

ники вмісту загального кальцію, неорганічного фосфору були нижче фізіологічних коливань.

Таким чином, в результаті комплексних клініко-біохімічних та мас-спектрометричних досліджень організму високопродуктивних корів в південній геохімічній зоні України виявлено субклінічні форми остеодистрофії, кетозу, а також гіпомікроелементози, які характеризувалися ознаками кобальтової та відносної йодної недостатності. Клінічний прояв був виявлений при остеодистрофії у 2,3 % тварин та 6,3 % при гіпомікроелементозах.

Висновки.

1. У 16,9 % високопродуктивних лактуючих корів в південній геохімічній зоні України встановлено порушення мінерального обміну речовин, які характеризувалися зниженням вмісту загального кальцію та неорганічного фосфору лише у 3,6 % тварин. Морфологічні показники крові порівняно з нормою були знижені достовірно у 4,6 % корів.

2. Виявлені у корів остеодистрофія, кетоз та гіпомікроелементози мали переважно субклінічний перебіг, а лише у 2,3 % та 6,3 % тварин встановлено клінічну форму остеодистрофії та гіпомікроелементозів відповідно.

Список літератури

1. Долецький С.П. Стан мінерального обміну в організмі лактуючих корів західної геохімічної зони України. // Ветеринарна медицина України. – 2007. – №8. – С. 19. 2. Кондрахин И.П. Алиментарные и эндокринные болезни животных / М.: Агропромиздат, 1989. – 256 с. 3. Мікроелементози сільськогосподарських тварин / М.О. Судаков, М.І. Оніпенко, В.С. Козачок та ін.: За ред. М.О. Судакова. – К.: “Урожай”, 1974. – 150 с. 4. Фоновий вміст мікроелементів в ґрунтах України. – За ред. А.І.Фатеева і Я.В.Пашенко. – Х., 2003. – 117с.

STATE OF MINERAL EXCHANGE IN THE ORGANISM OF HIGH-PRODUCTIVE COWS IN THE SOUTH GEOCHEMICAL ZONE OF UKRAINE

Doletsky S.P.

Ukrainian Academy of Agrarian Sciences

Basic morphological and clinical-biochemical characteristics and up-to-date state of mineral exchange in the organism of high-productive cows in the south geochemical zone of Ukraine have been studied. The most spread diseases of lactation cows, which are caused by mineral metabolism disorder have been detected and analyzed.

УДК 619: 578.834.11:615.373

ВИВЧЕННЯ РІВНЯ ВІРУССПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ У ПТИЦІ ТА КРОЛІВ, ІМУНІЗОВАНИХ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

Драгуць С.С., Стегній М.Ю., Бреславець В.О., Стегній А.Б.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У роботі наведені дані щодо одержання специфічних до вірусу інфекційного бронхіту (ІБК) імунних сироваток від індиків та кролів. За допомогою реакцій затримки гемаглютинації (РЗГА), непрямой гемаглютинації (РНГА) та непрямого методу імуноферментного аналізу (ІФА) встановлено кореляційний зв'язок між рівнями антитіл до вірусу ІБК у сироватках крові імунізованих кролів та птиці.

Інфекційний бронхіт (Bronchitis infectiosa avium) – висококонтагіозне захворювання курей різного віку, яке викликається коронавірусом і проявляється респіраторними, нефрозо-нефритними синдромами та ураженням репродуктивних органів курей, що призводить до зниження несучості (на 30-40 %) та якості яєць [1]. Збудником інфекційного бронхіту курей (ІБК) є РНК-вміщуючий вірус родини Coronaviridae, антигенно варіабельний (більш за 20 серотипів), що створює труднощі при розробці засобів специфічної профілактики.

