

противочумной сыворотки. Наиболее эффективным иммуномодулятором оказался циклоферон, затем фоспренил и иммунофан, а наименьшим – риботан.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, чума собак, риботан, циклоферон, фоспренил, иммунофан.

#### EFFICIENCY OF DIFFERENT IMMUNOMODULATORS AT TREATMENT OF CARNIVARA DISTEMPER

Zhukova I.O., DVS, PhD., Tkachov O.V., Cand. agr. Sci., assistant., Yugay K.D., Cand. biol. Sci., lecturer., Bobrytska O.V., Cand. vet. Sci., lecturer., Antipin S.L., Cand. biol. Sci., lecturer., Kochevenko O.S., assistant.

Kharkiv State Zooveterinare akademy, Kharkiv

**Summary** The comparative evaluation of therapeutic efficiency of different immunomodulators when treating dogs having canine distemper, has been presented in the article. It has been found that the use of cycloferon, immunofan and phosprenile is much more effective than ribotan commonly used by practitioners. The comparative efficiency of the immunomodulators used was conducted without the use of antipestis serum. Cycloferon proved to be the most effective immunomodulator, then phosprenil and immunofan; ribotan proved to have the lowest efficiency.

**Key words:** immunomodulators, canine distemper, cycloferone, immunofan, phosprenile, ribotan.

УДК 616.606.446.638.2

## РОЗРОБКА МЕТОДИКИ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ІНАКТИВОВАНИХ ВАКЦИН ПРОТИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

**Завірюха Г.А., провідний науковий співробітник к.с/г.н**

*Державний центр інноваційних біотехнологій, м. Київ, Україна*

**Анотація.** Розроблено методику стандартизації вакцин проти злоякісної пухлинної хвороби великої рогатої худоби. Встановлено, що для профілактики і лікування хворих на лейкоз ВРХ придатні вакцини, які формують в організмі щеплених тварин (морські свинки, вівці, ВРХ) специфічний противірусний імунітет в титрі 1:2-1:8 за РІД.

**Ключові слова:** лейкоз великої рогатої худоби, реакція імунодифузії в агаровому гелі (РІД), імунізація, стандартизація.

Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби – небезпечна інфекційна хвороба, злоякісної пухлинної природи, з хронічним перебігом розвитку інфекційного процесу.

Збудником лейкозу є вірус типу С родини Retroviridae, роду Deltaretrovirus, який уражає кровотворну систему і супроводжується лімфоцитозом та формуванням злоякісних пухлин в лімфатичних вузлах, селезінці, органах і тканинах хворої худоби.

Природними розповсюджувачами збудника є кровосисні комахи (гедзі, мухи-жигалки, кліщі, комарі тощо). Не менш важливу роль в поширенні інфекції в стаді великої рогатої худоби відіграють нестерильні інструменти, якими користуються фахівці під час відбору крові для діагностичних лабораторних досліджень, проведенні парентеральних щеплень, ін'єкцій, кастрацій, нумерацій тощо.

**Актуальність проблеми.** Вагомим фактором поширення лейкозу є торгівля племінним молодняком з незареєстрованих неблагополучних щодо лейкозу ВРХ господарств. У 50% молодняку, що йде на продаж не виявляють в сироватці крові специфічні противірусні антитіла при дослідженні за реакцією імунодифузії [1]. У 5 – 30% тварини хворіють алейкемічною формою лейкозу [2] і їх не виявляють під час проведення гематологічних досліджень. Ефективною методикою є полімеразна ланцюгова реакція (ПРЛ), але застосування її вимагає високо чистих і дорогих реактивів, значних фінансових затрат та спеціального обладнання.

З відкриттям вірусу лейкозу [3] в доступній літературі з'явилися повідомлення про розробку специфічних вакцин з різних типів антигенів.

За даними Бусола В.О. (2008) для виготовлення протилейкозних вакцин використовувались:

– інактивованій вірус (Міллер Н.І. співавт., 1978, 1983; Бусол В.О. і співавт., 1994; Шаповалові О.В., 1998);

глюкопротеїди вірусу лейкозу (Окума С. і співавт., 1984; Ристай В. і співавт., 1987);  
– лейкоцити хворих на лейкоз в гематологічній стадії розвитку інфекції корів (Олтантер і співавт., 1988; Тейлен і співавт., 1982-1984; Кукайн Р.А. і співавт., 1989; Нагаєві Л.І. і співавт., 2001);  
– імуностимулюючі специфічні комплекси крові хворих на лейкоз тварин (Мерц С. І і співавт., 1991).

