

## **Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунологічних препаратів**

a Recombinant Capripoxvirus Vaccine / Reuben K. Soi, Fred R. Rurangirwa, Travis C. McGuire, Paul M. Rwambo, James C. DeMartini, and Timothy B. Crawford // Clinical and Vaccine Immunology. 2010.. – p. Vol. 17, No. 12. – P.1842-1849. 7. Rift Valley Fever: Recent Insights into Pathogenesis and Prevention / Hani Boshra [et al] // JOURNAL OF VIROLOGY. – 2011. – Vol. 85, No. 13. – P. 6098-6105. 8. The Deadly Dozen: 12 Diseases Global Warming Incubates/From Lyme Disease to Ebola Virus, The World Is Getting Sicker. [Електронний ресурс]. – 2008. – Режим доступу: <http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-warming-47100803#ixzz1UdUAav4g>. – Зарг.с екрана.

### **ANTIGENIC ACTIVITY OF INACTIVATED RIFT VALLEY FEVER VIRUS**

**Baluisheva V.I., Kapustina O.V., Zakutsky N.I., Imatdeinov I.R.**

*State Research Institution National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia (SRI NRIVVaMR), Pokrov, the Russian Federation*

*The paper presents some results obtained on a Rift Valley fever virus inactivation which allow production of an inactivated raw virus preserving its antigenic and immunogenic activity levels. The diethylenimine- and A-24-inactivated preparations induced complement-fixation and haemagglutination antibody synthesis at a rate of 1:256-512 and 1:512-1024, respectively on day 21 to 28 post their inoculation to mice or sheep. The vaccinated mice were resistant to challenge with a virulent virus strain at a dose of 1000 LD<sub>50</sub>.*

УДК 619:616.98:578.825.1

### **МІКРОМЕТОД РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСНОГО ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ**

**Білецька Г.В., Юрко П.С., Музика Н.М., Грибкова Н.П.**

*Інститут птахівництва НААН, с. Бірки*

Вірусний ентерит гусей (ВЕГ) – висококонтагіозна хвороба, що характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту, серця, печінки, прогресуючим схудненням та високою летальністю молодняка гусей 4-30-добового віку. Захворювання широко розповсюджене в країнах, які займаються гусівництвом, у тому числі й в Україні [1, 2, 3].

Вірус легко передається аліментарним, аерогенним, контактним шляхами та трансваріально. Джерелом інфекції є хворі та загиблі гусенята, а також дорослі гуси-вірусоносії [4].

Важливою умовою боротьби з вірусним ентеритом є наявність достовірної інформації щодо розповсюдження цього захворювання в Україні, прогнозування його виникнення та своєчасна діагностика та профілактика. Одним із методів вивчення епізоотологічного статусу щодо інфекційних захворювань є проведення серомоніторингу.

В Україні для визначення серопозитивності до вірусного ентериту та проведення імуномоніторингу застосовуються реакція нейтралізації (РН) [5] та реакція непрямой гемаглютинації [2, 5], завершується розробка методу імуноферментного аналізу [6].

Серед методів імунодіагностики особливої уваги заслуговує реакція нейтралізації, оскільки вона є найбільш універсальною, високоспецифічною та використовується як еталон при оцінці інших реакцій в вірусології. Проте, постановка реакції потребує високої кваліфікації спеціалістів, вона трудомістка та затратна.

Метою досліджень було відпрацювати мікробаріант РН з метою його використання для контролю імунної відповіді на щеплення проти вірусного ентериту, що дозволить спростити та здешевити постановку реакції.

