

8. СОУ 85.20-37-305:2005 «Велика рогата худоба. Методи профілактики вірусної діареї – хвороби слизових»;
9. СОУ 85.20-37-300:2005 «Велика рогата худоба. Методи профілактики вірусних ентеритів новонароджених телят»;
10. СОУ 85.20-37-300:2005 «Велика рогата худоба. Методи профілактики вірусних респіраторних хвороб телят»;
11. СОУ 85.20-37-621:2007 «Сперма бугаїв-плідників глибоко заморожена. Методи ветеринарно-санітарного контролю»;
12. ДСТУ 7108:2009 «Ветеринарна медицина. Методи лабораторної діагностики герпесвірусної інфекції великої рогатої худоби».

Висновки.

1. Інфекційний ринотрахеїт та вірусна діарея великої рогатої худоби мають широке розповсюдження в господарствах 12 обстежених областей України.
2. Успішне здійснення боротьби з інфекційним ринотрахеїтом та вірусною діареєю великої рогатої худоби досягається дотриманням загальних організаційно-господарських заходів та застосуванням засобів специфічної профілактики.
3. У лабораторії вірусології ННЦ «ІЕКВМ» за результатами власних досліджень розроблені методичні підходи щодо профілактики інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї великої рогатої худоби, застосування яких зменшує до мінімуму захворюваність та суттєво скорочує економічні збитки господарств на лікування та утримання хворих тварин, що є важливою ланкою отримання екологічно безпечної продукції для харчування людей.

Список літератури

1. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин [и др.]. – ВНИТИБП. 1998. – С. 928.
2. Вакцинопрофілактика інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби [Текст] / Л.І. Кучерявенко [та ін.] // Вет. медицина: Міжвід. тематич. наук. зб. – Харків, 2004. – Вип. 84. – С. 413-416.
3. Инфекционный ринотрахеит – пустулезный вульвовагинит (баланопостит) крупного рогатого скота: диагностика, профилактика, меры борьбы [Текст]: Метод рекомендации. / Е.В. Андреев [и др.]. – Харьков, 1990. – 25 с.
4. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з інфекційним ринотрахеїтом-пустульозним вульвовагінітом (баланопоститом) великої рогатої худоби [Текст]: Затверджено 10 жовтня 2000р. № 47 // Ветеринарна медицина України.-2001.-№ 4. – С.45-47.
5. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland / Lasse Nuotio [et al.] // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2007. – 49:3.
6. Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis.– 2007 Part 2, section 2.3, Chapter 2.3.5.; Terrestrial Animal Health Code 2008 Chapter 11.12.

SPECIFIC PROPHYLAXIS OF BOVINE VIRUS pneumoenteritis IS THE guarantee of biologically safe ANIMAL PRODUCTION

Kucheryavenko V.V.

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

Information about the results of own investigations and long-term observations concerning use of the means for specific prophylaxis of bovine virus pneumoenteritis is presented in the paper.

Analysis of safety of use both live and inactivated means for immune protection and of their use as a component of reception of biologically safe production has been conducted.

УДК 619:616.98:578.825.15:616-085.371

ПРОФІЛАКТИКА ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ЗА ДОПОМОГОЮ БЕЗПЕЧНОЇ ВАКЦИНИ ШЛЯХОМ ВНУТРІШНЬОШКІРНОЇ ІМУНІЗАЦІЇ

Малакєєв А.С., Кучерявенко Р.О., Кучерявенко Л.М.

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

Інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) – одна з найбільш поширених у світі, у тому числі й в Україні, вірусних хвороб великої рогатої худоби, що спричиняється герпес вірусом-1, здатним тривалий час, а фактично довічно, персистувати в організмі інфікованої тварини [1, 2]. Економічні збитки, яких завдає ІРТ, складаються з вартості загублених і браку хворих тварин, зниження продуктивності та приросту живої маси, порушення відтворювальної функції у бугаїв, корів і телиць, витрат на організацію і здійснення ветеринарно-санітарних заходів щодо локалізації і ліквідації цього захворювання [3, 4].