Однак, запропоновані вакцини не знайшли широкого впровадження у ветеринарній практиці через складність технології виготовлення, застосування та низькі імуногенні властивості.

Наприклад, Нагаєва Л.І. і співавт., [4] виготовила інактивовану вакцину з лімфоцитів хворих на лейкоз корів, яку застосовували фахівці фірми "Лейкопол". Використання вакцини в боротьбі з лейкозом ВРХ давали неоднозначні результати через відсутність методики стандартизації відповідних серій вакцини за показниками імуногенності. Вимоги до застосування вакцини практично не відрізнялись від вимог діючої інструкції [5], яка передбачає здачу на забій гематологічно хворих тварин, а РІД – позитивних ізолювати і згодом також здати на забій.

**Завдання дослідження.** У 1999 році нами (Завірюха А.І., Завірюха Г.А.) були завершені експериментальні лабораторні дослідження з розробки технології виготовлення інактивованої, імуногенної вакцини "Лейкозав" проти лейкозу великої рогатої худоби. Вакцина виявилась достатньо імуногенною, нетоксичною, нешкідливою і не спричиняла алергічних ускладнень.

Після щеплення вакциною піддослідних тварин (вівці, велика рогата худоба) у них формувалася специфічний протівірусний імунітет з титром антитіл 1:2 – 1:8, рідше 1:16 за реакцією імунодифузії в агаровому гелі (РІД). Тварини з такою напругою протівірусного імунітету були стійкі до експериментального зараження в умовах гострого досліду та спонтанного зараження в умовах епізоотологічного експерименту.

Щоб не допустити постачання неякісної вакцини на ринок біологічних препаратів, необхідно кожну серію виготовленої вакцини досліджувати на здатність її формувати у лабораторних тварин специфічний протівірусний імунітет відповідної напруги.

**Матеріал і методи дослідження.** Серію вакцини досліджували за такими тестами, зокрема: наявність сторонніх домішок, контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою (згідно ДСТУ 4483 : 2005), нешкідливість (підшкірні ін'єкції білим мишам), залишкова кількість формальдегіду, концентрація водневих іонів (рН) та імуногенну активність.

Дослідження на імуногенність. Відбирають п'ять клінічно здорових морських свинок масою 350 – 400 г. (три піддослідні, дві контрольні). Трьом піддослідним свинкам вводять в подушечки лівих задніх лапок по 0,3 см<sup>3</sup> вакцини з дотриманням правил асептики і антисептики. Контрольним свинкам вводять фізіологічний розчин в такій же дозі.

Через наступних п'ять днів вакцину вводять по 0,3 см<sup>3</sup> в подушечки правих задніх лапок. Контрольним тваринам вводять фізіологічний розчин.

Через наступних п'ять днів кожній піддослідній свинці вводять підшкірно в ділянці живота по 0,5 см<sup>3</sup> вакцини, а контрольним свинкам фізіологічний розчин в такій же дозі.

Через 10 днів після введення вакцини від усіх свинок відбирають по 5 см<sup>3</sup> крові і залишають для відстоювання сироватки. Беруть чотири ряди по 5 пробірок. Починаючи з другої пробірки, в кожну вносять по 1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. В першу і другу пробірку вносять нативну сироватку. В другій пробірці отримують розведення 1:2. Один сантиметр кубічний вмісту другої пробірки переносять в третю, а з третьої в четверту і так до кінця, отримуючи розведення 1:4 – 1:8. З останньої пробірки 1 см<sup>3</sup> вмісту виливають геть.

Реакцію імунодифузії ставлять за прийнятою у вірусології методикою [6]. В стерильну чашку наливають 15 см<sup>3</sup> 1,0 – 1,5% розчину агару, гель якого після охолодження залишається прозорим.