Більшість штамів вірусу інфекційного бронхіту не аглютинують еритроцити птиці, проте після оброблення фосфоліпазою С легко виникає гемаглютинація (ГА). Ензим модифікує оболонку вірусу внаслідок руйнування фосфоліпідів і сприяє появі на поверхні віріону ГА. Також ГА-властивості збудника ІБК проявляються після оброблення їх 0,5 % розчином трипсину (90 хв за 37 °С), який руйнує пептидні зв'язки аргініну та лізину поверхневих молекул вірусного білку та звільняє приховані молекули ГА [2]. За літературними даними В.Н. Сюрин та ін. (1998 р.), штам Конектікут аглютинують еритроцити курей. Штам Масачусетс та інші проявляють ці властивості в результаті дії на них ферментами (фосфоліпазою або трипсином) [2, 3].

У господарствах, де хвороба виникає вперше та курчата до 30-добового віку не містять материнські антитіла до вірусу, спостерігається великий відсоток їх загибелі. Хвороба так знижує резистентність птиці, що вона становиться тривалий час легко сприйнятливою до збудників інших хвороб.

До вірусу чутливі кури всіх вікових груп, але найбільш 7-45-добові курчата та доросла птиця в продуктивний період. Установлено вірусоносійство серед курей, індиків, фазанів, перепілок. У результаті бессимптомного протікання хвороби в курей відмічають лише зниження несучості та кладку деформованих яєць, а також зниження виводу курчат з яєць, отриманих від хворої птиці.

З метою профілактики ІБК фахівці ветеринарної медицини повинні постійно проводити серологічні моніторингові дослідження молодняку та батьківського поголів'я курей. У загрозованих до прояву цього захворювання господарствах птицю батьківського стада щеплюють інактивованою вакциною, а сприйнятливий молодняк – живими вірус-вакцинами [1].

Згідно з вимогами Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ), для оцінювання поствакцинальної відповіді використовують реакцію затримки гемаглютинації (РЗГА) та імуноферментний метод (ІФА) [4].

Вищезазначене свідчить про необхідність вивчення імунної відповіді птиці та тварин на дію безпечного вірусу ІБК, а також відпрацювання схеми їх гіперімунізації для одержання вірусспецифічних сироваток і реакцій згідно з вимогами національних нормативних документів та МЕБ [1-4].

Матеріали та методи. В роботі використано музейний вакцинний штам вірусу ІБК Н-120 Масачусетс, аутоентичність якого встановлена молекулярно-діагностичним дослідженням за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції та секвенуванням гену й який має гемаглютинуючі властивості.

Для напрацювання вірусвміщуючого матеріалу (екстраембріональної рідини) було проведено зараження 39-добових курячих ембріонів кросу «Рос-308» в алантоїсну порожнину. Доза зараження становила 1000 ЕІД_{50/см³} вірусу. Ембріони культивували протягом чотирьох діб за температури 37 °С. Загиблі протягом перших 24 годин культивування ембріони з досліду вилучали. Отриману вірусвміщуючу суміш контролювали на наявність вірусу за характерними патологоанатомічними змінами ембріонів («ефект карликовості» тощо), а також шляхом визначення його титру в реакції гемаглютинації (РГА), який становив 9 log₂.

Після перевірки на стерильність (висівами на м'ясо-пептонний агар та м'ясо-пептонний бульйон з додаванням 0,5 % глюкози, середовища тіоглюколеве та Сабуро) вірус інактивували загальноприйнятим методом за допомоги формальдегіду (0,5 % концентрація). З одержаного матеріалу виготовили емульсію методом додавання ад'юванту «Montanid ISA-70» (Франція) та змішуванням суміші впродовж 15 хвилин.

Для внутрішньовенних ін'єкцій застосовували комерційну живу вакцину проти інфекційного бронхіту курей зі штаму «Н-120» («Авівак-ІБК», Росія) та вищезазначений матеріал, який містив живий вірус.

Імунізації піддавали індиків 6-місячного віку породи біла широкогруда, кросу ВУТ та 3-місячних кролів породи шиншила.

