

/ 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 CO<sub>2</sub> термостате с содержанием углекислого газа 5%. Титрование вируса проводили микрометодом в 96-луночных панелях в CO<sub>2</sub> 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.

## Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

ми при накопленні вирусної біомаси з високим інфекційним титром. В процесі роботи може виникнути необхідність змінити тест-систему, в якій накапливали штамм. Це може привести до зниження титра вірусу. С такою проблемою ми стикнулись при роботі з конкретним образцом ліофілізованого вірусу, біологічні властивості якого намагались відновити, рекультивувавши його на перевиваємій лінії кліток КСТ.

При огляді культури кліток під інвертованим мікроскопом MICROS MS300, виробництва Австрії було встановлено, що клітки мають удлиннену угловатую форму, монослой сформований повністю, тому був вироблений перший пасаж вірусу, який продовжався 50 годин, при цьому стан монослоя і розвиток цитопатических змін вивчали кожні 7-17 годин, оглядаючи монослой під малим збільшенням мікроскопа, однак видимих змін клітинного монослоя за це час не було виявлено. Через три доби в сплошному монослоєві були виявлені окремі розташовані скоплення округлих темних кліток, що вказувало на початок розвитку ЦПД, було прийнято рішення вважати перший пасаж «сліпим» і виробити другий пасаж, однак флакон з культурою кліток був поміщений в  $CO_2$  термостат з вмістом вуглекислого газу 5%. Явне ЦПД на чотири крести наступило через 16 годин. Так, другий пасаж був вироблений в кінці робочого дня, перший огляд зараженого монослоя був вироблений саме через 16 годин і одразу встановлено в полі зору окремі лежачі розбиті клітки з мелкоочаговою мелкозернистою дегенерацією. Судин з культурою був підвергнутий однократному заморожуванню-оттаиванню, після чого вироблений 3-й пасаж вірусу. Після проведення 3-го пасажу ЦПД проявилось через 36 годин – на два крести при вміщенні флакона з культурою кліток в  $CO_2$  термостаті. ЦПД проявлялось поступово, стандартно: вже через 7 годин спостерігали округлення кліток, истончення монослоя, в наступному через 20 годин розрив монослоя і наявність великої кількості кліток з мелкоочаговою мелкозернистою дегенерацією, вакуалізацією цитоплазми і поступовим відшаруванням кліток від скла в культуральну рідину. Був вироблений 4-й пасаж, ЦПД розвивались поступово, стандартно, характерно для вірусу ВД-БС. Вірус був накоплено в титрі після 2-го пасажу –  $4 \lg TCD_{50}/мл$ , після 3-го –  $5 \lg TCD_{50}/мл$ , а після 4-го –  $7 \lg TCD_{50}/мл$ . Результати проведених досліджень представлені на рисунках 1-3.

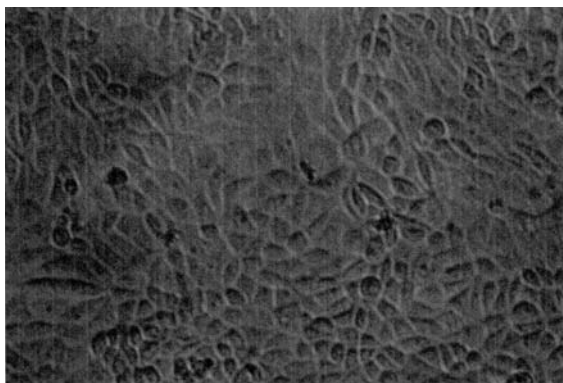


Рис.1 Інтактна культура кліток КСТ



Рис. 2 ЦПД другого пасажу на чотири крести

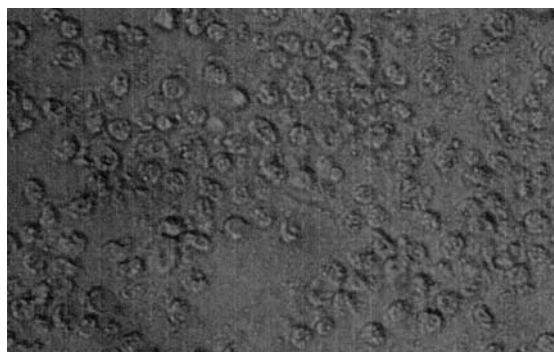


Рис.3 ЦПД третього пасажу на два крести

**Висновки і перспективи дальніших досліджень.** Відновити біологічні властивості вірусу з ліофілізованого стану і підвищити його інфекційний титр можна шляхом проведення декількох пасажів, а також шляхом зміни усло-

вий культивування – с обычного термостатирования на CO<sub>2</sub> термостат с содержанием углекислого газа 5 %.