Спеціальним штампом вирізають три "зірки" по 6 лунок в кожній. Видаляють агарові пробки і на дно утворених лунок вносять пастерівською піпеткою з тонко відтягнутим кінцем по 1 краплі розплавленого агару, щоб загерметизувати дно і запобігти підтіканню компонентів реакції під агар. Після охолодження ставлять реакцію проти стандартного лейкозного антигену з нативною сироваткою і кожним її розведенням.

Компоненти реакції вносять в лунки автоматичною піпеткою із змінним стерильним наконечником об'ємом 0,4 см<sup>3</sup>. На кожний компонент реакції беруть окремий наконечник. В центральну лунку зірки вносять стандартний лейкозний антиген, а в периферійні за ходом годинникової стрілки – нативні сироватки та їх розведення.

Контроль антигену ставлять в окремій чашці. В центральну лунку вносять антиген, у лунку на 12 годин – позитивну сироватку з лейкозного набору, в лунку на 6 годин – сироватку свинки з контрольної групи. Накривку кожної чашки застилають шматком фільтрувального паперу для збору конденсату. Всі заправлені чашки, ставлять у вологу баню (ексикатор з водою на дні) на 72 години.

Облік реакції починають з обстеження контрольних чашок на наявність лінії преципітації між центральною лункою і лунками з нативними сироватками та їх розведеннями.

**Результати дослідження.** Вміст флакона з вакциною має вигляд непрозорої рідини, однорідної за консистенцією, темно-червоного кольору. Посіви в тіогліколеве середовище після їх інкубації впродовж 14 діб за температури 30 – 35°C та 20 – 25°C не виявили росту мікробів та грибів. Середовище не змінило свого кольору, що свідчить про стерильність вакцини. Залишкова кількість формальдегіду була в межах 0,4%, рН середовища 7,8. Білі безпородні миші масою 18 – 20 г щеплені підшкірно вакциною в ділянці кореня хвоста по 0,3 см<sup>3</sup> і 0,5 см<sup>3</sup>, впродовж 10 діб спостереження не хворіли і залишились здоровими.

Розроблена нами вакцина “Лейкозав” створює в організмі щеплених тварин специфічний імунітет достатньої напруги, який захищає їх від експериментального зараження вірусомісним матеріалом від гематологічно хворих на лейкоз тварин і від спонтанного зараження в умовах неблагополучного щодо лейкозу господарства. Однак під час виготовлення вакцини можуть бути допущені виробничі порушення а препарати з різних серій можуть бути неоднакові за своєю імуногенністю.

Щоб запобігти цьому, ми пропонуємо методику стандартизації вакцини шляхом імунізації морських свинок за показниками наявності і напруги поствакцинального імунітету.

Результати таких досліджень подані в таблиці 1.

Таблиця 1

**Результати досліджень за РІД сироваток крові морських свинок, щеплених вакциною “Лейкозав”**

№ тварини	Дослідження за РІД сироватки крові				
	нативна	розведення			
		1:2	1:4	1:8	1:16
<b>Дослід</b>					
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
<b>Контроль</b>					
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-

**Примітки:** (+) – позитивна, (-) – негативна

З даних табл. 1 видно, що після імунізації морських свинок вакциною Лейкозав у них формується специфічний противірусний імунітет з титром преципітуючих антитіл переважно 1:2 – 1:4, у окремих тварин – 1:8 в тест системі РІД з гр 51 антигеном ВРХ в агаровому гелі. Імунітет з такою напругою захищає піддослідних тварин від експериментального і спонтанного зараження.

Щоб підтвердити наявність захисних властивостей вакцини, ми провели дослід на вівцях віком 5 – 6 місяців. В гострий дослід було взято чотири вівці (3 дослідних і одна контрольна) віком 5-6 місяців. Тварин проімунізували вакциною підшкірно в дозі 2 см<sup>3</sup>, а через 21 день – ще 2см<sup>3</sup> (2+2 см<sup>3</sup>). Через місяць після введення вакцини у них сформувався противірусний імунітет з титром специфічних антитіл 1:2 – 1:8. Всі тварини були заражені підшкірно по 0,5см<sup>3</sup> крові хворої на лейкоз корови в гематологічній стадії розвитку хвороби (60,0 тис / мкл лейкоцитів і 86% лімфоцитів).