**Матеріали та методи.** Реакцію нейтралізації проводили з постійною дозою вірусу. Для проведення досліджень макро- та мікрометодами використовували культуру фібробластів ембріонів гусей (ФЕГ), виготовлену за загальноприйнятою методикою. Для макрометоду використовували пробірки, у які вносили 1,5 см<sup>3</sup> ростового середовища. РН в мікробаріанті проводили в одноразових полістиролових культуральних планшетах з об'ємом ростового середовища 0,15 см<sup>3</sup> (150 мкл). Дослідні сироватки інактивували за температури плюс 56 °С протягом 30 хвилин та готували розведення на стерильному середовищі 199 або Ігла ДМЕМ, починаючи з 1:10 до 1:5120. До кожного розведення сироватки додавали рівну за об'ємом кількість відтитрованого вакцинного штаму ВВS-99 вірусу ентериту гусей в дозі 1000 ТЦД<sub>50</sub>. Суміш інкубували за температури плюс 37(±0,5) °С протягом 1 години. Потім суміш вносили в 4 лунки по 0,1 см<sup>3</sup> (мікрометод) або в 4 пробірки по 1 см<sup>3</sup> (макрометод) з культурою гусячих фібробластів та інкубували в СО<sub>2</sub>-інкубаторі за температури плюс 37(±0,5) °С протягом 5-7 днів. Одночасно ставили контролю: 1) контроль вірусу – 4 лунки або пробірки, в які вносили вірус штаму ВВS-99 у дозі 1000 ТЦД<sub>50</sub> з'єднаним із середовищем у рівному об'ємі; 2) контроль дослідної сироватки – сироватку в розведенні 1:10 змішували із середовищем у рівному об'ємі, та суміш вносили в 4 лунки або пробірки з культурою клітин; 3) контроль середовища – 4 лунки або пробірки з незараженою культурою фібробластів. Для оцінки РН щоденно проводили мікроскопію інфікованої культури під малим збільшенням мікроскопу. За титр дослідної сироватки приймали те розведення, яке затримує розвиток ЦПЕ вірусу в 50 % інфікованих культур клітин.

Постановку реакції нейтралізації двома методами здійснювали з 19 сироватками крові, одержаних від гусей, які щеплювались дворазово перед початком несучості проти вірусного ентериту. Кров відбирали через 5 місяців після щеплення.

**Результати досліджень.** У ході постановки РН мікрометодом кількість витрачених матеріалів та робочого часу була значно менша в порівнянні із макрометодом. Так, кількість культуральних середовищ та дослідних сироваток відрізнялась у 10 разів, що дозволяє економити до 100 грн. при дослідженні 25 проб сироваток крові. Економія робочого часу спостерігалась за рахунок використання багатоканальних автоматичних піпеток та культуральних планшетів.

При порівнянні результатів постановки реакції нейтралізації макро- та мікрометодом не виявлено суттєвих відмінностей в титрах досліджуваних сироваток (табл.). При обчисленні наведених у таблиці результатів за статистичними методами достовірної різниці не встановлено, коефіцієнт кореляції становив 0,97.

На підставі одержаних даних підготовлені «Методичні рекомендації по постановці реакції нейтралізації мікрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей».

**Висновки.** 1. Розроблено мікрометод реакції нейтралізації та доведена можливість його використання на рівні з макрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей.

2. Підготовлені «Методичні рекомендації по постановці реакції нейтралізації мікрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей».

3. Постанова мікрометоду реакції нейтралізації дає можливість зменшити затрати матеріалів та робочого часу на постановку реакції.

Таблиця – Результати титрування сироваток крові гусей макро- та мікрометодом

№ сироватки	Результати РН		Коефіцієнт кореляції
	Макрометод	Мікрометод	
1	3,82	3,32	0,97
2	7,32	8,82	
3	5,32	3,82	
4	4,32	4,32	
5	4,32	4,32	
6	4,82	4,82	
7	4,32	4,32	
8	7,32	7,82	
9	9,32	9,82	
10	9,32	9,32	
11	10,32	11,82	
12	9,32	9,82	
13	10,32	9,32	
14	7,32	7,82	
15	9,32	9,32	
16	6,32	5,82	
17	9,32	10,32	
18	9,32	10,32	
19	6,32	6,32	
СГТ, log <sub>2</sub>	7,27±0,54	7,45±0,63	

