними зразками вакцин:

1. «Вельшісан» (контроль);
2. «Вельшісан+FeNP» №1;
3. «Вельшісан+FeNP» №2;
4. «Вельшісан+CuNP» №1;
5. «Вельшісан+CuNP» №2;
6. «Вельшісан+AuNP»;
7. «Вельшісан+AuNP+стимул».

Визначення зовнішнього вигляду експериментальних зразків вакцини проводили візуально: «Вельшісан+FeNP» і «Вельшісан+AgNP» є прозорою рідиною темно-зеленого кольору із осадом від зеленого до темно-сірого відтінку, який за струшування розбивався у гомогенну масу; «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AuNP» та «Вельшісан+AuNP-стимул» є прозорою рідиною зеленого кольору із зеленим осадом сірого відтінку, який після струшування розбивається і також утворює гомогенну масу.

Після відстоювання кількість осаду складає близько 25,0–30,0% від загального об'єму препарату у флаконі. Будь-яких дефектів не виявлено, що свідчить про відповідність дослідних зразків вакцини вимогам ВІЗ щодо їхнього зовнішнього вигляду (табл. 1).

Рівень рН експериментальних зразків вакцин пов'язаний із проникністю клітин тканин у організмі тварин та регулюється співвідношенням водневих H^+ іонів та O^- гідроксильних груп. У відібраних пробах дослідних зразків вакцин показник рН був на рівні $7,2 \pm 0,4$ та відповідав чинним вимогам до ВІЗ.

Залишкова кількість вільного формальдегіду у дослідних зразках вакцин пов'язана із інактивацією культур штамів збудника. Токсична дія формальдегіду на організм тварин загальновідома, тому нами був проведений контроль виготовленого препарату на кількісний залишок вільного формальдегіду.

Таблиця 1

Контроль зовнішнього вигляду експериментальних зразків асоційованих вакцин «Вельшісан+FeNP», «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AgNP», «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул»

Серія зразка вакцини	Контроль зразка вакцини	Кількість екземплярів	Назва виготовленої вакцини	Характеристика показників зовнішнього контролю препарату			
				Консистенція	Колір	Осад	Наявність дефектів: домішки, пліснява, тріщини, тощо
№ 1	№ 1	8	«Вельшісан+FeNP»	Рідина прозора із осадом (до ¼ від загального об'єму). При струшуванні розбивається у рівномірну суспензію	темно-зелений	гомогенний зелений до темно-сірого	відсутні
№ 1	№ 1	8	«Вельшісан+CuNP»	Рідина прозора із осадом (до ¼ від загального об'єму). При струшуванні розбивається у рівномірну суспензію	зелений	гомогенний зеленувато-сірий	відсутні
№ 1	№ 1	8	«Вельшісан+AgNP»	Рідина прозора із осадом (до ¼ від загального об'єму). При струшуванні розбивається у рівномірну суспензію	темно-зелений	гомогенний зелений до темно-сірого	відсутні
№ 1	№ 1	8	«Вельшісан+AuNP»	Рідина прозора із осадом (до ¼ від загального об'єму). При струшуванні розбивається у рівномірну суспензію	зелений	гомогенний зеленувато-сірий	відсутні
№ 1	№ 1	8	«Вельшісан+AuNP-стимул»	Рідина прозора із осадом (до ¼ від загального об'єму). При струшуванні розбивається у рівномірну суспензію	зелений	гомогенний зеленувато-сірий	відсутні

За аналізом результатів випробувань показник залишку вільного формальдегіду у виготовлених зразках вакцин склав $0,028 \pm 0,010\%$, що відповідає вимогам ВІЗ.

Результати контролю дослідних експериментальних вакцин на повноту інактивації, стерильність, нетоксичність та нешкідливість показали, що упродовж терміну досліджень будь-якого культурального росту стосовно збудників, що входять до складу вакцинних препаратів чи росту сторонньої мікрофлори і мікроскопічних грибів не виявлено (табл. 2).