Забезпечення стабільного благополуччя щодо ІРТ залежить від наявності ефективних засобів вірусологічного і серологічного моніторингу та специфічної профілактики хвороби. Вакцинопрофілактика залишається одним з найбільш ефективних заходів попередження і боротьби з ІРТ.

На цей час розроблені та впроваджені як живі, так й інактивовані вакцини проти ІРТ, проте їх якість не завжди забезпечує необхідну стійкість тварин до зараження вірусом, що негативно відбивається на ефективності заходів проти цього захворювання [5]. Як відомо, профілактичний ефект вакцин проти герпесвірусних інфекцій досягається за дворазового і більше (бустерного) введення біопрепаратів [6]. Хоча протиепізоотичний ефект вакцин з живих атенуйованих та інактивованих штамів вірусу ІРТ майже однаковий, перевагу віддають біопрепаратам, виготовленим з інактивованого антигену, які є екологічно безпечними. У той же час ведуться постійні пошукові дослідження з розробки нових противірусних вакцин і способів їх застосування (внутрішньом'язово, внутрішньовенно, підшкірно, через слизові оболонки, шкіру), оскільки, від шляху введення антигенного подразнення залежить характер імунної відповіді організму [7].

На підставі більш повного уявлення про участь шкіри в процесі імуногенезу зараз приділяється особлива увага внутрішньошкірній імунізації тварин [8]. Шкіра, окрім виконання фізико-хімічної функції, містить високоєфективну сукупність імунних клітинних елементів (клітини Ларгенганса, лімфоцити, гістіоцити-макрофаги, тучні клітини, кератоцити, гранулоцити) [9, 10].

Зважаючи на те, що в шкірі як імунному органі відбувається повноцінна імунна презентація антигену та розвиток усіх стадій імунної відповіді, характер якої залежить, перш за все, від якості антигену та способу його введення, виникла необхідність у розробці вакцини для внутрішньошкірної імунізації телят проти ІРТ. Впровадження такої вакцини є більш економічно обґрунтованим порівняно з традиційними способами введення.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

Матеріали та методи. Імуногенну активність і оптимальний відсоток ад'юванту в складі дослідних зразків інактивованої концентрованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту телят для внутрішньошкірного застосування з використанням ад'юванту Montanide Gel вивчали на телятах (3-4-х місячного віку). Для цього було створено 7 груп тварин по 5 голів у кожній.

Дослідження проводили в одному з господарств Харківської області. В досліді використовували в якості антигену вірус IPT, штам «Молдавський» з інфекційною активністю 7,5 lg ТЦД_{50/см³} і ад'ювант Montanide Gel з різною концентрацією у вакцині. Вакцину вводили телятам у дозі 0,4 см³, внутрішньошкірно, дворазово з інтервалом 21 добу. Телятам першої, другої, третьої групи вводили дослідні зразки вакцини з концентрацією ад'юванту відповідно 10 %, 15 % і 20 %. Телята четвертої, п'ятої, шостої груп слугували контролем. Тваринам 4-ї групи вводили середовище 199; 5-ї групи – середовище 199 з додаванням 20 % ад'юванту; 6-ої групи – інактивованій вірус IPT; 7-ма група слугувала контролем. Проби крові у тварин відбирали до щеплення і через 21, 30, 60 діб після імунізації. Експериментальні дослідження на тваринах проведені з урахуванням основних принципів біоетики. Сироватку крові досліджували в реакції нейтралізації як макро-, так і мікрометодами. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою персонального комп'ютера методами варіаційного аналізу «Microsoft Excel 2007».

Результати дослідження. Виготовлені експериментальні зразки інактивованої концентрованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби для внутрішньошкірного застосування з ад'ювантом Montanide Gel, які перевірені на відсутність бактеріальної, грибової і мікоплазмової контамінації. Визначено також, що після нейтралізації формаліном відсутня залишкова інфекційність вірусу в препараті. Для перевірки вакцини на нешкідливість її вводили 10 білим мишам. Серед щеплених мишей не було встановлено жодного випадку загибелі або клінічного прояву захворювання, що свідчить про її нешкідливість для лабораторних тварин.