В результате проведенных исследований установлено, что шт. КМИЭВ-7, культивированный на перевиваемой линии клеток MDBK, при восстановлении из лиофилизированного состояния на перевиваемой линии клеток КСТ был накоплен в титре после 2-го пассажа – 4 lgТЦД<sub>50</sub>/мл, после 3-го – 5 lgТЦД<sub>50</sub>/мл, а после 4-го – 7 lgТЦД<sub>50</sub>/мл. В результате проведенных опытов получена вирусная биомасса пригодная для использования в последующих исследованиях.

В дальнейшем планируется проведение исследований на стерильность, контаминацию посторонней микрофлорой и идентификацию вируса путем проведения реакции иммунофлуоресценции.

#### Список литературы

1. Антигенна спорідненість різних штамів вірусу діареї великої рогатої худоби [Текст] / В.І. Стеценко, О.В. Годовський, Л.І. Кучерявенко, Л.П. Тризна, Ю.С. Голуб, І.В.Чебанюк // Ветеринарна медицина. – Х., 2002. Вип. 80 – С. 589-594.
2. Антигенные свойства вакцины против вирусной диареи, ИРТ и коронавирусной инфекции КРС эмульсионной инактивированной [Текст] / А.В. Кононов, В.А. Мищенко, С.В. Левченко, В.В. Думова // Ветеринарна медицина. – Х., 2010. – № 93. – С. 219-223.
3. Белоконь, В.С. Выделение энтеровирусов при желудочно-кишечных заболеваниях новорожденных телят и болезни слизистых» КРС и изучение их биологических свойств [Текст] : автореф. дис. канд.вет. наук : 16.803 / В.С.Белоконь ; [УНИИЭВ УААН]. – К., 1970. – 19 с.
4. Вирусные болезни животных [Текст]: справочное пособие / В.Н.Сюрин, А.Я.Самуйленко, Б.В.Соловьев, Н.В.Фомина – М., 1998. – 928 с.
5. Глотов, А.Г. Выделение и характеристика изолятов вируса диареи крупного рогатого скота [Текст] / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, Е.И. Рябчикова, А.Н. Сергеев // Вопросы вирусологии. – М., 2006. – том 51. – № 1. – С.42-45.
6. Годовский, О.В. Вивчення імунобіологічних властивостей збудника та розробка інактивованої вакцини проти вірусної діареї ВРХ [Текст] : автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00.03./ О.В.Годовський ; [ННЦ «ІЕКВМ»]. – Х., 2007. – 20 с.
7. Жидков, С.А. Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек КРС (характеристика возбудителя, диагностика и специфическая профилактика) [Текст] : дис. докт. вет. наук : 16.00.03 / С.А. Жидков, [ВИЭВ – М., 1994. – 240 с.
8. Зудилина, З.Ф. Выделение вируса диареи крупного рогатого скота [Текст]. / З.Ф.Зудилина // Бюллетень ВИЭВ. – Вып. XIV. – М., 1972. – С.39-40.
9. Илясова, Л.С. Вирус диареи-болезни слизистых в патологии беременности КРС [Текст] : автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00..03 / Л.С. Илясова ; [ВИЭВ]. – М., 1987 – 20 с.
10. Красочко, П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота [Текст] : автореф. дис. докт. биол. наук : 03.00.23, 16.00.03 / П.А. Красочко; [ВИЭВ]. – М., 2008 – 52 с.
11. Малакеева-Чебанюк, І.В. Розробка живої культуральної вакцини проти вірусної діареї великої рогатої худоби [Текст] : автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / І.В. Малакеева-Чебанюк, [ІЕКВМ]. – Х., 2008. – 20 с.