Примітка: \* – середньоегеометричний типр антитіл ( $M \pm m$ )

#### Список літератури

1. Вивчення епізоотологічного статусу щодо вірусного ентериту гусей методом серомоніторингу [Текст] / Г. В. Білецька [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 81. – С. 45–51. 2. Неволько, О. А. Щодо вірусного ентериту гусенят [Текст] / О. А. Неволько, О. П. Хамко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 84. – С. 518–519. 3. Chu Ch.-Yen Genetic variation of the nucleocapsid genes of waterfowl parvovirus [Text] / Ch.-Yen Chu, M.-J.Pan, J.-T.Cheng // J. Vet. Med. Sci. – 2001. – Vol. 63, № 11. – P. 1165–1170. 4. Лабораторная диагностика болезней птиц [Текст] : справ. / Р. Н. Коровин, В. П. Зеленский, Г. А. Грошева. – М. : Агропромиздат, 1989. 5. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине [Текст] : справ. пособие / А. Н. Головки [и др.] ; под ред А. Н. Головки. – Х. : НТМТ, 2007. – 512 с. 6. Музика, Н. М. Тест-система для виявлення антитіл до вірусу ентериту гусей методом ІФА [Текст] / Н. М. Музика // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 172–175.

#### MICROMETOD OF NEUTRALIZATION TEST FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST VIRAL ENTERITIS OF GEESE

*Bilets`ka G.V., Yurko P.S., Musika N.N., Gribkova N.P.*

*Poultry Research Institute of NAAS, Borky*

*Micrometod of neutralization test for detection of antibodies against viral enteritis of geese has been adapted, that made it easier and cheaper. Significant differences of sensitivity have not been established at the comparison the results of micro-and makrometod of neutralization test.*

УДК 619:616.98:579.873.21

#### ВИПРОБУВАННЯ ТУБЕРКУЛІНУ СУХОГО ОЧИЩЕНОГО (ППД) ДЛЯ ССАВЦІВ У ПОРІВНЯННІ З ЗАКОРДОННИМ АНАЛОГОМ «BOVITUBERCULIN AN<sub>5</sub>» (PUŁAWY) IN VIVO

*Білушко В.В.*

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

Стандартизація – головний етап контролювання якості туберкуліну перед застосуванням в умовах виробництва для алергічної діагностики туберкульозу. Основним критерієм стандартизації є інтенсивність біологічної реакції, що залежить від кількості специфічного туберкулопротеїну у препараті (в межах 0,005-0,5 мг білка в 1,0 см<sup>3</sup> розчину) [1, 2, 3].

У процесі створення вітчизняного стандартного зразку ППД-туберкуліну для ссавців (національного стандарту) важливою складовою є порівняльні дослідження з закордонними аналогами, що дозволяє гармонізувати алергічну діагностику туберкульозу тварин в Україні до вимог міжнародного співтовариства, зокрема, ЄС [4].

Метою роботи було провести експериментальну оцінку біологічної активності дослідних серій туберкуліну сухого очищеного (ППД) для ссавців у порівнянні з аналогічним препаратом польського виробництва «Bovituberculin AN<sub>5</sub>».

**Матеріали та методи.** Дослідження проведені в лабораторії з вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ» на морських свинках, сенсibiliзованих, за 30 дів до початку експерименту, зависю живої культури вакцинного штаму BCG у дозі 1,0 мг бакмаси в 1,0 см<sup>3</sup> стерильного ізотонічного розчину. Лабораторних тварин використовували з живою вагою не менше 350,0 г. Морські свинки були клінічно здоровими і не реагували до початку дослідження на внутрішньошкірне введення туберкуліну для ссавців. У роботі використовували середню пробу 3-х дослідних серій (C1, C2 і C3) туберкуліну