Таблиця 2

Результати контролю дослідних зразків вакцин на стерильність і повноту інактивації «Вельшісан+FeNP», «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AgNP», «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул»

Назва середовища	Дата висіву вакцин	Результати спостереження, діб														Дата закінчення контролю	Відмітки про ріст
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+FeNP»																	
Тіогліколеве середовище (ТГС)	09.08.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.08.2017	Ріст відсутній
МПА	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.08.2017	-/-
МПБ	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Кітт-Тароцці	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Середовище Сабуро	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+CuNP»																	
Тіогліколеве середовище (ТГС)	09.08.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.08.2017	Ріст відсутній
МПА	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.08.2017	-/-
МПБ	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Кітт-Тароцці	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Середовище Сабуро	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AgNP»																	
Тіогліколеве середовище (ТГС)	09.08.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.08.2017	Ріст відсутній
МПА	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.08.2017	-/-
МПБ	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Кітт-Тароцці	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Середовище Сабуро	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP»																	
Тіогліколеве середовище (ТГС)	09.08.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.08.2017	Ріст відсутній
МПА	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.08.2017	-/-
МПБ	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Кітт-Тароцці	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Середовище Сабуро	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP-стимул»																	
Тіогліколеве середовище (ТГС)	09.08.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.08.2017	Ріст відсутній
МПА	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.08.2017	-/-
МПБ	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Кітт-Тароцці	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-
Середовище Сабуро	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-/-

Примітки: – ріст мікроорганізмів відсутній; + виявлено ріст мікроорганізмів

Отже, експериментальні зразки вакцин були повністю інактивованими, неконтамінованими живими бактеріями і мікроскопічними грибами, чим задовольняли вимоги чинного ДСТУ 4483-2005 щодо контролю контамінації вакцинних препаратів живими бактеріями та мікроскопічними грибами.

Результати контролю на нетоксичність та нешкідливість експериментальних зразків вакцинних препаратів, проведених на інбредних

білих мишах і мурчаках, засвідчили нетоксичність експериментальних зразків виготовлених вакцин (табл. 3).

Упродовж дослідів білі миші та мурчаки мали адекватну поведінку, зберігався апетит, фізіологічні функції залишалися у нормі. Будь-яких патологічних змін у тканинах на місці введення препаратів не виявлено. Було відмічено зростання середньої живої маси у інбредних білих мишей за підшкірної та внутрішньочеревної інокуляції вакцини «Вельшісан+FeNP», вірогідно на 19,0% та 17,3% ($p < 0,001$) відповідно, що засвідчувало нешкідливість експериментального зразка цієї вакцини.

Результати досліджень на білих мишах підтверджені даними, одержаними після інокуляції дослідної вакцини мурчакам, оскільки через 10 діб спостерігалось зростання показників середньої живої маси по групі на 4,9%, що підтверджувало нешкідливість експериментального зразка вакцини «Вельшісан+FeNP».

За інокуляції інбредним білим мишам експериментального зразка вакцини «Вельшісан+CuNP» упродовж 10 діб спостережень тварини не загинули. У дослідних мишей спостерігалось зростання середньої живої маси вірогідно на 19,4–19,6 г ($p < 0,01$) та у мурчаків на 4,2%, що підтверджувало нетоксичність та нешкідливість виготовленої вакцини.

Після введення інбредним білим мишам та мурчакам експериментального зразка вакцини «Вельшісан+AgNP» тварини не загинули. Спостерігалось зростання показників приросту живої маси у білих мишей на 18,0–18,7% та у мурчаків – на 4,5%, що засвідчує нетоксичність та нешкідливість виготовленої вакцини для застосування тваринам.

Таблиця 3

Результати лабораторного контролю експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+FeNP», «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+AgNP», «Вельшісан+AuNP» та «Вельшісан+AuNP-стимул» на нетоксичність та нешкідливість, $M \pm m$, г, п б.м. = 10, п м.св. = 3 =