Зразок інактивованої емульсованої вакцини вводили внутрішньом'язово індикам та кролям, відповідно, по 5,0 та 2,5 см³. Через 7 діб після першої імунізації індикам і кролям проводили повторні внутрішньовенні ін'єкції живою вакциною

проти інфекційного бронхіту з розрахунку по 200 та 100 доз, відповідно. Після другої імунізації через 7 діб аналогічно ввели живу вакцину, але в дозах, які у 2 рази перебільшували попередні. Четверта імунізація птиці та тварин, через 10 діб після третьої, включала внутрішньовенну інокуляцію матеріалу, який вміщував живий коронавірус, у кількості по 3 та 2 см³ на голову. Через 10 діб після останнього циклу імунізації (табл. 1) провели відбір сироваток, які зберігаються у замороженому стані за температури мінус 20 °С.

Таблиця 1 – Схема імунізації птиці та кролів

Вид птиці та тварин	Кількість голів	Цикли імунізації вірусним матеріалом				Через 10 діб після четвертої імунізації відбір сироваток
		I	II (через 7 діб після першої імунізації)	III (через 7 діб після другої імунізації)	IV (через 10 діб після третьої імунізації)	
		Зразок інактивованої емульсованої вакцини в/м із розрахунку на голову, см ³ :	Жива вакцина проти інфекційного бронхіту курей зі штаму Н-120 в/в із розрахунку на голову, доз:		Ембріональний матеріал, вміщуючий живий вірус в/в із розрахунку на голову, см ³ :	
Індики	3	5,0	200	400	3	
Кролі	3	2,5	100	200	2	

Примітка: в/м - внутрішньом'язово; в/в – внутрішньовенно.

Попередньо кожного наступного циклу імунізації, який складався з однієї ін'єкції, у кролів відбирали кров по 2-3 см³ з краєвої вушної вени, а в індиків – по 3-4 см³ з підкрильцевої вени. Отримані сироватки крові досліджували в реакціях згідно з рекомендаціями національних інструкцій та Міжнародного Епізоотичного Бюро (РЗГА, ІФА). У дослідках також використали реакцію РНГА, яка існує в арсеналі науковців та широко застосовується у практиці ветеринарної медицини. Методика постановки реакції загальноприйняті [2, 3]. Для досліджень у РЗГА та РНГА сироватки для звільнення від неспецифічних інгібіторів прогрівали на водяній бані впродовж 30 хвилин: пташині за температури 58 °С, кролячі – за температури 62 °С.

У РЗГА визначали антигемаглютинуючі антитіла. Антигеном у реакції служила стерильна інактивована екстраембріональна рідина курячих ембріонів, заражених вірусом ІБК («Н-120»), з активністю в реакції гемаглютинації (РГА) 9 log₂. При її постановці в горизонтальні лунки V-образного планшету вносили фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, рН 7,2-7,4) в об'ємі 0,025 см³. У першу лунку додавали рівний об'єм вірусвміщуючої рідини і робили їх подвійне розведення. В кожні лунки в об'ємі 0,025 см³ додавали ФСБ, потім – 1 % суспензію еритроцитів півнів-донорів. Планшет струшували обережними круговими рухами та залишали на 30 хвилин за температури 20 °С. За цей час у контролі еритроцити осідали у вигляді гудзика з рівними краями. При нахилі планшету та виявленні стікання еритроцитів визначали титр гемаглютинації, який проводили за найбільшим розведенням вірусного антигену, де спостерігали чітко виражену гемаглютинацію, тобто відсутність стікання еритроцитів.

Одночасно ставили контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію, для чого в три лунки вносили по 0,05 см³ ФСБ і додавали по 0,025 см³ 1 % суспензії еритроцитів. Аглютинація була відсутня.

Для приготування робочої дози 4 гемаглютинуючі одиниці (ГАО) антиген розводили ФСБ (рН 7,2-7,4) у співвідношенні 1:128.

