

Magy. Allatorv. Lapja 16: – P. 42-45. **18.** van Oirschot, J.T., Rziha, H.J., Moonen, P.J., Pol, J.M., van Zaane, D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. J Gen Virol. 1986 Jun; 67 (Pt 6): – P. 1179-82. **19.** Сергеев, В.А., Непоклонов, Е.А., Алипер, Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. – М. 2007 – 503 С. **20.** Тест-система для діагностики хвороби Ауескі «IFA gE-BXA» (на 184 аналізів) ТУ У 46.15.525-2000. **21.** Stegeman, A., Van Nes, A., de Jong, M.C., Bolder, F.W. Assessment of the effectiveness of vaccination against pseudorabies in finishing pigs. Am J Vet Res. 1995 May; 56 (5): – P. 573-8. **22.** Motha, M.J., Horner, G.W., Tham, K.M., Ralston, J.C. A comparison of the efficacy of two commercial Aujeszky's disease vaccines with glycoprotein-I deletion in pigs. N Z Vet J. 1993 Mar; 41 (1): – P. 1-6. **23.** Hopp, W., Jungblut, R. Constancy of Aujeszky's field virus antibody titres in sows repeatedly vaccinated with a gI-negative vaccine. Acta Vet Hung. 1994; 42 (2-3): – P. 409-11. **24.** Maes, R.K., Sussman, M.D., Vilnis, A., Thacker, B.J. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. Vet Microbiol. 1997 Apr; 55 (1-4): – P. 13-27. **25.** Інструкція щодо заходів з профілактики та ліквідації хвороби Ауескі сільськогосподарських тварин і хутрових звірів, затверджена наказом Головного державного інспектора ветеринарної медицини України 10.10.200 №47, зареєстрована в Міністерстві юстиції України 24.10.2000 за № 7421/4963. **26.** Цымбал, А.М., Лысенко, И.П., Конаржевский, К.Е. и др. Лабораторное и производственное испытание инактивированной культуральной вакцины УНИИЭВ против болезни Ауески. В сб.: «Научн. основы профилактики и борьбы с заболеваниями с.-х. животных». ВАСХНИЛ, Южное отделение, Киев, 1987, – С. 17-23. **27.** Конаржевский, К.Е., Цимбал, О.М., Самойлюк, В.В., Сербиненко, Т.М. Гіперчутливість сповільненого типу і вірусоносійство при хворобі Ауескі у свиней. В зб.: «Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Академії аграрних наук», Харків, 1998, №75, – С. 99-106. **28.** Skoda, R., Ivanicov, S., Jamrichov, O., Slipek, M. [Cutaneous hypersensitivity of pigs in Aujeszky's disease] Arch Exp Veterinarmed. 1968; 22 (5): – P. 925-36. **29.** Iotov, M. [Studies of allergy in Aujeszky's disease. III. Skin allergic reaction and virus-neutralizing antibodies in swine at different stages of the infectious process] Vet Med Nauki. 1973; 10 (1): – P. 73-8. [Article in Bulgarian] **30.** Smith, P.C., Mengeling, W.L. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. Can J Comp Med. 1977 Oct; 41 (4): – P. 364-8. **31.** Jakubik, J., Wittmann, G. [Inoculation of swine with inactivated Aujeszky vaccine: reduction of the inoculation dose, a cutaneous allergy test and the effect of vaccination on viremia] Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1979 Nov 5; 86 (5): – P. 438-40. **32.** Vandeputte J, Pensaert MB. Skin test as herd diagnosis for Aujeszky's disease (pseudorabies) in swine. Tijdschr Diergeneesk. 1980 Apr 15; 105(8):suppl 2:75-81. **33.** Scherba, G., Turek, J.J., Gustafson, D.P. Pseudorabies virus nucleocapsid antigen for skin testing in swine. J Clin Microbiol. 1983 Mar; 17 (3): – P. 539-44. **34.** Crandell, R.A., Gustafson, D.P., White, R.C., Adams, F.F. Results of field trials with a pseudorabies virion skin test antigen. J Am Vet Med Assoc. 1984 Mar 15; 184 (6): – P. 692-4. **35.** Бусол, В.О., Конаржевський, К.Е., Цимбал, О.М., Сербиненко, Т.М., Самойлюк, В.В. Вірусоносійство в експериментально заражених вірусом хвороби Ауескі свиней. В зб.: «Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник Академії аграрних наук», Київ «Урожай», 1995, №70, – С. 48-52. **36.** Способ культивирования вируса болезни Ауески на перевиваемых клетках СПЭВ. Авторское свидетельство СССР № 1143085. **37.** Способ изготовления аллергена для диагностики болезни Ауески методом внутрикожной пробы на свиньях. Авторское свидетельство СССР № 1110168. **38.** McGinley, M.J., Platt, K.B. Antibody response of pseudorabies virus subunit-vaccinated pigs to viral nucleocapsid proteins following low-dose virus challenge of immunity. Am J Vet Res. 1989 Aug; 50 (8): – P. 1290-3.