Вид тварин	Метод введення та об'єм вакцин	Кількість тварин на початок дослідж., гол.	Середня жива маса тварин по групі на початок дослідж., г	Кількість тварин на кінець дослідж., гол	Середня жива маса тварин по групі за закінчення дослідж., г	залишилось живих, гол	затинуло, гол	Результати досліджень		Заключення
								Приріст живої маси по групах:	%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+FeNP»										
Інbredні білі миші	п/ш, 0,5 см ³	10	20,1±0,2	10	24,8±0,5	10	-	4,7	19,0 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 19,0% – вакцина нешкідлива.
Інbredні білі миші	в/ч, 0,5 см ³	10	20,1±0,3	10	24,3±0,4	10	-	4,2	17,3 *	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 17,3% – вакцина нешкідлива.
Мурчаки	п/ш, 2,0 см ³	3	351,6±0,8	3	369,8±0,5	3	-	18,2	4,9	Мурчаки залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігався приріст живої маси у тварин після інюкуляції препарату на 4,9% – вакцина нешкідлива.
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+CuNP»										
Інbredні білі миші	п/ш, 0,5 см ³	10	20,5±0,2	10	25,5±0,5	10	-	5,0	19,6 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 19,6% – вакцина нешкідлива.
Інbredні білі миші	в/ч, 0,5 см ³	10	20,8±0,3	10	25,8±0,4	10	-	5	19,4 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 19,4% – вакцина нешкідлива.
Мурчаки	п/ш, 2,0 см ³	3	355,0±0,8	3	370,5±0,5	3	-	15,5	4,2	Мурчаки залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігався приріст живої маси у тварин після інюкуляції препарату на 4,2% – вакцина нешкідлива.

(продовження табл. 3)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AgNP»										
Інбредні білі миші	п/ш, 0,5 см ³	10	21,0±0,2	10	25,6±0,5	10	-	4,6	18,0 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 18,0% – вакцина нешкідлива.
Інбредні білі миші	в/ч, 0,5 см ³	10	20,8±0,3	10	25,6±0,4	10	-	4,8	18,7 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 18,7% – вакцина нешкідлива.
Мурчаки	п/ш, 2,0 см ³	3	355,6±0,8	3	372,5±0,5	3	-	16,9	4,5	Мурчаки залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігався приріст живої маси у тварин після інюкуляції препарату на 4,5% – вакцина нешкідлива.
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP»										
Інбредні білі миші	п/ш, 0,5 см ³	10	20,5±0,2	10	25,2±0,5	10	-	4,7	18,7 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 18,7% – вакцина нешкідлива.
Інбредні білі миші	в/ч, 0,5 см ³	10	21,0±0,3	10	24,8±0,4	10	-	3,8	15,3 *	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 15,3% – вакцина нешкідлива.
Мурчаки	п/ш, 2,0 см ³	3	355,8±0,8	3	370,8±0,5	3	-	15,0	4,0	Мурчаки залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігався приріст живої маси у тварин після інюкуляції препарату на 4,0% – вакцина нешкідлива.
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP-стимул»										
Інбредні білі миші	п/ш, 0,5 см ³	10	21,1±0,2	10	25,8±0,5	10	-	4,7 **	18,2	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 18,2% – вакцина нешкідлива.
Інбредні білі миші	в/ч, 0,5 см ³	10	20,3±0,3	10	25,3±0,4	10	-	5,0	19,8 **	Білі миші залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігається вірогідний приріст живої маси у білих мишей після інюкуляції препарату на 19,8% – вакцина нешкідлива.
Мурчаки	п/ш, 2,0 см ³	3	358,6±0,8	3	373,2±0,5	3	-	14,6	3,9	Мурчаки залишилися живими – вакцина нетоксична. Спостерігався приріст живої маси у тварин після інюкуляції препарату на 3,9% – вакцина нешкідлива.

Примітки: * – $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, порівняно із початковими показниками п/ш – підшкірно; в/ч – внутрішньочеревно.

За інокуляції інбредним білим мишам і мурчакам експериментального зразка вакцини «Вельшісан+AuNP» упродовж 10 діб спостережень тварини не загинули. У дослідних мишей спостерігалось зростання середньої живої маси вірогідно на 15,3–18,7 г ($p < 0,01$) та у мурчаків – на 4,0%, що підтверджувало нетоксичність та нешкідливість виготовленої вакцини для застосування тваринам.

Після введення інбредним білим мишам та мурчакам експериментального зразка вакцини «Вельшісан+AuNP-стимул» тварини не загинули. Спостерігалось зростання показників приросту живої маси у білих мишей на 18,2–19,8% та у мурчаків – на 3,9%, що засвідчує нетоксичність та нешкідливість виготовленої вакцини для застосування тваринам.

Результати досліджень, з вивчення антигенної активності експериментальних зразків вакцин, представлені показниками з визначенням імунологічної реактивності організму кролів показали, що на початку досліду (до щеплення) у кролів не виявлено специфічних антитіл до *S. perfringens* (табл. 4)

Через 7 діб після повторної вакцинації кролів результати серологічних досліджень сироваток крові щеплених тварин вказували на вірогідне зростання титрів специфічних аглютининів до усіх антигенів *S. perfringens* типів А, В, С, Д, що засвідчувало антигенну активність експериментальних зразків вакцин.