### REDUCTION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CATTLE DIARRHEA VIRUS, STRAIN KMIEV-7 FROM DRIED STATE

**Matkovskaya S.G.**

*Kharkiv State Zooveterinary Academy*

*In culture of cells of transferred line of epithelium of calf coronary vessels from dried state reduced the cattle diarrhea virus, strain KMIEV-7, cultivated and accumulated in transferred line of cells of cow kidney (MDBK). The virus accumulated in titer 7 lgТЦД<sub>50</sub>/мл after 4-passage.*

## УДК:619:616.98:578.831.1:636.5

### БИОЛОГІЧНІ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВОГО ЕПІЗООТИЧНОГО ШТАМУ ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ НХ/КУРКА/ІВАНО-ФРАНКІВСЬК/58/2007

**Музика Д.В., Стегній А.Б., Герілович А.П., Стегній М.Ю., Рула О.М., Зандарян С.Ю.**

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

Ньюкаслська хвороба – одна з найнебезпечніших вірусних хвороб сільськогосподарських та диких птахів в світі. Широко поширена в більшості країн світу з розвиненим птахівництвом. Спалахи захворювання постійно реєструються в Європі, Азії, Африці та Америці [1, 2], відносна стабільність щодо цього захворювання спостерігається в країнах Океанії [3]. Так, за даними МЕБ в період з 2007 по 2009 роки ньюкаслська хвороба була зареєстрована в 26 країнах світу: Ботсвані, Болгарії, Чилі, Чехії, Естонії, Греції, Гондурасі, Італії, Японії, Румунії, Сербії, Словаччині, Белізі, Домініканській Республіці, Фінляндії, Німеччині, Перу, Румунії, Азербайджані, Бельгії, Хорватії, Ізраїлі, Нідерландах, Іспанії, Швеції, Швейцарії. Необхідно відзначити, що здебільшого ньюкаслська хвороба реєструвалася серед свійських птахів з присадибних господарств, а також голубів. Більшість випадків захворювання виявлено на Європейському континенті. Також необхідно відзначити, що в 2007 році зафіксовано випадок захворювання та загибелі 48 диких птахів на ньюкаслську хворобу в Чилі. Вже з початку 2010 року було зареєстровано 24 спалахи ньюкаслської хвороби в 5 країнах (Беліз, Бельгія, Ізраїль, Італія, Іспанія) вражено понад 206 тисяч сільськогосподарських птахів [4]. Що стосується України, то вона вважалася вільною від ньюкаслської хвороби з 1992 року. Останній, офіційно зареєстрований, випадок захворювання було встановлено в січні 2006 року на одній з птахофабрик Харківської області. Після комплексу протиепізоотичних заходів з червня 2007 року територія України за даними Державного комітету ветеринарної медицини України та МЕБ вільна від ньюкаслської хвороби.

Одним з найефективніших заходів боротьби з ньюкаслською хворобою є застосування живих та інактивованих вакцин, іншої альтернативи не існує. Саме тому особливо актуальною є постійна розробка нових та вдосконалення існуючих вакцинних препаратів. Згідно, встановлених МЕБ правил, обов'язковим тестом контролю нових вакцин є контрольне зараження вакцинованої птиці епізоотичним штамом вірусу. В зв'язку з цим актуальним є пошук нових епізоотичних штамів, які можуть бути використаними в якості контрольних. Перед тим, як штам вірусів будуть рекомендовані в якості контрольних, необхідно ретельно вивчити їх біологічні, молекулярно-генетичні, морфологічні властивості, тому **метою наших досліджень** було вивчити морфологічну структуру, патогенність, молекулярно-генетичні особливості вірусу ньюкаслської хвороби, який ізольований від курей НХ/курка/Івано-Франківськ/58/2007.

**Матеріали та методи.** В дослідженнях використовували штам вірусу ньюкаслської хвороби НХ/курка/Івано-Франківськ/58/2007. Збудника розмножували на 9-11 добових курячих СПФ ембріонах. Ідентифікацію проводили за допомогою РЗГА з використанням референтних сироваток крові Інституту зоопрофілактики (Італія) згідно рекомендаціям МЕБ [1]. Електронно-мікроскопічні дослідження морфології вірусу проводи-