IMPROVEMENT OF DIVA-ESCORT FOR INACTIVATED VACCINE FROM «18V-UNDIEV» STRAIN OF AUJEZSKY DISEASE VIRUS

Buzun A.I.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv,

Dsuba V.M.

Sumy State Biological Factory

In addition to skin test with "Aulergin" diagnostic it is developed the ELISA test-system with use of Aujeszky disease virus' (ADV) nucleocapsid antigens' pool for DIVA-escort of ADV inactivated vaccine from "18v-UNDIEV" strain (NSC "IECVM" as developer, Sumy State Biological Factory as manufacturer). It is possible to differentiate of vaccinated with «18v-UNDIEV» vaccine from infected with field ADV swine based on «INGEZIM® ADV gI» ELISA test-system (Ingenasa S.A.) and «IFA gE-BXA» ELISA test-system (NVP «Biotest-laboratory») also. It is because the "18v-UNDIEV" strain is presumably "BUK" ADV genotype derivate and, consequently, it have some ADV gI- and gE-deficit in its virion structure.

УДК 619:616.98.578:636.4

ДОКЛІНІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ СЕРІЙ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ 2-ГО ТИПУ

Бузун А.І., Стегній Б.Т., Вовк С.І., Коровін І.В., Заремба О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків,

Головко В.О., Северин Р.В.

Харківська державна зооветеринарна академія

Цирковірусна інфекція свиней 2-го типу – група вірусних синдромокомплексів свиней (PMWS, PDNS, «ілейтіс», тощо) з характерними ознаками ураження кишечних лимфовузликів, тимусу та інших лімфатичних органів, а також характерним для кожного синдромокомплексу ураженням інших тканин свині [1, 2, 3]. Збуднику ЦВС-2 присвоєно міжнародний класифікаційний код (ICTVdB Virus Code) 00.016.0.01.001, його віднесено до родини *Circoviridae*, роду *Circovirus*, виду *Porcine circovirus* – 2, [4]. Віріони при електронній мікроскопії виглядають, як ікосаедральні глобули діаметром 17 нм, зовнішньої оболонки не мають і всередині нуклеокапсиду містять замкнену однострунчасту ДНК [5]. Важливою особливістю цирковірусу свиней 2-го типу є, встановлене нещодавно, його біорозмаїття – жодне з відомих моноклональних антитіл не нейтралізувало всі сім досліджених ізолятів збудника [6]. Більше того, встановлено, що уражені цирковірусом свині виробляють лише не нейтралізуючі противірусні антитіла [7].

Для вакцинопрофілактики ЦВС-2 на ринку ветеринарних препаратів представлено кілька вакцин, розроблених в Євросоюзі, США та в Російській Федерації [8]. На замовлення Державного Комітету ветеринарної медицини України ми відпрацьовували спосіб отримання вітчизняного препарату для регуляції складної епізоотичної ситуації щодо ЦВС2 у товарному свиновідтві України. Метою представлених досліджень було випробування придатності виділеного в перебігу моніторингу ЦВС2 у товарному свиновідтві України польового ізоляту збудника для біотехнологічних робіт шляхом виготовлення з нього вакцинних препаратів за різними рецептурами та застосування їх за різними схемами.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