У зв'язку з тим, що господарство є стаціонарно неблагополучним щодо IPT, початкові титри вірус нейтралізуючих (ВН)-антитіл до IPT знаходились на рівні 3,25 – 3,8 log₂ (табл. 1).

Таблиця 1 – Результати вивчення імуногенної активності дослідних зразків інактивованої концентрованої вакцини проти інфекційного ринотрахеїту телят для внутрішньошкірного застосування з використанням ад'юванту Montanide Gel на телятах.

№ групи тварин	Склад вакцини, доза введення	Дні відбору крові та титр антитіл в РН, log ₂			
		до введення	на 21 добу	на 30 добу	на 60 добу
1	2	3	4	5	6
1	10 % ад'юванту, 90% інактивованого вірусного антигену, об'єм введеного препарату 0,4 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,6 ± 0,24	4,9 ± 0,33	7,0 ± 0,21	4,67 ± 0,27
2	15% ад'юванту, 85 % інактивованого вірусного антигену, об'єм введеного препарату 0,4 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,4 ± 0,19	5 ± 0,32	7,6 ± 0,20	6 ± 0,32
3	20% ад'юванту, 80 % інактивованого вірусного антигену, об'єм введеного препарату 0,4 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,25 ± 0,25	4,75 ± 0,48	4,75 ± 0,48	4,88 ± 0,31
4	контроль (плацебо - середовище 199), об'єм введеного препарату 0,4 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,7 ± 0,20	3,5 ± 0,22	3,6 ± 0,24	3,6 ± 0,19
1	2	3	4	5	6
5	контроль (20 % ад'юванту, 80 % середовища 199), об'єм введеного препарату 0,4 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,3 ± 0,20	3,1 ± 0,10	3,4 ± 0,24	3,4 ± 0,19
6	інактивованій вірус IPT, об'єм введеного препарату 0,36 см ³ , повторне введення ч/з 21 добу.	3,8 ± 0,20	4,25 ± 0,22	4,5 ± 0,16	4,0 ± 0,19
7	інтактні тварини	3,5 ± 0,17	3,23 ± 0,13	3,27 ± 0,15	4,0 ± 0,18

Через 21 добу після щеплення у групах 1-3 спостерігали підйом віруснейтралізуючих (ВН) антитіл до IPT на рівні 4,75-5,0 log₂. Найбільший їх рівень виявили на 30 день після введення. Індукція віруснейтралізуючих антитіл проти вірусу IPT залежала від кількості ад'юванту у вакцині. Так, рівень ВН-антитіл на 30 добу після введення в різних групах збільшився від 1,5 log₂ до 4,2 log₂, в порівнянні з показниками, які були до введення препарату. Найбільш імуногенноактивним виявився зразок вакцини з 15 % Montanide Gel. На 30 добу після вакцинації титр антитіл становив (7,6±0,4) log₂, а приріст антитіл – 4,2 log₂. При введенні тільки інактивованого вірусу IPT (6 група) спостерігали незначний підйом ВН-антитіл до IPT на 21-30 добу після введення, з подальшим (60 доба) їх зниженням, що свідчить про необхідність введення ад'юванту, як складової частини препарату. У контрольних групах тварин, яким вводили плацебо (4-5 групи), рівень ВН-антитіл до IPT знаходився (в межах статистичної помилки) відносно титрів, які були до введення.

Висновки. За результатами досліджень встановлено, що препарат, який складається з 15% ад'юванту Montanide Gel та 85 % антигену інактивованого вірусу IPT забезпечує створення високого рівня специфічних антитіл до вірусу IPT у телят 7,6±0,4 log₂.