Через 6 міс після зараження у контрольній вівці виявили 12,0 тис/мкл лейкоцитів, 92,0% лімфоцитів. У трьох овець, щеплених вакциною, регулярно впродовж 2 – х років проводили дослідження крові. Змін характерних для захворювання їх на лейкоз не виявили і тварини були виведені з досліджу.

В неблагополучному по лейкозу ВРХ ПСП “Фастівецьке” Київської області 50 теличок віком 4 – 6 міс.були щеплені вакциною в дозі 2+2 см<sup>3</sup>. В наступні роки їх імунізували профілактично один раз на рік. Вони стали коровами, але ознак захворювання у них не виявлено.

Отримані результати наукових досліджень дають право зробити висновок, що вакцина Лейкозав, яка спричиняє противірусний імунітет у лабораторних тварин з напругою антитіл в титрі 1:2 – 1:8 придатна для застосування в боротьбі з лейкозом великої рогатої худоби.

**Висновки**

1. Вперше розроблена інактивована імуногенна вакцина Лейкозав проти лейкозу ВРХ, яка після парентерального щеплення формує у чутливих до лейкозу тварин специфічний противірусний імунітет здатний захистити їх від експериментального та спонтанного зараження.

2. Для успішної боротьби з лейкозом придатна така інактивована вакцина, на яку в організмі морських свинок формується специфічний протівірусний поствакцинальний імунітет з титром антитіл в РІД 1:2 – 1:8.

3. Вперше розроблена методика стандартизації протилейкозних вакцин на морських свинках, у яких на щеплену вакцину повинен формуватись протівірусний імунітет з титром специфічних антитіл в сироватці крові 1:2 – 1:8 в РІД.

#### Література

1. Бобров Н. Лейкоз КРС и некоторые формы его клинического проявления / Н. Бобров // Ветеринарная газета. – 2001. – № 2. – с.2– 3.
2. Смирнов П.Н. Что мешает быстро и эффективно оздоравливать стада от лейкоза / П.Н. Смирнов // Ветеринарная газета. – 2001. – № 2. – с.2.
3. Miller J.M., Miller Y.D., Olson C, Yilteffe K.Y. Virus — Like particles in phitohem – agglutinin simulated Lymphocyte cultures with reference to bovine Limfosarcoma // J. Natl. Cancer Inst. – 1969. – 43. – p. 1297 – 1305.
4. Нагаєва Л. І. Вірусологічне обґрунтування вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби та роль в системі оздоровчих заходів / Л.І. Нагаєва [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2001. – №7. – с.14 – 15.
5. Інструкція по профілактиці та оздоровленню великої рогатої худоби від лейкозу .– Київ.– №15– 15/220 – 28.09.1992.
6. Сюрин В.Н. Реакция диффузионной преципитации в агаре / В.Н. Сюрин //Руководство по ветеринарной вирусологии . – М. Колос. – 1966. – с.181 – 185.

#### РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Завирюха А.А.

Ведущий научный сотрудник к. с/х наук

*Государственный центр инновационных биотехнологий, г. Киев, Украина*

Аннотация. Разработана методика стандартизации вакцин против злокачественной опухолевой болезни крупного рогатого скота. Установлено, что для профилактики и лечения больного лейкозом КРС годны вакцины, которые формируют в организме привитых животных (морские свинки, овцы, КРС) специфический протівірусний імунітет в титре 1:2-1:8 по РІД.

Ключевые слова: лейкоз крупного рогатого скота, реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД), иммунизация, стандартизация.

#### ELABORATION OF METHOD OF BOVINE LEUKEMIA INACTIVE VACCINE STANDARTISATION

Zaviryucha H.A.

Leading Researcher of Agricultural Sciences

State Centre of Innovative Biotechnology. Kyiv, Ukraine

Summary. A method of standartisation of bovine leukemia vaccine is elaborated. There is proved that vaccines, which form specific antiviral immunity (titre 1:2-1:8 RID) in organism of vaccinated animals (quinea pigs, sheep, cattle) are applicable for treatment and prevention of patients with bovine leukemia.

Key words: bovin abstracte leukemia, immunodifuzii reaction in agar gel, immunization, standardization, abstract.