Матеріали та методи. Ізолят «Слобідський-09» цирковірусу свиней 2-го типу (ЦВС2) виділили з ПЛР-позитивного зразку кишечних лимфозузликів хворого підсвинка (у співпраці з А.П. Герилловичем, лабораторія молекулярної діагностики та епізоотології ННЦ «ІЕКВМ») в культурі клітин РК-15 і ідентифікували за допомоги референтних матеріалів, люб'язно наданих професором З. Пейсаком з Національного Центру ветеринарної медицини Польщі (м. Пулава, PIWet). Ізолят адаптовано до перещеплюваної лінії РК15 (у співпраці з М.Ю. Стегній, лабораторія біотехнології ННЦ «ІЕКВМ») за стандартною процедурою PIWet з деякими відмінностями, що наразі патентуються. Вакцину проти цирковірусної інфекції свиней 2-типу виготовляли шляхом накопичення біомаси ізоляту «Слобідський-09» в культурі клітин РК-15, її інактивації формальдегідом і змішування з вакцинним ад'ювантом. При виготовленні експериментальних серій №№1 та 2 вакцини в якості вакцинного ад'юванту використовували аеросил, а при виготовленні експериментальної серії №3 вакцини – оливу «Marcol 52» Medicinal grade White Oil (фірма «ЕххонMobile», Німеччина) за раніше відпрацьованими методиками. Виготовлено по 50см³ вакцини кожної серії. Вакцину розфасовано по 10см³ у пеніцилінові флакони з гумовими пробками та алюмінієвими ковпачками і по три флакони кожної серії відібрано для контролю на стерильність за ДСТУ 4483:2005. Для подальших випробувань використовували лише серії стерильної вакцини.

Нешкідливість вакцини перевіряли на білих мишах з масою тіла 15-20г (n= 27), та морських свинках з масою тіла 250-300г (n= 15). Для цього по 9 мишей дворазово з інтервалом 2 тижні і по 5 морських свинок одноразово щеплювали кожною серією вакцини внутрішньом'язово у дозах 0,5см³ для мишей та 2см³ для морських свинок. При спостереженні за щепленими гризунами керувалися методиками вивчення гострої та хронічної токсичності ветеринарних біологічних препаратів [9].

Антигенну активність вакцини вивчали шляхом її щеплення підсвинкам 2,5-місячного віку, отриманим від свиноматок, вільних від антитіл проти ЦВС-2, парвовірусу, хвороби Ауескі, репродуктивно-респіраторного синдрому та хвороби Тешена. Для цього кожною серією вакцини щеплювали по 4 підсвинка у дозах: серії №№1 та 2 – внутрішньом'язово в передній третині шиї, по 3см³; серію №3 – внутрішньошкірно ззовні вуха, по 0,6см³ (3 постріли внутрішньошкірного ін'єктору типу «Овід», по 0,2см³ кожний). Вакцину серії №1 вводили тричі з інтервалом 2 тижні, а вакцину серій №2 і 3 вводили двічі з інтервалами 2 та 3 тижні, відповідно. Зразки сироваток крові від підсвинків, щеплених адсорбат-вакциною (серії №№1 та 2), у кожного з щеплених підсвинків відбирали через 14 днів після кожного з щеплень. Зразки сироваток крові від підсвинків, щеплених емульсин-вакциною (серія №3), у кожного з щеплених підсвинків відбирали через 21 добу після кожного з щеплень.

Серологічні дослідження проводили з використанням тест-набору «Цирко-серотест» фірми «Нарвак» (Російська Федерація) для виявлення в сироватках крові свиней антитіл до ЦВС2 методом ELISA імуноферментного аналізу.

Експериментальні дослідження проводили з урахуванням основних принципів біоетики. Утримання, догляд за тваринами та їх годівля здійснювалися за нормами та раціонами, які рекомендовано для даного виду тварин у інфекційних віваріях 2-го рівня біобезпеки.

Результати досліджень. Всі щеплені свині (n=12), миші (n=27) та морські свинки (n=15) впродовж всього періоду спостереження (75, 90 та 35 днів, відповідно) перебували в здоровому стані, температура тіла підсвинків лишалася у межах клінічної норми. Підсвинки були рухливими, добре поїдали корма і пили воду, на місці введення вакцини адсорбованої будь-яких змін не було відмічено. На місці введення емульсин-вакцини (шкіра зовнішньої сторони вуха) у підсвинків з'являлися пухирці, які впродовж 3-5 днів збільшувалися до розміру волоського горіха, а потім впродовж місяця поступово зменшувалися. Темпи росту щеплених різними серіями та не щеплених підсвинків були однаковими. Миші після триразового введення, як адсорбованої, так і оливної серії вакцини впродовж 57 днів не втрачали маси тіла, апетиту і біологічної активності. Морські свинки реагували на введення емульсин-вакцини у перші 2-3 години занепокоєнням та пригніченням (синдром болю), які потім зникали.

