

Experimental study of immunoprophylactic anti-pneumococcal medicine and its immunogenic properties

Ya.V. Kysera, Yu.G. Storchak, B.V. Gutyj

*Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies
Lviv, Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine*

E-mail: bvh@ukr.net

Submitted: 23.12.2017. Accepted: 10.02.2018

In today's veterinary science and practice, the issue of creation and introduction into the production of diagnostic and preventive immunobiological remedies remains relevant. The prevention of factor bacterial diseases is one of the main tasks of veterinary medicine. Taking into account that sufficient immunobiological reactivity and resistance of an animal's organism is provided by the optimal composition of vitamins, macro- and microelements, and insufficient vitamin, mineral, including micromineral nutrition causes in them a violation of the function of the immune system, reduces the resistance of the organism to infections, increases the incidence, emerged the issue of developing a new preventive and immunostimulant. It was established the specific composition of streptococci. Complex researches were carried out, which included the isolation of the most virulent pneumococci from the experimental material, taken in the animal farms of Lviv region in order to develop a preventive remedy "Pneumo-Pro" against pneumococcal infection. In 29% of cases there was *S. pneumoniae*, 21% – *S. pyogenes*, 17% – *S. bovis*, 12% – *S. agalactiae* and 21% – other streptococci strains that did not respond to streptococcal serums and were not identified as *S. pneumoniae*. Investigation of the sensitivity of pneumococci to antibiotics has shown that isolates have been sensitive to enrofloxacin, ofloxacin. Resistance to vancomycin, cefalexin, streptomycin, amoxicillin, ampicillin, cefazolin, lincomycin and erythromycin has been established. A non-harmful and immunogenic prophylactic remedy against pathogens of pneumococcal infection was tested with laboratory animals. During the development of a prophylactic remedy, the determination of its harmlessness was investigated immunogenic properties with different ratios of components of the preventive agent "Pneumo-Pro". White mice were used in the studies. The created preventive remedy "Pneumo-Pro" in its composition contains two components: *Streptococcus pneumoniae* and alcoholic extract of propolis, which possesses anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Experimental studies have shown that propolis, due to its anti-inflammatory and antioxidant properties, prevents of pneumonia. Clinical observations showed the harmlessness of the experimental samples of the remedy: no swelling and abscesses at the injection site, no increase in local temperature and body temperature, a deterioration in the general condition of laboratory animals. The expediency of the use of immunoprophylaxis, made from local isolates of an infectious agent in order to increase the resistance of animals.

Key words: pneumococcal infection; *Streptococcus pneumoniae*; immunoprophylaxis; adjuvant; propolis

Розробка імунопрофілактичного протипневмококового засобу та визначення його імуногенних властивостей на білих мишах

Я.В. Кісера, Ю.Г. Сторчак, Б.В. Гутий

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
вул. Пекарська, 50, Львів-10, 79010*

У сучасній ветеринарній науці та практиці актуальним залишається питання розробки та впровадження у виробництво діагностичних та профілактичних імунобіологічних засобів. Профілактика факторних бактеріальних захворювань –

одне із основних завдань ветеринарної медицини. Проведені комплексні дослідження, які включали в себе ізоляцію у скотарських господарствах Львівської області найбільш вірулентних пневмококів із дослідного матеріалу з метою розробки профілактичного засобу «Пневмо-Про» проти пневмококової інфекції. Проведено випробування на лабораторних тваринах нешкідливого та імуногенного профілактичного засобу проти збудника пневмококової інфекції. Розроблений профілактичний засіб «Пневмо-Про» у своєму складі містить два компоненти: *Streptococcus pneumoniae* та спиртово-водний екстракт прополісу, який володіє протизапальними та імуномодуючими властивостями. Доведена доцільність застосування імунопрофілактичних засобів, виготовлених з місцевих ізолятів збудника інфекції з метою підвищення резистентності тварин.

Ключові слова: пневмококова інфекція; *Streptococcus pneumoniae*; імунопрофілактика; ад'ювант; прополіс

Серед усіх патологій сільськогосподарських тварин, обумовлених технологією утримання та годівлі, чільне місце займають хвороби молодняку бактеріальної етіології. В умовах промислового вирощування великої рогатої худоби найбільший відсоток захворювань припадає на різні респіраторні та шлунково-кишкові захворювання. Фактори сучасної промислової технології істотно знижують стійкість тварин до інфекційних захворювань, особливо до тих, збудниками яких є умовно-патогенні бактерії. Тому за останні роки рівень захворюваності тварин з ураженням органів дихання не знижується, а навпаки має тенденцію до зростання. Респіраторні захворювання великої рогатої худоби є однією з основних причин економічних втрат у промисловому скотарстві. Ці економічні збитки зумовлені підвищеною смертністю, зниженням приросту живої маси тварин, а також витратами на лікування тварин та профілактику захворювання.

Респіраторні захворювання реєструються в основному, в молодняку великої рогатої худоби 1-6 місячного віку. Патогенез респіраторних захворювань обумовлений взаємодією стресів, пов'язаних з навколишнім середовищем, фізіологічним станом, асоційованими інфекціями тощо. Найчастіше екзогенними факторами бронхопневмонії є підвищена вологість повітря в приміщенні, сирі підлоги і стіни, утримання без підстилки на цементних підлогах, перетяги, надмірне накопичення аміаку, сірководню тощо. У ранньо-весняний період і восени, внаслідок нестійкої погоди та різкої зміни температури повітря протягом доби, захворюваність значно зростає. Первинні бронхопневмонії виникають при порушенні санітарно-гігієнічного режиму утримання, і в результаті зниження природної резистентності молодого організму, зумовленої недостатньою або неповноцінною годівлею маточного поголів'я. Обидві групи факторів діють взаємопов'язано. Це означає, що низький імунний стан приплоду підвищує його чутливість до змін зовнішнього середовища, а незадовільний мікроклімат, у свою чергу, посилює схильність слабого приплоду до захворювання органів дихання (Kopratkin, 1992; Gutyj et al., 2016; Gutyj et al., 2017).