Таблиця 4

Результати дослідження антигенної активності експериментальних зразків вакцин

№ п/п	Вид тварин	Кількість тварин (гол)	Жива маса кроля (кг)	РА із антигенами <i>S. perfringens</i> в титрах: (до щеплення)		Дата щеплень		Щеплення та доза (см ³)	Дослідження сироваток крові кролів після щеплень:							
				тип В	тип С	першого	повторного		Дата	РА із антигенами <i>S. perfringens</i> в титрах:		зростання титрів із антигенами <i>S. perfringens</i> (у разів)				
										тип В	тип С	тип В	тип С			
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+FeNP»																
1	Кролі	1	2,53	-	-	28.08.	11.09.	п/ш 2,0	18.09.	1:8	1:32	8	32			
2	Кролі	1	2,5	-	-					17	17	17	1:32	1:32	32	32
3	Кролі	1	2,55	-	-					17	17	17	1:16	1:16	16	16
Середні показники зростання титрів:											у разів		18,7	27,7		
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+CuNP»																
1	Кролі	1	2,48	-	1:2	28.08.	11.09.	п/ш 2,0	18.09.	1:16	1:32	16	16			
2	Кролі	1	2,55	-	-					17	17	17	1:32	1:32	32	32
3	Кролі	1	2,55	1:2	-					17	17	17	1:32	1:32	16	32
Середні показники зростання титрів:											у разів		21,3	26,7		

Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AgNP»														
1	Кролі	1	2,5	-	-	28.08. 17	11.09. 17	п/ш 2,0	18.09. 17	1:32	1:16	32	16	
2	Кролі	1	2,5	-	-					1:32	1:32	32	32	
3	Кролі	1	2,6	-	-					1:32	1:32	32	32	
Середні показники зростання титрів:											у разів		32,0	26,7
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP»														
1	Кролі	1	2,5	-	-	28.08. 17	11.09. 17	п/ш 2,0	18.09. 17	1:32	1:32	32	32	
2	Кролі	1	2,51	-	-					1:32	1:32	32	32	
3	Кролі	1	2,5	-	-					1:32	1:32	32	32	
Середні показники зростання титрів:											у разів		32,0	32,0
Експериментальний зразок вакцини «Вельшісан+AuNP-стимул»														
1	Кролі	1	2,42	1:2	1:4	28.08. 17	11.09. 17	п/ш 2,0	18.09. 17	1:32	1:32	16	8	
2	Кролі	1	2,5	1:4	1:4					1:8	1:16	2	4	
3	Кролі	1	2,38	1:8	-					1:32	1:16	4	16	
Середні показники зростання титрів:											у разів		7,1	9,3

Оцінка цитотоксичності і генотоксичності експериментальних зразків вакцин. Результати досліджень цитотоксичності експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+CuNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул» були проведені на тестових клітинах перещеплювальної культури клітин тестикул поросят методом оцінки життєздатності клітин із включенням вітального барвника трипанового синього. Виконаний комплекс експериментальних досліджень з оцінки цитотоксичності експериментального зразка вакцини «Вельшісан», виготовленої за традиційною технологією (без додавання наночастинок металів) та експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+CuNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул» свідчать про низькі рівні цитотоксичного впливу досліджуваних препаратів на еукариотичні клітини (табл. 5).

Таблиця 5

Показники цитотоксичності експериментальних зразків вакцин для еукариотичних клітин ST

Розведення дослідних вакцин	Результати досліджень, %						
	«Вельшісан»	«Вельшісан+FeNP» № 1	«Вельшісан+FeNP» № 2	«Вельшісан+CuNP» № 1	«Вельшісан+CuNP» № 2	«Вельшісан+AuNP»	«Вельшісан+AuNP-стимул»
5	51	51	54	50	52	53	55
10	65	64	65	61	65	74	75
20	85	78	87	75	86	86	87
50	97 *	80	97 *	86	98 *	99 *	99 *
100	98 *	91	99 *	92	99 *	99 *	99 *

Примітка: * – P < 0,05 порівняно з контрольною вакциною.