Список літератури

1. Вирусные болезни животных [Текст]: монография / В.Н. Сюрин, [и др.]; – ВНИТИБП.: 1998. – 928 С. 2. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [Текст]: монография / А. Я. Самуilenко, [и др.]; – М.: – Инфекционная патология животных, 2006. – Т 1. – С. 662-677. 3. Экспериментальный инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / Е.В. Андреев, В.С. Белоконов, Т.П. Рязиканская и др. // Профилактика и лечение заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных: Науч. тр. ВАСХНИЛ. – М.: Колос, 1974. – С. 186-188. 4. Респираторные болезни сельскохозяйственных животных [Текст]: монография / В.А. Атамась, [и др.]; – К.: – Урожай, 1986.– С. 184. 5. Кучерявенко, Р.О. Инфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби (епізоотологія, діагностика та специфічна профілактика): Дис. к-та вет. наук: 16.00.03. / Р.О. Кучерявенко; [Ін-т експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН]. – Х., 2003. – 168 с. 6. Конаржевський, К.Е. Інактивована культуральна вакцина против болезни ауески: Дис. д-ра вет. наук: 16.00.03. / К.Е. Конаржевський; [Ін-т експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН]. – Х., 1992. – 325 с. 7. Мазуркевич, А.І., Характер розвитку реакцій залежно від шляху нанесення антигенного подразнення. [Текст] / А. І. Мазуркевич, Л. В. Кладницька // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2008. – Вип. 89. – С. 248-250. 8. Эдельсон, Р. Л. Кожа как иммунный орган [Текст] / Р. Л. Эдельсон, Д. М. Финк // Журн. В мире науки. Scientific American. Издавництво російською мовою. – 1985. – №8. – С.16-24. 9. Зимина, И. В. Кожа как иммунный орган: клеточные элементы и цитокины [Текст]: учеб. пособие

/ И. В. Зими́на, Ю. М. Лопухин, В. Я. Арион; Иммунология, – 1994. – №1. – С.8-13. 10. Хлыстова, З. С. Участие эпидермиса кожи в системе иммуногенеза человека [Текст]: учеб. пособие / З. С. Хлыстова, И. И. Калинина, В. Х. Хавинсон; Иммунология. – 1994. – №3. – С.25-28.

PROPHYLAXIS OF INFECTIOUS RHYNOTRACHEITIS WITH THE HELP OF SAFE VACCINE BY MEANS OF INTRADERMAL IMMUNIZATION

Malakeyev A.S., Kucheryavenko R.O., Kucheryavenko L.M.

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

Results of determination of immunogenic activity and choice of optimal percent of adjuvant consisting of experimental samples of inactivated concentrated vaccine against infectious rhynotracheitis of calves for intradermal immunization using adjuvant Montanide Gel are presented in the article. The results of obtained data showed that above mentioned preparation is effective for prophylactic immunization of cattle calves against infectious rhynotracheitis both in bad and in safe farms which threatened by this disease.

УДК 619:616.98:578.833.3

ВОССТАНОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ШТАММ КМИЭВ-7, ИЗ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ

Матковская С.Г.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Вирусная диарея – болезнь слизистых (ВД-БС) – это инфекционное заболевание крупного рогатого скота (КРС), этиологическим агентом которого является вирус из семейства *Flaviviridae*, рода *Pestivirus*.

Все штаммы ВД-БС КРС по цитопатогенной активности подразделяются на две группы (биотипа): цитопатогенные (Oregon C-24, NADL, TM-1, TH-2, 61/1487 ST, C-60F и др.) и нецитопатогенные (New York, Indiana, C61220, SAN и др.) [4].

Многие ученые выделяли вирус ВД-БС из патологического материала, а также культивировали его в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) [3, 7, 9], почки теленка (ПТ) [3, 7, 8, 9], почки овцы (ПО) [11], другие адаптировали вирус к перевиваемым линиям клеток: (ППЭК) [7], трахеи теленка (ТрТ) [1, 6, 11], эпителию коронарных сосудов теленка (КСТ) [1, 5, 6, 7, 11], почки коровы – Madin-Darby-Bovine-Kidney (MDBK) [4, 10], изучали антигенное родство выделенных штаммов [1, 3, 6, 8].