Пневмококові інфекції – це група широко поширених антропозоонозних хвороб, що викликаються *Streptococcus pneumoniae* та супроводжуються запальними процесами у легенях, появою артритів. Проявляється при гострому перебігу септицемією, при підгострому і хронічному – переважним ураженням респіраторних органів, селезінки, органів шлунково-кишкового тракту, суглобів. У дорослих маток проявляється ендометритами і маститами. Пневмокок відомий як основний збудник пневмонії з 80-х рр. XIX століття. Присвячені йому дослідження відіграли важливу роль у формуванні сучасних уявлень про гуморальний імунітет. Ще наприкінці XIX століття було встановлено, що кролі, імунізовані інактивованими пневмококами, не хворіють пневмококовою інфекцією. Сироватка імунізованих кролів і сироватка людей, які перенесли пневмококову пневмонію, теж володіли захисними властивостями. З'ясувалося, що захист *Streptococcus pneumoniae* від фагоцитозу здійснює його капсула. У 20-х роках 20-го століття були відкриті антитіла до капсульних полісахаридів, що полегшують фагоцитоз. Домінуючим фактором у розвитку пневмококової інфекції є низька резистентність організму. Вірулентність мікроорганізмів важлива у розвитку захворювання, але чільна роль належить здатності організму протистояти їм. Тому, першорядне завдання у профілактиці пневмококозу та інших хвороб, що викликаються умовно-патогенними мікроорганізмами, полягає у підвищенні захисних сил організму (Kostomahin, 2009).

Присвоєна пневмококам у 1926 р. назва *Diplococcus pneumoniae* відображала його морфологічний стан в забарвлених за Грамом препаратах мокротиння. У 1974 р. його перейменували в *Streptococcus pneumoniae*, з'ясувалося, що в рідких середовищах він утворює ланцюжки. *Streptococcus pneumoniae* відноситься до родини *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*. У препаратах із свіжого матеріалу розміщується парами, зовнішні кінці загострені, можуть зустрічатись у вигляді коротких ланцюжків. В організмі збудник утворює капсулу, грампозитивний, каталазовід'ємний. Вимогливий до поживних середовищ, росте на кров'яному сироватковому МПА з глюкозою, на яких утворює дрібні прозорі колонії. Біохімічні властивості добре виражені – зброджує глюкозу, сахарозу, мальтозу, маніт з утворенням кислоти без газу (Kozlov, 2010).

Пневмококи поширені у природі. Вони часто виявляються на слизових оболонках верхніх дихальних шляхів, як епіфітна мікрофлора, а при зниженні резистентності організму вони викликають захворювання в зимово-весняний період, при масових розтелах корів. *Streptococcus pneumoniae* прикріплюється до епітелію слизової носоглотки завдяки взаємодії своїх адгезинів з рецепторами епітеліальних клітин, що містять дисахарид N-ацетилглюкозамін-(бета1-3)-галактозу. Звідти він проникає в бронхіоли і альвеоли (шляхом вдихання або аспірації), при порушенні захисних механізмів призводить до розвитку пневмонії. На поверхні активованих цитокінами альвеолоцитів експресуються рецептори до фактору активації тромбоцитів. З цими рецепторами і зв'язується фосфорилхолін С-полісахариду пневмококів. Пневмококи, проникнувши у ті анатомічні ділянки, де їх в нормі не буває, запускають класичний і альтернативний

шляхи активації комплементу і стимулюють утворення цитокінів, притягуючи нейтрофіли. Проте, від фагоцитозу пневмококи захищає полісахаридна капсула. За відсутності антитіл до капсульних антигенів альвеолярні макрофаги не здатні захоплювати і знищувати пневмококи. Одним з найважливіших вроджених механічних механізмів захисту організму від пневмококів є нейтрофільні гранулоцити, які відповідають за фагоцитоз та екзоцитоз (Narayana et al., 2013; Yipp, 2013; Kruger et al., 2015; Bachhaus et al., 2016; Moorthy et al., 2016). Розроблений метод фаготипування за Хемптоном, який дозволяє визначити частоту опсонофагоцитозу та покращувати процес знищення патогену, зокрема, капсульних пневмококів (Itakura and McCarty, 2013; Parker et al., 2014; Nel et al., 2016). Ефективність фагоцитозу знижується при дефіциті Т- і В-клітинного імунітету у зв'язку з недостатністю опсонінових антикапсульних антитіл і нездатністю викликати лізис та аглютинацію бактерій. Пневмококова інфекція розвивається у тварин з розвинутим пригніченням фактора В. Нейтрофільні фагоцитози пневмококів є ключовим елементом захисту макроорганізму. Літературні дані вказують на те, що пневмолізін інгібує швидкість фагоцитозу нейтрофілами. Пневмолізін інгібує осадження комплементу на поверхні пневмококів і призводить до зниження фагоциту (Ramos-Sevillano et al., 2015). Ряд дослідників стверджують, що пневмолізін необхідний для утворення пневмококком біоплівки. Існує думка, що формування біоплівки, викликаного пневмолізином, відбувається з метою запобігання захоплення пневмококів нейтрофілами (Shak et al., 2013).

Ризик формування бактеріємії при пневмококовій інфекції в основному залежить від наявності антитіл до типоспецифічних полісахаридів. За відсутності типоспецифічних антитіл елімінація пневмококів здійснюється ретикулоендотеліальною системою, зокрема, макрофагами селезінки і меншою мірою – печінки. Патогенність пневмококів обумовлена не тільки їх стійкістю до фагоцитозу, але і тим, що вони викликають запальну реакцію. Деякі компоненти пневмококів безпосередньо спричиняють шкідливу дію на тканини. Інкапсульовані пневмококи не захоплюються і не знищуються фагоцитами ні *in vivo*, ні *in vitro* за відсутності комплементу й антитіл до капсульних антигенів. Неінкапсульовані пневмококи майже ніколи не бувають збудниками захворювань у тварини (за винятком кон'юнктивіту). Пневмококи, котрі позбулися капсули в результаті мутації, в експериментах на лабораторних тваринах завжди авірулентні (Dzyublyk, 2010).

У значній частині тварин присутні антитіла до білку PspA і інших компонентів пневмокока, наприклад до пневмолізіну, які також беруть участь в неспецифічному захисті організму від пневмококової інфекції. Проте, у здорових тварин Ig G-антитіл до більшості типоспецифічних антигенів, як правило, немає. Вони з'являються в результаті носійства, активізації збудника хвороби або імунізації. У перші тижні носійства захист від інфекції здійснюється неспецифічними механізмами. Надалі починають синтезуватися антитіла до капсульних полісахаридних антигенів, що забезпечують специфічний захист. Якщо ж у тварин проявляється неспроможність неспецифічного механізму захисту, вони можуть захворіти пневмонією до того, як почнуть синтезуватися типоспецифічні антитіла. Пневмококи не передаються від телят до дорослої ВРХ навіть в умовах тісного контакту, що свідчить про наявність ефективного імунологічного бар'єру у дорослих тварин. У телят з недостатністю гуморального імунітету ризик пневмококової інфекції зберігається протягом усього періоду носійства. При порушеннях фагоцитарної функції нейтрофілів і макрофагів або синтезу Ig G ризик пневмококової інфекції зростає. Схильність дорослої худоби до пневмонії обумовлена старінням імунної системи, зокрема, зниженням синтезу імуноглобулінів, а також хронічними захворюваннями і виснаженням (Vorobyuev, 2012).