Вакцина «Вельшісан», яка успішно використовується у ветеринарній практиці, показала високий рівень біосумісності, має IC₅₀ у 5 розведенні, а 100,0% виживаність тестових еукаріотичних клітин була встановлена після 50-розведення цього препарату.

Експериментальні зразки вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1, «Вельшісан+CuNP» № 1 були більш цитотоксичними, порівняно, у якості контролю, з вакциною «Вельшісан», оскільки не вдалося одержати 100,0% виживаність клітин еукаріотів з такими зразками препарату.

В експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+FeNP» № 2, «Вельшісан+CuNP» № 2 цитотоксичність залишалася на рівні базової вакцини «Вельшісан», що засвідчувало їхню якість та безпечність після застосування тваринам.

Результати досліджень рівня цитотоксичності *in vitro* у експериментальних зразках вакцин «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул», порівняно з контрольною вакциною «Вельшісан», показали високу ступінь життєздатності еукаріотичних клітин, оскільки вже у 50 та у 100 розведеннях виживаність еукаріотичних клітин складала близько 100,0%.

Таким чином, експериментальні зразки вакцин «Вельшісан+FeNP» № 2 та «Вельшісан+CuNP» № 2 за показником цитотоксичності виявилися більш біобезпечними за їхнього тестування з оцінки життєздатності клітин лінії ST із включенням вітального барвника трипанового синього, порівняно з експериментальними зразками вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 та «Вельшісан+CuNP» № 1. Експериментальні зразки вакцин «Вельшісан+AuNP» та «Вельшісан+AuNP-стимул» є безпечними за показником цитотоксичності.

Проведені дослідження **генотоксичності експериментальних зразків** вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+CuNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул» на тестових клітинах перещеплювальної культури клітин тестикул поросят (табл. 6).

Таблиця 6

Результати оцінки генотоксичності експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+CuNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул»

Назва об'єкту досліджень	Показник генотоксичності «I _{днк} »	Висновок про генотоксичність
Негативний контроль	0,125±0,001	Не генотоксичний
Позитивний контроль	2,07±0,01	Генотоксичний
«Вельшісан»	0,122±0,001	Не генотоксичний
«Вельшісан+FeNP» № 1	0,127±0,002	Не генотоксичний
«Вельшісан+FeNP» № 2	0,124±0,001	Не генотоксичний
«Вельшісан+CuNP» № 1	0,126±0,001	Не генотоксичний
«Вельшісан+CuNP» № 2	0,125±0,001	Не генотоксичний
«Вельшісан+AuNP»	0,122±0,001	Не генотоксичний
«Вельшісан+AuNP-стимул»	0,125±0,002	Не генотоксичний

Примітка: * – p < 0,05, порівняно з контролями.

Таким чином, експериментальні зразки вакцин «Вельшісан+FeNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+CuNP» № 1 і № 2, «Вельшісан+AuNP», «Вельшісан+AuNP-стимул» є безпечними за показником генотоксичності (рис. 1).



Рис. 1. Візуалізація експериментальних зразків вакцин «Вельшісан+CuNP», «Вельшісан+ FeNP», «Вельшісан+ AgNP», «Вельшісан+ AuNP» та «Вельшісан+AuNP-стимул».

Висновки та перспективи подальших досліджень. За лабораторних досліджень встановлено, що дані вакцини за показниками: зовнішнього вигляду, рівню рН – $7,2 \pm 0,04$, залишкової кількості формальдегіду $0,028 \pm 0,01\%$ відповідали вимогам щодо ветеринарних імунобіологічних засобів; були стерильними, нетоксичними, не шкідливими; не цитотоксичними та не генотоксичними.