При вивченні сероконверсії підсвинків на щеплення різними серіями вакцини встановлено, що адсорбат-вакцина (серії № 1 та 2) лише після 3-разового щеплення з інтервалом 2 тижні викликає сероконверсію на рівні 1:25-1:100 (див. табл. 1). Емульсин-вакцина викликала сероконверсію такого рівня вже через 21 добу після першого щеплення, а через 21 добу після повторної імунізації рівень титрів зріс вдвічі. Ці титри не були такими строкатими, як після першого введення вакцини.

Таблиця 1 – Результати визначення рівня поствакцинального імунітету підсвинків, щеплених трьома серіями вакцинного препарату проти ЦВС2

№ підсвинків	Епізоотологічний статус	Титр антитіл в ELISA у зразках сироваток крові на 14-21 добу після щеплення		
		Першого	Другого	Третього
1	Адсорбат-вакцина, 3- разове щеплення	0	0	1:50
2		0	0	1:25
3		0	0	1:25
4		0	0	1:100
5	Адсорбат-вакцина, 2- разове щеплення	0	0	Нд
6		0	0	Нд
7		0	0	Нд
8		0	0	Нд
9	Емульсин-вакцина, 2- разове щеплення	1:200	1:400	Нд
10		1:50	1:400	Нд
11		1:50	1:400	Нд
12		1:200	1:800	Нд

Примітка. Нд- не досліджували

Отже результати доклінічних випробувань показали придатність ізоляту «Слобідський-09» ЦВС-2 для виготовлення вакцинних препаратів. Крім того, доведено перевагу рецептури та схеми застосування внутрішньошкірної емульсин-вакцини над внутрішньом'язовою адсорбат-вакциною проти ЦВС. Очевидно, що найближчим завданням має бути вивчення імуногенності вакцини з одночасною оптимізацією її дозування. На основі отриманих результатів складено лабораторний регламент виготовлення та контролювання емульсин-вакцини проти цирковірусної інфекції свиней 2-го типу.

Висновки. Ізолят «Слобідський-09» цирковірусу свиней 2-го типу задовольняє чинним вимогам до виробничих вакцинних штамів і може використовуватися для виготовлення біологічних препаратів. Розроблений на замовлення ДКВМ України регламент виготовлення емульсин-вакцини проти цирковірусної інфекції свиней 2-го типу дозволяє отримувати вакцинний препарат, придатний для подальших клінічних випробувань та впровадження у чинному порядку.

Список літератури

1. Nayar, G. P., Hamel, A. & Lin, L. (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J* 38, – P. 385-386. 2. Sanchez, R. E., Nauwynck, H. J., McNeilly, F., Allan, G. & Pensaert, M. B. (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different ages of gestation. *Vet Microbiol* 83, – P. 169-176. 3. Segales, J., Allan, G. M. & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, – P. 119-142. 4. ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB_5. Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. & Adair, B. M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, – P. 3-10. 6. Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A. & Nauwynck, H. J. (2005b). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18, – P. 333-341. 7. Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J. & Mateu, E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* (on line doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.004). 8. Пейсак, З. Цирковирусы свиней как одна из основных оздоровительных проблем свиноводов в Европе. В сб.: «СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ В СВИНОВОДСТВЕ. Труды Съезда Свиноводов Украины, 2008 год, Киев, 2009, – С. 128-131. 9. Коцюмбас, І.Я., Патерега, І.П., Чура, Д.О., Малик, О.Г. / Методика токсикологічного контролю нових ветеринарних препаратів // Вет. мед. Укр. – 2001. – № 2. – С. 17-20.

PRE-CLINICAL APPROBATION OF INACTIVATED VACCINE AGAINST PORCINE 2ND TYPE CIRCOVIRUS INFECTION

Buzan A.I., Stegnyy B.T., Koltchik O.V., Vovk S.I., Korovin I.V., Zaremba O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv,

Severin R.A., Golovko V.O.

Kharkiv State Zooveterinary Academy

Three lab batches of inactivated (by formalin) vaccine against porcine 2nd type circovirus (PCV2) infection is prepared from field isolate of agent, which was identified as PCV2 with use of reference strain and serum from P1Wet (Poland). Batch 3 (emulsified vaccine consisting PCV2 inactivated biomaterial, Marcol 52 oil, E139 emulgator and vitamin E) showed most significant immunological changes in vaccinated swine: on 21st day after second intradermal vaccination (with 3 week intervals, in dose 0.6 ml) porcine serums (n=4) had an antibodies titres in ELISA 1:400 – 1:800.

УДК 619:616.578.2:639.371.13

МОНІТОРИНГ ВІРУСНОЇ ГЕМОРАГІЧНОЇ СЕПТИЦЕМІЇ ФОРЕЛІ В РИБОГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

Гайдей О.С.,* Дерябін О.М., Головка А.М.,

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

Серед особливо небезпечних захворювань риб, згідно класифікації МЕБ, важливе місце займає вірусна геморагічна септицемія форелі, яка завдає рибним господарствам у світі надзвичайно великі збитки [1, 5]. Вірусна геморагічна септицемія (ВГС) – інфекційне захворювання, що уражує близько 45 видів риби і вже зареєстроване у 28 країнах світу, серед яких потенційну небезпеку для України у зв'язку із завезенням рибосадкового матеріалу, риболовного інвентарю та готової рибної продукції [2], становлять країни-сусіди – Польща та Туреччина.

Збудником ВГС є РНК-вмісний вірус, який відноситься до родини *Rhabdoviridae* роду *Novirhabdovirus* [3, 4]. На сьогодні відомо 4 групи генотипів вірусу, перша та остання з яких підрозділені на 5 та 2 підгрупи відповідно [1, 5]. Сучасна діагностика базується на молекулярно-біологічних (ЗТ-ПЛР), серологічних (ІФА, РІФ) методах діагностики та ізоляції вірусу в чутливий перещеплюваній культурі клітин [2, 5].

Мета роботи: проведення впродовж 2009-2010 років моніторингових досліджень в зареєстрованих рибогосподарствах України щодо вірусної геморагічної септицемії форелі.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження була райдужна форель трьох вікових груп: мальки до 2 см, мальки розміром 4-6 см та доросла риба 15 см.

Для аналізу відбирали від дорослих риб нирки та селезінку, а мальки до 2 см використовувались повністю. Всі проби об'єднували з розрахунку – 1 проба з 10 відібраних риб. Гомогенати були приготовані на транспортному середовищі Eagles MEM (буферна система-0,1 M Tris-HCl) у співвідношенні 1:5.

Одночасно з експрес-методами діагностики, проводили декілька послідовних («сліпих») пасажів в чутливих перещеплюваних культурах клітин BF-2 та RTG-2. Пасажи виконували на підтримуючому середовищі Eagles MEM (pH 7, 6) з додаванням 2 % фетальної сироватки телят та 200 мкг/мл гентаміцину. Культивування проводили при температурі 15 °С.

Виділення РНК із зразків та після пасажів в культурі клітин, реакцію зворотної транскрипції та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували за допомогою комерційних наборів: «Рибозоль-А», «РЕВЕРТА-Л» та «Амплиценс 200-1» («Амплиценс», Росія).

Виявлення в сироватках крові специфічних антитіл до вірусу ВГС виконували за допомогою діагностичної тест-системи «VHS Ag-ELISA» (Чехія) згідно інструкції виробника.

В якості позитивного контролю були використані: референтний штам вірусу геморагічної септицемії форелі (ВВГС) – «DH4p101» [AY546581] (Данія) та місцевий ізолят з Польщі «PL-1», які були люб'язно надані професором Єжи Антиховичем – завідувачем відділу заразних хвороб риб Національного Інституту Ветеринарії (Пулава, Польща). Всі вказані штами відносяться до генотипу I-а ВВГС.

Для проведення ЗТ-ПЛР була використана тест-система «ВГС-ТЕСТ», розробки ДНКБШМ (заявка на патент № u 2010 03941 від 06.04.2010 р.), яка ідентифікує консервативну ділянку гена нуклеопротеїну (N) вірусу геморагічної септицемії форелі. Додатково були використані олігонуклеотидні праймери *OIE-F*, *OIE-R*, які специфічні до гену нуклеопротеїну (N) і рекомендовані МЕБ [5].

Результати досліджень. Моніторингові дослідження були проведені у зареєстрованих форелевих господарствах 6 регіонів України: Закарпатської, Чернівецької, Львівської, Рівненської, Волинської областей та АР Крим, оскільки дані регіони межують з країнами, неблагополучними щодо ВГС (Польща, країни Західної Європи, Туреччина). В результаті проведеного обстеження водойм господарств була відібрана риба різних вікових груп, яка мала деякі клінічні ознаки, що характерні для ВГС, а саме: потемніння шкіри, екзофтальмія та порушення координації плавальних рухів, що спостерігається при нервовій формі захворювання. Зразки були відібрані за температури повітря та води, оптимальної для розмноження ВВГС.

Для молекулярно-біологічного аналізу були приготовані 8 об'єднаних зразків (рисунок 1).