У системі заходів боротьби з пневмококовою інфекцією великої рогатої худоби широке застосування отримали імунопрофілактика і різні хіміотерапевтичні засоби. У 1940-1950 рр. завдяки успіхам хіміотерапії, зокрема широкому впровадженню в клінічну практику ветеринарії пеніциліну, склалося враження про зниження ролі пневмококової інфекції. Проте, на даний час очевидна недооцінка адаптаційних і еволюційних можливостей даного мікроорганізму. Проблема лікарської стійкості мікроорганізмів та пов'язане з цим зниження терапевтичної ефективності антибактеріальних лікарських засобів вимагають пошуку нових лікарських та імунопрофілактичних засобів, або їх комбінацій, що володіють вираженою антимікробною дією, в тому числі на резистентні штами мікроорганізмів. Так, за даними цілого ряду дослідників (Музука, 2013; Vasin, 2014; Музука, 2014), невиправдане широке застосування препаратів на основі гентаміцину, хлорамфеніколу, тетрацикліну у ветеринарній практиці призвело до різкого зниження їх ефективності при бактеріальних інфекціях у людей за рахунок розвитку перехресної резистентності у мікроорганізмів (Музука, 2015).

Ефективність вакцин залежить від видового і серотипового складу, який не завжди відповідає штамам, які виділяються в період захворювання. Необхідно зазначити, що імунні реакції організму тварин є специфічними до кожного із серотипів збудника інфекції. На сьогоднішній день у гуманній медицині для імунопрофілактики інфекційних захворювань бактеріальної етіології застосовують кон'юговані вакцини, зокрема проти *Neisseria meningitidis* та *Streptococcus pneumoniae* (Le Doare and Heath, 2013; Pichichero, 2013).

Вакцини для ветеринарної медицини не потребують вкрай ретельного очищення і можуть вводитися разом з білком поживного середовища, не викликаючи при цьому побічних реакцій. У порівнянні з інактивованими або ослабленими живими вакцинами субодичні вакцини, що складаються з консервативних білків, є більш безпечними та більш незалежними від серотипу (He Y et al., 2014). Проте слабка імуногенність є основним обмеженням розвитку субодичної вакцини. Таким чином, використання ад'ювантів у вакцинах є надзвичайно необхідним і важливим. Ад'юванти являють собою групу структурно гетерогенних сполук, які можуть посилювати імунну відповідь вакцини та модулювати внутрішню імуногенність антигену, тим самим підвищуючи захисний імунітет від захворювань (Tafalla et al., 2013). Такі вакцини в якості ад'юванта містять солі алюмінію, масла та прополіс (Zheng et al., 2012; Vinay et al., 2014).

Головна дія ад'ювантів – це утримання антигену в місці його введення, утворення так званого «депо». Тому, подальше поступове звільнення антигену з такого «депо» призводить до вторинної імунної відповіді після первинного стимулювання, обумовленого раніше звільненою частиною антигену.

Термін «ад'ювант» часто використовується як синонім поняття «імуномодулятор», хоча насправді імуностимулятори – це, як правило, однокомпонентні речовини, що володіють власними імуностимулюючими або імуномодулюючими властивостями, а АД-комбінації або АД-системи можуть складатися з декількох різних речовин з різними функціями та активністю.

Крім мінерально-сольових і масляних ад'ювантів застосовуються ад'юванти з природних субстратів: прості і складні білки, глікопротеїни, пептиди, полісахариди, нуклеїнові кислоти, інтерлейкіни та ін. Вони не створюють в організмі так зване «депо» антигенів, але при введенні їх в організм різними методами такі ад'юванти стимулюють антитілоутворення і підвищують активність лімфоцитів. Такі сполуки називають ще ад'ювантами прямої дії. Серед таких речовин одне з провідних місць займає прополіс – природний імуностимулятор (Zaeemzadeh, 2010).

Препарати, які застосовуються для імунокорекції, мають різну природу і механізм дії, їх об'єднує одна основна властивість – здатність відновлювати порушені імунологічні параметри. Розвиток молекулярної імунології дозволив створити принципово новий клас біологічних препаратів – імуномодуляторів, які здатні впливати на імунореактивність організму тварин. Імуномодулюючими засобами є препарати хімічної або біологічної природи, які здатні модулювати (стимулювати або пригнічувати) реакції імунітету внаслідок впливу на імунокомпетентні клітини та процеси їхньої міграції або взаємодію таких клітин і їхніх продуктів (лімфокіни, монокіни, антитіла та ін.) з відповідними мішенями (Vozrova, 2014).

До ослаблених або вбитих антигенів (вірусів або бактерій), вакцини містять дуже невелику кількість інших інгредієнтів – наповнювачів або середовищ. Деякі допоміжні речовини додаються до вакцини з певною метою. До них відносяться: консерванти, щоб запобігти забрудненню (наприклад, тіомерсал); ад'юванти, що допомагають стимулювати сильніше імунну відповідь (наприклад, солі алюмінію); стабілізатори, щоб зберегти вакцину потужну під час транспортування та зберігання (наприклад, цукри або желатин); залишкові сліди кількості матеріалів, які використовувались під час виробничого процесу та видалялися (яєчний білок, різні культурні середовища, формальдегід тощо); антибіотики, що використовуються для профілактики забруднення бактеріями (наприклад, неоміцин) (Grabenstein, 2013). У таблиці 1 перелічено всі компоненти, крім антигенів, що вказані на упаковці для кожної із комерційних протипневмококових вакцин, які застосовуються у гуманній та ветеринарній практичній медицині.

Таблиця 1. Компонентний склад вакцин проти пневмококової інфекції, які застосовують у гуманній та ветеринарній медицині

Назва вакцини	Вміст
Pneumococcal (PCV13 Prevnar 13)	-соєвий пептонний бульйон, казамінокислоти та середовище на основі екстракту дріжджів, білок-носії CRM197, полісорбат 80, сукцинатний буфер, фосфат алюмінію
Pneumococcal (PPSV-23 Pnevovax)	- Фенол
ССІТ (Вакцина проти кокових інфекцій)	гідроокис алюмінію, формалін

В.А. Есепенок розробив декілька інактивованих вакцин і запропонував їх для ветеринарної практики: проти стрептококозу і пастерельозу нутрій, проти стрептококозу нутрій, проти стрептококозу великої рогатої худоби. Особливий інтерес представляє вакцина проти стрептококозу великої рогатої худоби, яка містить антиген – штам *S. zooepidemicus*, який найчастіше виділяється і викликає захворювання у птахів. Розроблена вакцина випробовувалася у виробничих умовах в Росії. На думку автора, застосування даного біопрепарату дозволяє оздоровити господарства, в яких реєструється збудник стрептококозу із штамом *S. zooepidemicus* (Esepenok, 2002).