Результати досліджень даних експериментальних вакцин з наночастинками металів свідчать про їх перспективність і необхідність подальших клінічних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Теоретичне та експериментальне обґрунтування використання нанотехнологій для створення імунобіологічних препаратів / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк [та ін] // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 23. – С. 438–446.
2. Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичності лужним гель-електрофорезом ізольованих еукаріотичних клітин: методичні рекомендації / С.М. Дибкова, Т.Г. Грузіна, З.Р. Ульберг, та ін. – К., 2010. – 24 с.
3. Москаленко В.Ф. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки нанотехнологій, наночастинок та наноматеріалів / В.Ф. Москаленко, О.П. Яворовський // Науковий вісник Національного медичного Університету ім. О.О. Богомольця. – 2009. №3. – С. 25–35
4. Шимановський Н.Л. Нанотехнологии в современной фармакологии / Н.Л. Шимановський // Международный медицинский журнал. – 2009. №1. – С. 131–135.
5. Нанотехнологія у ветеринарній медицині / В.Б. Борисевич, Б.В. Борисевич, К.Г. Каплуненко, М. В. Косінов та ін. (ред. проф. В.Б. Борисевич, проф. К.Г. Каплуненко). – К.: Ліра, 2009. – 232 с.
6. Патент України на корисну модель №32794. Антимікробна шовна хірургічна нитка з наночастинками срібла і міді // Петренко О.Ф., Косінов М.В., Каплуненко К.Г. / МПК (2006): А61L 17/00, А61В 17/06 Опубл.26.05.2008, Бюл. №10.

7. Петренко О.О. Застосування елементів нанотехнології у лікуванні кератитів // Ветеринарна медицина України. - 2008. - №4. - С. 34–35.

8. Наноматериалы и нанотехнологии в ветеринарной практике: учебное и практическое пособие / В.Б. Борисевич, К.Г. Каплуненко, М.В. Косинов и др. Под. ред. В.Б. Борисевич, К.Г. Каплуненко. – К.: ВД „Авиценна”. 2012. – 512с.

9. Скринінг наночастинок металів для біотехнології ветеринарних імунобіологічних засобів / Г.Ф. Риженко, С.М. Дибкова, О.І. Горбатюк та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – 2017. – №30. – С. 206–213.

10. ДСТУ 4483:2005 „Препарти ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибною контамінації” / Чинний від 10.01.2006. Держспоживстандарт України. – Київ 2006. – 20 с.

11. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів: методичні рекомендації/ затв. Наукоекспертною радою Державного експертного центру МОЗ України, протокол №8 від 26.09.2013р.

12. Оцінка безпеки ветеринарних імунобіологічних засобів, які містять наночастинок металів, у процесі розробки: методичні рекомендації (Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк, В.О. Андріяшук, та ін.) – К. 2017. – 21 с.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ВАКЦИН С НАНОЧАСТИЦАМИ МЕТАЛЛОВ ПРОТИВ ЗАБОЛЕВАНИЙ, КОТОРЫЕ ВЫЗЫВАЮТСЯ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ / Рыженко Г.Ф., Андріяшук В.А., Жовнир А.М., Горбатюк О.И., Уховская Т.Н., Тютюн С.Н., Резниченко Л.С., Дибкова С.Н.

*В статье приведены результаты исследований вакцин с наночастицами металлов – «Вельшисан+FeNP», «Вельшисан+CuNP», «Вельшисан+AgNP», «Вельшисан+AuNP», «Вельшисан+AuNP-стимул» против заболеваний, которые вызываются *S. perfringens*, а именно: инфекционной (анаэробной) энтеротоксемии животных и птиц, некротического энтерита поросят, анаэробной дизентерии ягнят.*

По показателям внешнего вида, уровню pH – $7,2 \pm 0,04$, остаточному количеству формальдегида – $0,028 \pm 0,01\%$ вакцины соответствовали требованиям ветеринарных иммунобиологических средств; были стерильны, нетоксичны, неопасны; не цитотоксичны и не генотоксичны.

Ключевые слова: *FeNP, CuNP, AgNP, AuNP, стерильность, нетоксичность, безвредность, биобезопасность, цитотоксичность, генотоксичность.*

STUDY OF THE EXPERIMENTAL SAMPLES OF VACCINES WITH METAL NANOPARTICLES AGAINST DISEASES CAUSED BY *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BY QUALITY AND SAFETY PARAMETERS / Ryzhenko H.F., Andriiaschuk V., Zhovnir O.M., Gorbatiuk O.I., Ukhovska T.M., Tiutiun S.M., Reznichenko L.S., Dybkova S.M.