Для визначення антигемаглютининів у РЗГА у всі лунки планшетів вносили по 0,025 см³ ФСБ. У перші лунки кожних горизонтальних рядів вносили сироватки у рівному об'ємі й методом подвійного послідовного розведення титрували їх, видаляючи з останніх лунок 0,025 см³ у дезрозчин. У всі лунки планшетів в об'ємі 0,025 см³

додавали антиген, що містив 4 ГАО вірусу та через 30 хвилин витримання за кімнатної температури – 1 % суспензію півнів. Через 30 хвилин за кімнатної температури проводили облік реакції (після осідання еритроцитів у контролі у вигляді гудзика з рівними краями).

Одночасно ставили контролю: 1) еритроцитів на спонтанну аглютинацію, для чого в три лунки вносили по 0,05 см³ ФСБ і додавали по 0,025 см³ 1 % суспензію еритроцитів, аглютинації не було; 2) сироваток на ізоаглютинацію (сироватка+ФСБ+1 % суспензія еритроцитів по 0,025 см³), аглютинація була відсутня; 3) робочої дози антигену 4 ГАО вірусу.

Для контролю антигену у п'ять лунок планшету вносили по 0,025 см³ ФСБ. У перші лунки додавали 0,025 см³ антигену в дозі 4 ГАО і проводили подвійні послідовні його розведення. В усі лунки в об'ємі 0,025 см³ вносили ФСБ, потім – 1 % суспензію еритроцитів. Після витримання 30 хвилин за температури 20 °С при нахилі планшету в перших двох лунках спостерігали аглютинацію еритроцитів у вигляді парасольки, у наступних лунках (трьох) – стікання еритроцитів. Діагностичний титр при використанні 4 ГАО вірусу – 4 log₂ (1:8).

РНГА проводили в круглодонних U- та гостродонних V-образних планшетах. У всі лунки планшетів вносили по 0,025 см³ 0,5 % гліцеринізованого фізіологічного розчину (ГФР, рН 7,2-7,4). У перші лунки вкрапляли в такому ж об'ємі дослідні сироватки. Розтитровували їх методом подвійних послідовних розведень, видаляючи з останньої лунки 0,025 см³ у дезрозчин. У рівному об'ємі додавали в робочому розведенні антиген еритроцитарний для діагностики інфекційного бронхіту курей, розроблений в ННЦ «ІЕКВМ» (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»). Через 60-120 хвилин за температури 20-22 °С; 30-60 хвилин за температури 37 °С та 16-18 годин за температури 2-8 °С проводили облік реакції. Останнє розведення сироваток, в якому спостерігали гемаглютинацію, тобто осідання еритроцитів на дно лунок у вигляді парасольки, а також відсутність стікання еритроцитів при нахилі планшетів, вважали за їх титр.

У контролі (ГФР+антиген еритроцитарний у робочому розведенні в об'ємі по 0,025 см³) реєстрували осідання еритроцитів у вигляді гудзика та при нахилі планшетів – їх стікання. Діагностичним вважали титр 3 log₂. При цьому реакція протікала швидше, а також точніше були результати при використанні V-образних планшетів у порівнянні з круглодонними.

Непрямим методом **ІФА** визначали специфічні антитіла в сироватках птиці до вірусу ІБК за допомогою комерційної імуноферментної тест-системи (ФГУ ВНДІЗТ, Росія).

Результати досліджень. У таблиці 2 представлена динаміка рівня антитіл до вірусу ІБК у процесі імунізації птиці та кролів.

Таблиця 2 – Динаміка рівня антитіл птиці та кролів, імунізованих проти ІБК

Вид птиці, тварин	Середній титр вірусспецифічних антитіл у РЗГА, РНГА (log ₂) та ІФА (титр)				
	До імунізації	Через 7 дів			Через 10 дів після четвертої імунізації
		після першої імунізації	після другої імунізації	після третьої імунізації	
Індики					
РЗГА	0	10,0 ± 1,00	13,0 ± 0,67	12,33 ± 0,67	10,33 ± 0,67
РНГА	1,00	3,00 ± 0,67	3,00 ± 0,33	1,33	4,33 ± 0,33
ІФА	740	5332 ± 156	9086 ± 460	2386 ± 79	3420
Кролі					
РЗГА	0	6,67 ± 0,67	5,67 ± 0,33	7,67 ± 0,67	10,33 ± 0,67
РНГА	0	0,33	3,67 ± 0,67	3,33 ± 0,33	1,67 ± 0,67