Науковці ІЕКВМ, м. Харків, розробили асоційовану вакцину проти стрептококових і стафілококових інфекцій тварин «Вакцина ССІТ», призначену для профілактики стрептококових, ентерококових і стафілококових захворювань тварин. Дана вакцина була використана нами в якості прототипу під час розробки імунопрофілактичного засобу «Пневмо-Про». До складу вакцини ССІТ входять екзотоксини виробничих штамів збудників інфекції: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*. В якості ад'юванта та інактивуєчої речовини використано гідроксид алюмінію та формальдегід. Недоліками даного імунобіологічного препарату є недоступність на вітчизняному ринку, технологічна складність виготовлення і використання ад'юванта гідроокису алюмінію (Ushkalov, 2004).

Токсичність алюмінію для біологічних систем добре відома, а специфічні впливи алюмінію на нервову систему широко документовані. Встановлено, що фосфат алюмінію, основна складова ад'юванта Хольта, при введенні інтрацеребрально викликає у кролів дегенерацію та гістологічні зміни в нейронах за типом нейрофібрилярних клубочків. Після введення сполук алюмінію тварини також страждали від судом. Брак інформації щодо нейротоксичності сполук алюмінію пояснюється тим, що відповідно до чинних нормативів, оцінка фармакокінетичних властивостей вакцин не є обов'язковою (Sanofi, 2010).

Для конструювання інактивованих вакцин та їх максимальної ефективності вкрай важливим етапом поряд з високоімуногенним ізолятом є підбір ад'юванту, що володів би найбільшою сорбуючою дією та імуностимулюючим ефектом. Такими д'ювантами можуть слугувати 3% гель гідроксиду алюмінію (ГОА), кремнієва емульсія чи мінеральна олія у сіміші з аеросилом. Тому при розробці будь-яких імунопрофілактичних препаратів необхідним етапом є підбір найбільш ефективного за імуностимулюючою дією ад'юванту (Guljanuch et al., 2016).

Велика кількість наукових досліджень присвячена вивченню антимікробних та ад'ювантних властивостей прополісу. Прополіс — універсальна бактерицидна речовина, завдяки вмісту в ньому декількох десятків біологічно активних сполук, що володіють антибактеріальними властивостями. За ступенем активності він перевищує антибіотики, впливаючи навіть на антибіотикорезистентні мікроорганізми. Спиртові витяжки прополісу мають більше виражену бактерицидну активність порівняно з нативним прополісом. Водні екстракти більш активні порівняно зі спиртовими. Антибактеріальні речовини водних екстрактів термостійкі. Прополіс є натуральним продуктом, що демонструє імуномодулюючу, протизапальну, антимікробну, протипухлинну, антиоксидантну, противірусну, антипаразитарну та антидіабетичну активність (El Sayed and Ahmad, 2012), завдяки якій прополіс розглядається як потенційний ад'ювант у ветеринарних вакцинах. Експериментальні дослідження показали, що прополіс завдяки його протизапальним і антиоксидантним властивостям попереджає розвиток пневмонії. Не дивлячись на наявність антибактеріальних властивостей, тривале застосування прополісу не приводить до дисбактеріозу. Встановлено, що 4 %-ий спиртово-водний екстракт прополісу (Levkyvskaia, 2015; Levkivs'ka and Levkivskij, 2015) підвищує загальну резистентність та імунологічну реактивність організму, підтверджена його антимікробна і протизапальна дія. Прополіс в якості ад'юванта при внутрічеревному введенні стимулює адаптивну імунну відповідь і посилює імунологічну пам'ять (Tafalla et al., 2013). Використання спиртово-водного екстракту прополісу в якості ад'юванта забезпечує протимікробний терапевтичний ефект, активацію специфічних та неспецифічних факторів імунітету. Завдяки діючим речовинам прополісу досягається протизапальна дія, стимуляція регенеративних процесів в організмі тварин. До складу прополісу входить велика кількість органічних сполук і мінеральних речовин. Протимікробну активність проявляють органічні кислоти, такі як: фірулова, корична, кофейна та бензойна. Імуностимулюючий ефект екстракту проявляється завдяки вітамінам, мікроелементам, біологічно активним речовинам (Gutyj et al., 2017).

Встановлено позитивний вплив прополісу на імуногенез. Рядом дослідників доведені імуностимулюючі властивості прополісу при введенні з сальмонельозним антигеном у формі масляного екстракту і вазелін-ланолінової суміші, доведено підвищення рівня лізоциму, бактерицидної та комплементарної активності сироватки крові, фагоцитарної активності лейкоцитів, загального білка, бета- і гамма фракцій при застосуванні спиртової емульсії і поліетіленгліколевого розчину прополісу на кролях і телятах (El Sayed and Ahmad, 2012).

Таким чином, перед нами була поставлена мета розробити імунопрофілактичний протипневмококовий засіб з використанням 4%-го спиртово-водного екстракту прополісу в якості одного із складників і визначити його нешкідливість та імуногенні властивості на білих мишах..

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводились в умовах ПАФ «Білий Стік» Сокальського арйону Львівської області, на базі кафедри епізоотології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Для проведення бактеріологічних досліджень відбирали ексудат із носових ходів телят з клінічними проявами респіраторних захворювань, а для порівняння досліджували ексудат із носових ходів здорових телят; із статевих органів корів, хворих на післяродовий ендометрит. Бактеріологічні дослідження з метою виділення культур *Streptococcus pneumoniae*, визначення концентрації бактеріальних клітин, проведення біопроб на лабораторних тваринах, визначення патогенності виділених та ідентифікованих штамів мікроорганізмів виконували за методикою Висоцького А. Е. із співавторами (Vysockyj et al., 2002; Levchenko et al., 2004). Бактеріальну завись досліджуваних культур кожної окремо вводили лабораторним тваринам у дозах 5×10^8 КУО/0,5 см³. Спостереження за тваринами проводили впродовж 14 діб. Культури вважали патогенними, якщо впродовж 14 діб була зареєстрована загибель тварин. Концентрацію живих мікроорганізмів у дозах для зараження визначали методом титрування на щільних поживних середовищах і виражали в колонієутворюючих одиницях (КУО). Для виготовлення профілактичного засобу проти пневмококової інфекції були відібрані етіологічно-значимі культури пневмококів, які володіли вираженими антигенними та імуногенними властивостями.

Методика приготування протипневмококового профілактичного препарату «Пнеumo-Про», до складу якого входить два компоненти: *Streptococcus pneumoniae* і 4 % спиртово-водний екстракт прополісу. Чисту культуру отримували, використовуючи біопробу на білих мишах. Для постановки біопробу 18-20-годинні бульйонні культури вводили внутрішньочеревно в дозі 0,5 см³ білим мишам масою 14-16 г та спостерігали упродовж 14 діб. Культуру вважали патогенною в разі загибелі інфікованих лабораторних тварин і наступним виділенням із плевральної рідини або крові серця культури з властивостями, характерними для вихідної культури.

В якості основного компонента була використана культура *Streptococcus pneumoniae* із найбільш патогенними властивостями. Інактивацію *Streptococcus pneumoniae* проводили фізичним методом на водяній бані при температурі у 70 °С упродовж 60 хв. Концентрацію інокуляту визначали за допомогою денситометра DEN-1. Інтерпретацію результатів (у вигляді одиниць Мак-Фарланда) здійснювали у відповідні числові значення концентрацій бактеріальних суспензій та їх оптичну щільність при λ у 550 нм. Для отримання 4 %-ого спиртово-водного екстракту прополісу до 25 г подрібненого прополісу додавали 75 мл абсолютного спирту. Отриману суміш настоювали 5-7 днів у закритому посуді,

періодично струшували, а потім фільтрували через фільтрувальний папір. Спиртовий екстракт розводили у підігрітій дистильованій воді у співвідношенні 1:6, ретельно змішуючи. Зразки препарату були досліджені на предмет відсутності контамінації бактеріальної і грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483.

У процесі розробки профілактичного засобу, визначення його нешкідливості було досліджено імуногенні властивості при різних співвідношеннях компонентів профілактичного засобу «Пневмо-Про». У дослідженнях використовували білих мишей. Для цього сформували одну контрольну і по три дослідних групи тварин для кожного із співвідношень компонентів профілактичного засобу «Пневмо-Про» по 10 голів у кожній групі. Тваринам 1-ї дослідної групи вводили профілактичний засіб із концентрацією інокуляту у $2 \cdot 10^9$ КУО, 2-ї дослідної групи – із концентрацією у $4 \cdot 10^9$ КУО, 3-ї дослідної групи – у $6 \cdot 10^9$ КУО у дозі $0,3 \text{ см}^3$ дворазово з інтервалом у 14 діб. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин у дозі $0,3 \text{ см}^3$ дворазово з інтервалом у 14 діб. За лабораторними тваринами проводили спостереження за змінами загального стану, наявністю реактивних змін у місці введення препарату протягом 21 доби. Після повторного введення препарату дослідних тварин заражали польовим штамом *Streptococcus pneumoniae* у дозі $0,5 \text{ см}^3$. Препарат вважали нешкідливим у тому випадку, якщо упродовж усього періоду спостереження за дослідними тваринами усі білі миші залишились живими, а також не було наявних місцевих й симптоматичних проявів, які могли бути спричинені профілактичним засобом.

Результати та обговорення

За результатами бактеріологічних досліджень матеріалу, відібраного у господарстві, були виділені стрептококи (49,5 %), ентеробактер (16,5 %), кишкова паличка (14,7 %), стафілококи (13,8 %), та 5,5 % протей (рис. 1).

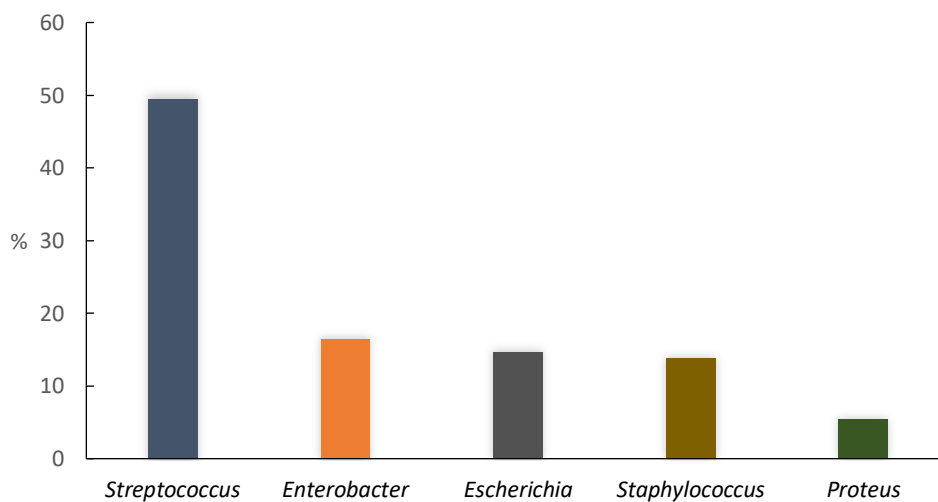


Рис. 1. Мікроорганізми, виділені при бактеріологічних дослідженнях

Встановлено видовий склад стрептококів. У 29 % випадків виділяються *S. pneumoniae*, 21 % – *S. pyogenes*, 17 % – *S. bovis*, 12 % – *S. agalactiae* та 21 % – інші види стрептококів з групи *viridans streptococci*, які не реагують зі стрептококовими сироватками та не ідентифіковані як *S. pneumoniae* (рис. 2).

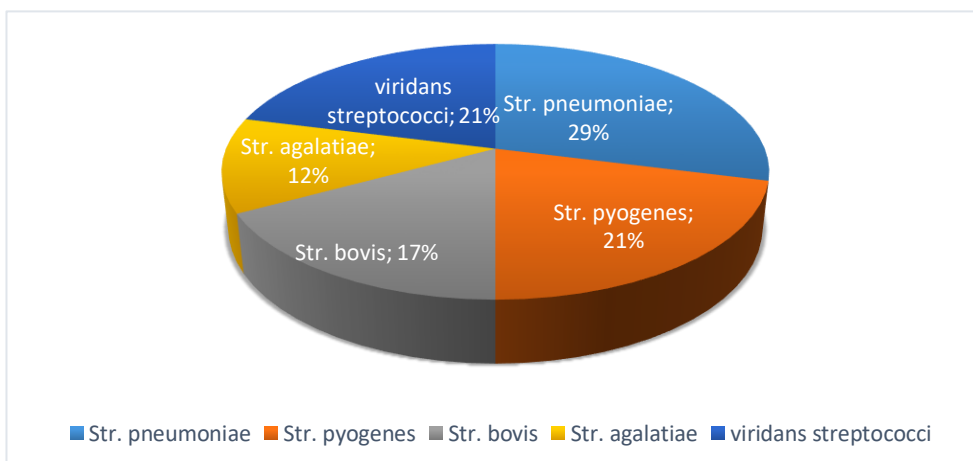


Рис. 2. Видовий склад ізольованих стрептококів

При посіві дослідного матеріалу на поживні середовища та при подальшій мікроскопії культур мікроорганізмів були виявлені та відібрані для подальших бактеріологічних досліджень культури капсульних пневмококів 106, 107, 108. При дослідженні *Streptococcus pneumoniae* ріст на спеціальних поживних середовищах спостерігався у всіх трьох досліджуваних культурах. Розмір колоній становив 1,5 (культура 106), 1,2 (культура 107) та 1,4 мм (культура 108). Розміщення мікроорганізмів попарне, у МПБ – короткими ланцюжками, вони не рухливі та не утворюють спор. Фарбуються за Грамом позитивно (стрептококи зафарбовані у синій колір). Розмір колоній у штамах варіює від 1,2 до 1,5 мм. На кров'яному МПА з додаванням 1% глюкози спостерігався ріст із вираженими плоскими колоніями блакитного кольору та утворенням чіткої зони α -гемолізу. Такий тип часткового гемолізу еритроцитів під впливом гемолізину здатні викликати пневмококи. При посіві на кров'яний агар бактерія продукує перекис водню, який окислює гемоглобін до зеленого метгемоглобіну – утворюється зона часткового α -гемолізу еритроцитів.

На сироватковому МПБ культура 106 викликала рівномірне помутніння, а у культурі 107 спостерігалось рівномірне помутніння із утворенням незначного осаду. Культура 108 характеризувалася утворенням незначного осаду. Біохімічними дослідженнями культур 106, 107, 108 встановлено розщеплення глюкози, мальтози та лактози. Розщеплення арабінози не спостерігалось у жодного із ізолятів, відмічалось розщеплення інуліну.

Проведеними дослідженнями біологічних властивостей на білих мишах (таблиця 2) встановлено, що культура 107 має більш виражену патогенну дію на організм піддослідних лабораторних тварин, викликавши їх загибель протягом 12 годин. Культури 106 та 108 володіють невисокою патогенністю, викликавши загибель тварин за 16 год (у концентрації $6,8 \times 10^4$ КУО) та за 36 годин із концентрацією $1,0 \times 10^6$ КУО відповідно.

Таблиця 2. Біологічні властивості культур *Streptococcus pneumoniae*

Показники	культури <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
LD ₅₀	6,8x10 ⁴ КУО	1,0x10 ⁴ КУО	1,0x10 ⁶ КУО
Термін загибелі білих мишей, год.	16	12	36

Чутливість виділених культур до антибактеріальних препаратів визначали дискодифузійним методом із стандартними розчинами антибіотиків визначеної концентрації (таблиця 3).

Таблиця 3. Чутливість культур *Streptococcus pneumoniae* до антибактеріальних препаратів

Назва препарату	культури <i>Streptococcus pneumoniae</i>								
	106			107			108		
Затримка росту, мм									
Енрофлоксацин	35	35	35	25	24	26	24	23	23
Фурадонізол	19	19	20	17	18	18	20	20	20
Ванкоміцин	17	18	17	-	-	-	17	18	18
Рифампіцин	24	22	23	22	21	21	24	25	24
Поліміксин В	13	12	14	18	19	19	12	11	12
Канаміцин	24	23	23	16	15	16	22	22	22
Цефалексин	14-20	16-21	15-18	-	-	-	-	-	-
Доксициклін	19	20	20	16	17	17	-	-	-
Офлоксацин	25-28	25-27	24-26	14	13	13	20	22	21
Гентаміцин	24	25	24	16	15	17	22	21	21
Стрептоміцин	16	16	17	-	-	-	-	-	-
Амоксициклін	18	17	18	-	-	-	14	15	14
Ампіцилін	14-18	13-18	14-17	-	-	-	12	12	13
Цефазолін	17	17	18	-	-	-	-	-	-
Лінкоміцин	12	11	11	-	-	-	15	15	16
Еритроміцин	22	22	23	20	22	20	-	-	-

Дослідження чутливості культур 106, 107 та 108 *Streptococcus pneumoniae* засвідчили, що всі культури чутливі до енрофлоксацину, висока чутливість у культури 106 до офлоксацину. Культура 107 резистентна до ванкоміцину, цефалексину, стрептоміцину, амоксицикліну, ампіциліну, цефазоліну та лінкоміцину, 108 резистентна до цефалексину, доксицикліну, стрептоміцину, цефазоліну та еритроміцину.

Результати досліджень імуногенних властивостей профілактичного засобу «Пневмо-Про» на білих мишах (таблиця 4) при різних співвідношеннях – *Streptococcus pneumoniae* / 4 % спиртово-водний екстракт прополісу (90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90 %) засвідчили, що концентрація інактивованого збудника у 4×10^9 КУО при співвідношенні *Streptococcus pneumoniae* 70 % і 4 % спиртово-водний екстракт прополісу 30 % забезпечує 100 % захист білих мишей після зараження їх летальними дозами польового штаму збудника, а також не було зареєстровано випадків захворювань тварин та запальних реакцій у місці введення препарату. У контрольній групі після зараження

польовим штамом збудника тварини загинули на 3-7 добу після зараження. Одержані результати досліджень свідчать, що дворазове введення профілактичного препарату «Пневмо-Про» у білих мишей при співвідношенні – 70 % *Streptococcus pneumoniae* і 30 % 4 % спиртово-водного екстракту прополісу стимулює забезпечення формування несприйнятливості організму до зараження їх летальними дозами збудника пневмококової інфекції.

Таблиця 4. Імуногенні властивості профілактичного засобу «Пневмо-Про» на білих мишах

Співвідношення <i>Streptococcus pneumoniae</i> / 4 % спиртово-водний екстракт прополісу (%)	Кількість тварин у групі	Концентрація інактивованого збудника у препараті при введенні тваринам дослідних груп, КУО	Заражено голів польовим штамом <i>S. pneumoniae</i>	Загибло тварин	% захисту
90/10	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	6	40
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	6	40
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	5	50
80/20	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	5	50
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	3	70
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	2	80
70/30	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	1	90
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	0	100
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	0	100
60/40	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	2	80
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	2	80
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	2	80
50/50	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	4	60
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	4	60
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	4	60
40/60	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	7	30
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	5	50
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	4	60
30/70	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	7	30
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	7	30
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	6	40
20/80	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	8	20
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	7	30
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	7	30
10/90	10	№ 1 – 2*10 ⁹	10	9	10
	10	№ 2 – 4*10 ⁹	10	9	10
	10	№ 3 – 6*10 ⁹	10	8	20
Контрольна група	10	фізіологічний розчин	10	10	0

Висновки

Циркулююча мікрофлора приватної агрофірми «Білий Стік» Сокальського району Львівської області містила такий видовий склад: стрептококи (49,5 %), ентеробактер (16,5 %), кишкова паличка (14, 7 %), стафілококи (13,8 %), та 5,5 % протей.

Із виділених стрептококів у процентному співвідношенні 29 % склали *S. pneumoniae*, 21 % – *S. pyogenes*, 17 % – *S. bovis*, 12 % – *S. agalactiae* та 21 % – інші види стрептококів з групи *viridans streptococci*.

Концентрація інактивованого збудника у 4*10⁹ КУО при співвідношенні *Streptococcus pneumoniae* 70% і 4 % спиртово-водний екстракт прополісу 30% забезпечує 100 % захист білих мишей після зараження їх летальними дозами польового штаму збудника.

References

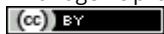
- Andrews, A.H. (2000). Calf pneumonia costs! *Cattle pract.*, 8, 111–114.
- Backhaus, E., Berg, S., Andersson, R. (2016). Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. *BMC Infect Dis*, 16, 367.
- Bozrova, S.V., Levitsky, V.A., Nedospasov, S.A., Drutskaya, M.S. (2014). Imiquimod: The biochemical mechanisms of immunomodulatory and anti-inflammatory activity. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 7(2), 136-145.

- Burman, L.A. (1985). Invasive pneumococcal infections: Incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis*, 7, 133.
- Dzjublik, Ja.O. (2010). Pnevmonokokova infekcija: stan problemi v sviti ta v Ukraïni [Pneumococcal infection: problem in Ukraine and world]. *Ukraïns'kij himioterapevtichnij zhurnal*, 1-2 (23), 22-27 (in Ukrainian).
- El Sayed, H., Ahmad, T.A. (2012). The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine*, 631, 31-39.
- Grabenstein, J.D. (2013). *ImmunoFacts: Vaccines and Immunologic Drugs* (38th revision). St Louis, MO: Wolters Kluwer Health.
- Guljanych, M.M., Nedosjekov, V.V., Godovs'kyj, O.V. (2016). Pidbir ad'juvantu dlja konstruivannja inaktyvovanoi' vakcyny proty infekciynogo rynotrahei'tu velykoi' rogatoi' hudoby [Selection of adjuvants for the construction of inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis]. *Veterynarna biotehnologija*, 29, 93-99 (in Ukrainian).
- Gutyj, B. V., Hufriy, D. F., Hunchak, V. M., Khariv, I. I., Levkivska, N. D., & Huberuk, V. O. (2016). The influence of metisevit and metifen on the intensity of lipid per oxidation in the blood of bulls on nitrate load. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(70), 67-70 doi: <http://dx.doi.org/10.15421/nvlvet7015>.
- Gutyj, B., Grymak, Y., Drach, M., Bilyk, O., Matsjuk, O., Magrelo, N., Zmiya, M., Katsaraba, O. (2017). The impact of endogenous intoxication on biochemical indicators of blood of pregnant cows. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 438-443. doi: [10.15421/021768](http://dx.doi.org/10.15421/021768).
- Gutyj, B., Khariv, I., Binkevych, V., Binkevych, O., Levkivska, N., Levkivskyj, D., & Vavrysevich, Y. (2017). Research on acute and chronic toxicity of the experimental drug Amprolinsyl. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(1), 41-45.
- Gutyj, B., Martyshchuk, T., Bushueva, I., Semeniv, B., Parchenko, V., Kaplaushenko, A., Magrelo, N., Hirkovyy, A., Musiy, L., & Murska, S. (2017). Morphological and biochemical indicators of blood of rats poisoned by carbon tetrachloride and subject to action of liposomal preparation. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 304-309. doi: [10.15421/021748](http://dx.doi.org/10.15421/021748).
- Gutyj, B., Nazaruk, N., Levkivska, A., Shcherbatyj, A., Sobolev, A., Vavrysevych, J., Hachak, Y., Bilyk, O., Vishchur, V., Guta, Z. (2017). The influence of nitrate and cadmium load on protein and nitric metabolism in young cattle. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(2), 9-13. doi: http://dx.doi.org/10.15421/2017_14.
- He, Y., Wang, K.-Y., Xiao, D., Chen, D.-F., Huang, L., Liu, T., Wang, J., Geng, Y., Wang, E.-L., Yang, Q. (2014). A recombinant truncated surface immunogenic protein (tSip) plus adjuvant FIA confers active protection against Group B streptococcus infection in tilapia. *Vaccine*, 32, 7025-7032. doi: [10.1016/j.vaccine.2014.08.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.017).
- Itakura, A., McCarty, O.J. (2013). Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 305, 348-354.
- Kisera, Ja.V., Storchak, Ju.G. (2013). Vychennja mikrobiologichnyh vlastyvostryj Streptococcus pneumoniae [Studying pathogenic properties of Streptococcus pneumoniae]. *Naukovyj visnyk L'vivs'kogo nacional'nogo universytetu veterynarnoi' medycyny ta biotehnologij imeni S. Z. Gzhyck'kogo*, 15, 3(57), 136-139 (in Ukrainian).
- Konopatkin, A.A., Vladimirov, V.A., Masimov, N.A., Meshev, Je.M. (1992). Dinamika zaboлеваemosti teljat smeshannymi respiratornymi infekcijami v uslovijah krupnogo otkormochnogo kompleksa. *Problemy nauchnogo obespechenija povyshenija jeffektivnosti sel'skohozjajstvennogo proizvodstva: Tez. dokl. Kyrg. s.-h. in-ta im. K. I. Skrjabina – Beshkek*, 11, 148-149.
- Kostomahin, N.M. (2009). *Skotovodstvo*. Lan'.
- Kovalev, N., Krasochko, P., Nanosov, J. (2016). Biologicheskie preparaty dlja profilaktiki virusnyh zabolevanij zhivotnyh: razrabotka i proizvodstvo v Belarusi [Biologic preparations for the prevention of viral diseases of animals: development and production in Belarus]. Minsk (in Russian).
- Kozlov, R.S. (2010). *Pnevmonokki: uroki proshlogo – vzgljad v budushhee*. Smolensk: MAKMAH.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N. (2015). Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLOS Pathog*, 11, e1004651.
- Le Doare, K., Heath, P. (2013). An overview of global GBS epidemiology, 31 (4), 7-12.
- Levchenko, V.I., Vlizlo, V.V., Kondrahin, I.P. (2004). Klinichna diagnostyka vnutrishnih hvorob tvaryn [Clinical diagnostic of animal internal diseases]. Bila Cerkva (in Ukrainian).
- Levkiv's'ka, N.D., Levkiv's'kyj, D.M. (2015). Pokaznyky nespecyfichnoi' rezystentnosti organizmu teljat za likuvannja kataral'noi' bronhopnevmonii' [Indices of non-specific resistance of calves in the treatment of catarrhal bronchopneumonia]. *Naukovyj visnyk LNUVM ta BT imeni S.Z. Gzhyck'kogo*, 17, 1(61), 87-94 (in Ukrainian).
- Levkiv's'kaja, N.D. (2015). Pokazateli nespecyfycheskoj rezystentnosti organyzma teljat pry lecheny kataral'noj bronhopnevmonyy [Indices of non-specific resistance of calves in the treatment of catarrhal bronchopneumonia]. *Mezhdunarodnyj nauchno-praktycheskyj zhurnal. RUP «Instytut eksperymental'noj veterynaryj ym. S.N. Vyshesl'skogo»*, 39-46 (in Russian).
- Moorthy, A.N., Rai, P., Jiao, H. (2016). Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget*, 7, 19327-19340.
- Muzyka, V.P. (2014). Ocinka nebezpeky rozvytku antybiotykozystentnosti jak skladova analizu ryzyku dlja ljudyj [Assessment of the risk of development of antibiotic resistance as a component of risk analysis for humans]. *Veterynarna medycyna: Mizhvidomchyj tematichnyj naukovyj zbirnyk*, 99, 60-65 (in Ukrainian).
- Muzyka, V.P., Stec'ko, T.I., Kupec'ka, O.V., Svjatoc'ka, L.O. (2013). Otrymannja antybiotykozystentnyh shtamiv mikroorganizmiv [Receiving antibiotic resistant strains of microorganisms]. *Metodychni vkazivky* (in Ukrainian).
- Muzyka, V.P., Stecko, T.I., Pashkovskaja, M.V. (2015). Antibiotikozystentnost' v veterinarnej medicine [Antibiotic resistance in veterinary medicine]. *Materialy V Mezhdunarodnogo sjezda veterinarnyh farmakologov i toksikologov «Aktual'nye problemy i innovacii v sovremennoj veterinarnej farmakologii i toksikologii»*. Vitebsk, 20-26 (in Russian).
- Narayana Moorthy, A., Narasaraju, T., Rai, P. (2013). In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Front Immunol*, 4, 56.