Introduction. *Anaerobic infections of animals have become widespread both in Ukraine and in the world. There are vaccines, diagnostic and therapeutic means for their prevention and treatment in Ukraine. But immune and preventive means need to be improved continually including potential of advanced technologies (nanotechnology).*

The goal of the work *was to study quality of the experimental samples of vaccines with metals nanoparticles by physical, biological and safety parameters: cytotoxicity and genotoxicity.*

Materials and methods. *Metals nanoparticles were synthesized at the F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of the NAS of Ukraine as colloidal solutions.*

Vaccines samples were tested by the physical and biological properties: pH, residual amount of free formaldehyde, completeness of inactivation, sterility, non-toxicity, harmlessness,

antigenic activity. Genotoxicity was studied with DNA comet assay under alkaline conditions; cytotoxicity using method of cell viability evaluation in a crystalline violet test and in a MTT assay.

Results of research and discussion. Visual test of the experimental samples of “Velshisan+FeNP”, “Velshisan+CuNP”, “Velshisan+AgNP”, “Velshisan+AuNP”, “Velshisan+AuNP+stimulus” vaccines has shown that they were a transparent liquid with aggregates (up to ¼ of the total volume) which broke up into a uniform from green to dark green suspension after been shaken.

The pH was 7.2 ± 0.4 , the residual amount of free formaldehyde was $0.028 \pm 0.01\%$, which corresponds to the veterinary immunobiological means requirements.

The tests on the completeness of inactivation and sterility, non-toxicity and harmlessness showed absence of any culture or extraneous microflora growth after vaccine inoculation on the beef-extract broth, meat infusion agar for aerobic pathogens detection and Kitt-Tarozzi medium for anaerobes detection.

The results of fungi contamination test using Sabouraud agar were negative.

Control tests for the vaccines non-toxicity and harmlessness were conducted using inbred white mice and guinea pigs. All tests were negative.

The results of laboratory studies on the quality of experimental vaccines have shown that they do not have cytotoxicity and genotoxicity effects.

Conclusions and prospects for further researches. Results of the researches of “Velshisan+FeNP”, “Velshisan+CuNP”, “Velshisan+AgNP”, “Velshisan+AuNP”, “Velshisan+AuNP+stimulus” experimental samples of vaccines with metals nanoparticles confirmed that they met the requirements for veterinary immunobiological means, did not have cytotoxicity and genotoxicity effects.

Keywords: FeNP, CuNP, AgNP, AuNP, sterility, non-toxicity, harmlessness, safety, cytotoxicity, genotoxicity.

REFERENCES

1. Ryzhenko, V.P., Ryzhenko, G.F., Gorbatyuk, O.I. et al. (2013). Teoretychne ta eksperymental'ne obhruntuvannya vykorystannya nanotekhnolohiy dlya stvorennya imunobiologichnykh preparativ [Theoretical and experimental justification for the use of nanotechnology to create immunological drugs]. *Veterynarna biotekhnolohiya – Veterinary biotechnology*, 23, 438-446 [in Ukrainian].
2. Dybkova, S.M., Gruzina, T.G., Ulberg, Z.R. et al. (2010). Ocinka bezpeki nanomaterialiv organichnoi ta neorganichnoi prirody metodom vyznachenna genotoksychnosti lujnim gel-electroforezom izoluovanich eukariotychnykh clityn: Metodychni rekomendacii [Biosafety assessment of nanomaterials of organic and inorganic nature by definition of genotoxicity by alkaline gel electrophoresis of isolated eukaryotic cells]. *Guidelines*. Kyi'v [in Ukrainian].
3. Moskalenko, V.F., Javorovs'kyj, O.P. (2009). Ekologichni i toksykologo-gigijenichni aspekty biologichnoi bezpeky nanotekhnologij, nanochastynok ta nanomaterialiv [Ecological and toxicological and hygienic aspects of biological safety of nanotechnologies, nanoparticles and nanomaterials]. *Nauk. visn. Nac. Med. Universytetu im. O.O. Bogomol'cja – Scientific Herald of the O.O. Bogomolets National medical university*, 3, 25-35 [in Ukrainian].
4. Shymanovs'kyj, N.L. (2009). Nanotekhnolohyy v sovremennoj farmakolohyy [Nanotechnology in modern pharmacology]. *Mezhdunarodnij medycynskij Zhurnal – International Medical Journal*, 1, 131-135 [in Ukrainian].
5. Borysevych V.B., Borysevych B.V., Kaplunenko K.G., Kosinov M.V. et al. (2009). *Nanotekhnologija u veterynarnij medycyni [Nanotechnology in veterinary medicine]*. (red. Prof. V.B. Borysevych, Prof. K.G. Kaplunenko). K.: Lira [in Ukrainian].
6. Petrenko, O.F., Kosinov, M.V., Kaplunenko, K.G. Antymikrobnna shovna hirurgichna nytky z nanochastynkamy sribla i midi [Antimicrobial suture surgical thread with silver and copper nanoparticles]. *Patent Ukrai'ny na korysnu model – Patent UA on useful model №32794*. MPK (2006): A61L 17/00, A61V 17/06 [in Ukrainian].