Наведені дані свідчать про відсутність до імунізації та поступове зростання титрів вірусспецифічних антитіл та антигемаглютининів у сироватках крові птиці та кролів після першого та другого циклів введення антигену. Після третьої інокуляції вірусного матеріалу індикам спостерігається тенденція щодо зниження рівня антитіл, тоді як через 10 діб після четвертого циклу вона зберігається лише щодо антигемаглютининів. Рівень антитіл, визначених у РНГА та ІФА, навпаки, підвищується.

Рівень антигемаглютининів у сироватках крові кролів поступово зростає й досягає максимуму через 10 діб після останнього введення вірусвміщуючого матеріалу. Рівень вірусспецифічних антитіл підвищується після другої імунізації, залишається стабільним після третього введення вакцини, але після останньої ін'єкції починає знижуватись.

При статистичній обробці отриманих результатів встановлений кореляційний зв'язок між середніми значеннями титрів специфічних до вірусу ІБК антитіл у сироватках кролів та птиці при імунізації, визначених у реакціях РЗГА, РНГА та ІФА (табл. 3).

Таблиця 3 – Кореляційний зв'язок між рівнями вірусспецифічних антитіл щодо ІБК

Серологічні реакції	Коефіцієнт кореляції при дослідженні сироваток крові (r)	
	індиків	кролів
РЗГА та РНГА	0,505	0,438
ІФА та РЗГА	0,606	-
ІФА та РНГА	0,508	-

Наведені в таблиці 3 дані вказують на наявність середнього рівня кореляційного взаємозв'язку між рівнями антитіл щодо вірусу ІБК у сироватках крові індиків та кролів, визначених за допомогою РНГА, РЗГА, ІФА.

Вивченням активності одержаних імуних сироваток встановили, що середні титри антитіл в індиків дорівнювали $10,33 \pm 0,67 \log_2$ в РЗГА, $4,33 \pm 0,33 \log_2$ в РНГА, 3420 в ІФА. Активність сироваток кролів у РЗГА та РНГА становила, відповідно, $10,33 \pm 0,67$ та $1,67 \pm 0,67 \log_2$.

Висновки. 1. Згідно з вимогами національних та міжнародних інструкцій відпрацьована методика РЗГА щодо визначення специфічних до вірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК) антитіл з використанням у якості антигену вірусвміщуючого ембріонального матеріалу (штам Н-120 Масачусетс).

2. Відпрацьована методика РНГА щодо виявлення специфічних до вірусу ІБК антитіл з використанням «Антигену еритроцитарного для діагностики інфекційного бронхіту курей», розробленого в ННЦ «ІЕКВМ» та виготовленого в ТОВ «НДП» Ветеринарна медицина». Встановлено, що при використанні гостродонних V-подібних планшетів у порівнянні з круглодонними U- подібних планшетами реакція протікає швидше, а також більш точний облік результатів.

3. За допомогою методів РЗГА, РНГА та комерційної тест-системи в ІФА (ФГУ ВНДІЗТ, Росія) в індиків та кролів при імунізації вивчена динаміка вірусспецифічних щодо ІБК антитіл. Встановлений кореляційний зв'язок між рівнями антитіл до вірусу ІБК у сироватках крові імунізованих кролів та птиці, визначених у реакціях РЗГА, РНГА та ІФА.

4. Дворазова імунізація індиків та кролів за запропонованою схемою забезпечує приріст специфічних до вірусу ІБК антитіл та дозволяє отримати активні сироватки. Внутрішньом'язове введення зразка інактивованої емульсованої вакцини (штам Н-120 вірусу ІБК) індикам та кролям по 5 см^3 та $2,5 \text{ см}^3$ на голову забезпечує через 7 діб формування вірусспецифічних антитіл на рівні $10 \pm 1,00 \log_2$ в РЗГА; $3 \pm 0,67 \log_2$ в РНГА; 5332 ± 156 в ІФА та $6,67 \pm 0,67$ в РЗГА, відповідно.