- Nel, J.G., Theron, A.J., Durandt, C. (2016). Pneumolysin activates neutrophil extracellular trap formation. *Clin Exp Immunol*, 184, 358-367.
- Panin, A.N., Esepenok, V.A., Gorbatova, H.S. (2002). Vakcina protiv streptokokkoza krupnogo rogatogo skota: Patent RF № 2179861.
- Parker, H.A., Magon, N.J., Green, J.N. (2014). Analysis of neutrophil bactericidal activity. *Methods Mol Biol.* 1124, 291-306.
- Pichichero, M. (2013) Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum Vaccin Immunother*, 9, 2505-2523.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun*, 83, 591-603.
- Rasmussen, S., Watson, A., Kennedy, E., Broder, K., Jamieson, D. (2013). Vaccines and pregnancy: past, present, and future. *Semin Fetal Neonatal Med*, 19, 161-169.
- Sanofi Pasteur MSD Limited. Revaxis: Summary of Product Characteristics. 2008. Available from: <http://www.medicines.org.uk/emc/document.aspx?documentid=15259/> Accessed on 17.11.2010.
- Shak, J.R., Ludewick, H.P., Howery, K.E. (2013). Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio*, 4, e00655-13.
- Tafalla, C., Bogwald, J., Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol*, 35, 1740-1750. doi: [10.1016/j.fsi.2013.02.029](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029).
- Ushkalov, V.O. (2004). Patent na korisnu model' № 41546 Ukraina, MPK7 A61K39/085. Sposib vigotovlennja vakcini proti streptokokovih ta/abo stafilokokovih infekcij u tvarin; In-t eksperimental'noi i klinichnoi veterinarnoi medicini UAAN.– Bjul, 6, 6.
- Vasyn, A. (2014). Kompleksnoe reshenye problemy respyratornyh zabolevanyj teljat. *Zhyvotnovodstvo Rossyy*, 3, 31–32 (in Russian).
- Vinay, T.-N., Park, C.-S., Kim, H.-Y., Jung, S.-J. (2013). Toxicity and dose determination of quillaja saponin, aluminum hydroxide and squalene in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Vet. Immunol. Immunopathol*, 158, 73-85. doi: [10.1016/j.vetimm.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.007).
- Vorob'ev, D.S., Semenova, I.B. (2012). Pnevkokokkovyj poverhnostnyj belok a i novye podhody k razrabotke pnevmokokkovykh vakcin. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*, 6, 107-113.
- Vysockyj, A.Je., Baranovskaja, Z.N. (2002). Spravochnyk po bakteryologicheskim metodam yzyskanyj v veterynaryj [Reference book on bacterial researches in veterinary medicine]. Izdatel'stvo Ministerstva sel'skogo hozjajstva Respubliki Belarus' (in Russian).
- Yipp, B.G., Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, 122, 2784-2794.
- Zaeemzadeh, N., Hemmati, A., Arzi, A., Jalali, M., Rashidi, I. (2011). Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Amiodarone-Induced Pulmonary Fibrosis in Rat–Iran. *J. Pharm. Res*, 10(2), 321-328.
- Zheng, Z., Yingeng, W., Qingyin, W., Nannan, D., Meijie, L., Jiangbo, Q., Bin, L., Lan, W. (2012). Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish Shellfish Immunol*, 32, 391–395. doi: [10.1016/j.fsi.2011.11.014](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.014).

Citation:

Kysera, Ya.V., Storchak, Yu.G., Gutyj, B.V. (2018). Experimental study of immunoprophylactic anti-pneumococcal medicine and its immunogenic properties. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 307–316.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