7. Petrenko O.O. (2008). Zastosuvannja elementiv nanotehnologii' u likuvanni keratytiv [Application of nanotechnology elements in the treatment of keratitis]. *Veterynarna medycyna Ukrainy – Veterinary Medicine of Ukraine*, 4, 34-35 [in Ukrainian].
8. Borisevich, V.B., Kaplunenko, K.G., Kosinov, M.V. et al. (2012). *Nanomaterialy i nanotehnologii v veterinarnej praktike: uchebnoe i prakticheskoe posobie [Nanomaterials and nanotechnologies in veterinary practice: manual]*. (red. Prof. V.B. Borysevych, Prof. K.G. Kaplunenko). K.: VD "Avicenna" [in Russian].
9. Ryzhenko, G.F., Dybkova, S.M., Gorbatjuk, O.I. et al. (2017). Skryning nanochastynok metaliv dlja biotehnologii' veterynarnyh imunobiologichnyh zasobiv [Screening of metal nanoparticles for application in biotechnology of veterinary immunobiological agents]. *Veterynarna biotehnologija – Veterinary biotechnology*, 30, 206-213 [in Ukrainian].
10. Preparaty veterynarni imunobiologichni. Metody vyznachennja bakterial'noi' i grybnoi' kontaminacii' [Veterinary preparations immuno-biological. Methods of determination of bacterial and fungal contamination]. (2006). *DSTU 4483:2005 from 10.01.2006*. K.: Derzhspozhyvstandart Ukrainy [in Ukrainian].
11. *Ocinka bezpeky likars'kyh nanopreparativ Metodychni rekomendacii'* [Assessment of the safety of medical nanoparticles]. (2013). *Guidelines*. Kyi'v [in Ukrainian].
12. Ryzhenko, G.F., Gorbatjuk, O.I., Andrijashhuk, V.O. et al. (2017). *Ocinka bezpeky veterynarnyh imunobiologichnyh zasobiv, jaki mistjat' nanochastynky metaliv, u procesi rozrobky: metodychni rekomendacii'* [Assessment of the safety of veterinary immuno-biological agents containing nanoparticles of metals in the process of development]. *Guidelines*. Kyi'v [in Ukrainian].

УДК: 639:615.9:636.085

РУДА М.С., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: rudaspas@gmail.com,
ВАСЯНОВИЧ О.М., канд. с.-г. наук, ст.наук. сп., e-mail: myco-ivm@rambler.ru,
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук, пров. наук. сп., e-mail: v.sapeyko@gmail.com,
ЯНГОЛЬ Ю.А.*, e-mail: juliajangol@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИПАДОК ЗЕАРАЛЕНОТОКСИКОЗУ У СВИНЕЙ

*У результаті мікотоксикологічних досліджень у пробі комбікорму, який згодували хворим свиням визначено наявність зеараленону в кількості 2 мг/кг корму, якого в нормі не повинно бути взагалі. Також у компонентах, з яких виготовлявся комбікорм визначили Т-2 токсин, вомітоксин та афлатоксин В₁. Окрім того, у кормах встановлено значне засмічення мікроскопічними плісневими грибами, в тому числі грибами роду *Fusarium*, які є потенційними продуцентами трихотеценових мікотоксинів. Гриби роду *Fusarium* склали 32,1% від загальної кількості досліджених штамів, *Penicillium* – 21,4%, *Aspergillus* та *Alternaria* – 14,3%. Дослідженнями до тест-об'єкту *Tetrachimena pyriformis* встановлено токсичну дію у 18 штамів із 28 досліджених (64,9%).*

Проведені дослідження підтверджують випадок зеараленотоксикозу у свиногосподарстві.

Ключові слова: мікроміцети, зерно, мікологічні дослідження, вомітоксин, зеараленотоксикоз.

*Аспірант, науковий керівник – канд. с/г наук **Васянович О.М.**