Выделенные штаммы были идентифицированы и маркированы. Так, по данным В.С.Белокоя, 1970 г., им выделены изоляты 127 и 168 из фекалий новорожденных животных при гастроэнтеритах, изоляты Ф, Б-2, 36 и 98 – из фекалий молдняка старшего возраста, а изоляты К и Л из кишечника и легких тех же телят при болезни слизистых [3]. З.Ф.Зудилина, 1972 г., выделила изоляты ЭВС и 396/П [8]. Л.С.Илясова, 1987 г., работала с эпизоотическим штаммом ВК-1 [9], который впервые выделил С.А.Жидков в 1972 году в комплексе «Вороново» [7]. С этим же штаммом работали сотрудники ННЦ «ИЭК-ВМ» В.И.Стеценко, 2002 г., И.В.Малакеева-Чебанюк, 2008 г. модифицируя их как производственный «ВК-1» и производственный ВК-1М [1,11], а также А.Г.Готов, 2006 г., который в дальнейшем выделил свои изоляты: ТМ, И, ИС [5]. Сотрудниками вирусологического отдела ННЦ «ИЭКВМ» были выделены изоляты эпизоотический «УНИИЭВ-24» и «УНИИЭВ-25» [1, 6]. По данным П.А.Красочко, 2008 г., он адаптировал аттенуированный штамм ВК-№ 28 к культуре клеток MDBK и назвал его КМИЭВ-7 [10]. В.А.Мищенко и сотрудники работают с другим штаммом вируса ВД-БС, который также является цитопатогенным: «NADL-ВНИИЗЖ», они используют его для изготовления вакцины [2].

Выделенные штаммы хранят в виде культуральной суспензии или их очищают различными методами и хранят при температуре + 4°C в условиях бытового холодильника. Можно замораживать вирусосодержащую суспензию до минус 20, – 40, – 70°C, а также хранить в сосудах Дюара при – 196°C. Как известно, вирус диареи хорошо сохраняется при + 4-8°C и при – 70°C, а при – 20°C он быстро теряет инфекционность.

Из приведенных ниже литературных источников известно, что все исследователи сравнивали выделенные штаммы с эталонными: Oregon-C24V, а С.А.Жидков еще с эпизоотическим Oregon-C24V (США), US-59 (Дания). «Каблешково» (Болгария) [7].

Если штамм типирован и пригоден для производства диагностического препарата или вакцины, его лиофилизируют и хранят в условиях не выше +10°C. Восстановление биологических свойств конкретного штамма ВД-БС из лиофилизированного состояния и адаптация к новой тест-системе всегда связана с необходимостью повышения его инфекционного титра.

Целью работы было восстановление биологических свойств штамма КМИЭВ-7 ВД-БС КРС из лиофилизированного состояния, культивируемого до этого в перевиваемой линии клеток MDBK, установление его инфекционной активности, повышение его инфекционного титра путем проведения нескольких пассажей.

Материалы и методы. Работа проводилась в ГНКИБШМ. Использовали вирус – шт. КМИЭВ-7 (Бел.ИЭВ им. С.Н.Вышелесского), который был лиофилизирован в 20 мл флаконах по 2 мл. Флакон был вскрыт и содержимое восстановлено до исходного объема раствором Хенкса, 100 мкл исходного вируса отобрали в отдельный пенициллиновый флакон и добавили 10 мл раствора Хенкса, 100 мкл жидкости было использовано для заражения монослоя клеток. Каждый последующий пассаж проводили в объеме 100 мкл вирусосодержащей жидкости. Оставшийся вирусосодержащий материал был законсервирован при температуре (- 70°C). Культура клеток – перевиваемая линия эпителия коронарных сосудов теленка (КСТ). Питательные среды – ДМЭМ, сыворотка крови КРС фирмы «Sigma». Условия культивирования – клетки выращивали в пластиковой посуде до получения сплошного монослоя в течение 3-х суток в обычном термостате при температуре 37°C. Первый и четвертый пассажи вируса культивировали в обычных условиях, второй и третий в – в CO₂ термостате с содержанием углекислого газа 5%. Титрование вируса проводили микрометодом в 96-луночных панелях в CO₂ термостате с содержанием углекислого газа 5%.

Результаты работы. Главная цель при работе с любым вирусом – это обеспечение его сохранности в проявлении биологических свойств. Лучшим способом хранения вируса в настоящее время является лиофилизация, независимо от того, какие задачи в последующем возлагаются на имеющийся материал. Однако при этом, неизбежно происходит снижение первоначально заложенной инфекционной активности данного материала, поэтому восстановление биологических свойств вируса из лиофилизированного состояния всегда связано с некоторыми трудностями, можно сказать непредвиденными обстоятельствами.