Список літератури

1. Інструкція про заходи з профілактики та ліквідації інфекційного бронхіту курей, затверджена Головним державним інспектором ветеринарної медицини України (наказ № 78 від 17.10.2001), зареєстрована в Міністерстві юстиції України 30 жовтня 2001 р. за № 916/6107. 2. Инфекционная патология

животных: В 2 т. / Под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина - М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – 911 с. 3. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина // М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с. 4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition (Керівництво щодо діагностики та вакцинопрофілактики хвороб тварин. П'яте видання) – 2005.

STUDY OF ANTIBODY LEVEL AT IMMUNIZATION OF POULTRY AND RABBITS AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS

Dragut S.S., Stegnyy M.Yu., Breslavets, V.A., Stegnyy A.B.

NSC “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkov

Data on reception of immune sera, specific to infectious bronchitis virus, from turkeys and rabbits presented in the paper. Dynamics of virus-specific antibody levels at their hypersimmunization in haemoagglutination test, undirect haemoagglutination test and undirect ELISA has been studied.

УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ СКАЗУ ВІД ДОМАШНІХ М'ЯСОЇДНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Дрожже Ж.М.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

У статті представлені результати філогенетичного аналізу нуклеопротеїну ізолятів вірусу сказу, виділених від м'ясоїдних тварин на території України, в порівнянні з іншими ізолятами генотипу 1.

Сказ – надзвичайно небезпечна інфекційна хвороба тварин і людей, яка викликається вірусом, характеризується ураженням центральної нервової системи та закінчується летально. Збудника сказу відносять до роду *Lyssavirus*, родини *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales*. Рід *Lyssavirus* (від грецького *lyssa* – сказ) включає вірус сказу (7 генотипів): генотип 1 – *Rabies virus*, генотип 2 – *Lagos bat virus*, генотип 3 – *Mokola virus*, генотип 4 – *Duvenhage virus*, генотип 5 – *European bat lissavirus 1*, генотип 6 – *European bat lissavirus 2*, генотип 7 – *Australian bat lissavirus*. Генотип 1 включає класичний вірус сказу роду *Lyssavirus*, що викликає захворювання у людей. Генотип 1 виявлений у більшості країн світу, а у летючих мишей зустрічається тільки на Американському континенті. Актуальність вивчення збудника сказу та його розповсюдження зумовлено сприйнятливістю до цієї інфекції широкого й різноманітного кола тварин, можливістю втягнення в ланцюг циркуляції вірусу не тільки диких, а й сільськогосподарських тварин, надзвичайно великою небезпекою для людини і відсутністю засобів лікування при цій хворобі [1].

Сказ розповсюджений практично на всіх континентах світу, виключенням є кілька острівних держав (Велика Британія, Ірландія, Нова Зеландія, Японія). Резервуаром класичного вірусу сказу є ссавці, в основному м'ясоїди (собаки – основний вектор і резервуар сказу) і летючі миші [2].

Із середини ХХ століття відбувалася адаптація вірусу сказу серед лисиць і сформувалися нові природні вогнища рабійної інфекції, де основним господарем, резервуаром та переносником сказу стали червоні лисиці. З кінця 70-х років в Європі впроваджені програми пероральної вакцинації лисиць, що дали змогу призвести до повної ліквідації сказу серед лисиць і деяких інших видів тварин (наприклад, енотовидних собак) у цілих країнах. Пероральна імунізація стала найважливішою методикою проведення програм боротьби і ліквідації сказу серед диких тварин. Ряд європейських країн ліквідували собачий сказ шляхом проведення вакцинації домашніх тварин та знищенням вовків та бродячих собак [3,4,5]. Кількість країн, що отримали повну перемогу над сказом, з кожним роком зростає, статус *Rabies-free* країн мають: