

**Синицин В.А., доктор ветеринарних наук,  
Капранюк Р.О., провідний ветеринарний лікар,  
Куликова В.В., аспірант\*,**

Інститут ветеринарної медицини УААН (м. Київ)

## РОЗРОБКА ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНОГО АРТЕРІІТУ ТА ГРИПУ КОНЕЙ

### Постановка проблеми

Одними з найрозповсюджених і найнебезпечніших хвороб коней є грип та вірусний артеріїт. Грип коней характеризується лихоманкою, різким сухим кашлем та запаленням верхніх дихальних шляхів. Вірусний артеріїт коней характеризується гострим чи латентним перебігом із проявом абортів, кон'юнктивітів, некротичних уражень артерій та вен (4).

Грип коней при виникненні в господарстві призводить до значних економічних збитків. Вірусний артеріїт коней викликає втрату продуктивності у жеребців, у кобил характеризується викиднями у 3-10 місяців вагітності, унеможливає участь жеребців у кінно-спортивних змаганнях, аукціонах, де коні можуть інфікуватися.

На сьогодні епізоотична ситуація щодо грипу коней залишається складною, про що свідчать спалахи хвороби в господарствах України. Нами зафіксовано понад 20 випадків захворювання упродовж сезону 2006-2007 років. Епізоотична ситуація з вірусного артеріїту коней залишається також складною, оскільки необхідно діагностувати жеребців під час парувальної кампанії, й експорту та імпорту коней з України.

Головним у боротьбі з грипом та вірусним артеріїтом коней є своєчасне проведення діагностики й профілактики захворювань.

Нині для проведення серомоніторингу щодо грипу коней існує метод прямої гемаглютинації, непрямой гемаглютинації, виділення вірусу на курячих ембріонах. Для вірусного артеріїту коней такими реакціями є реакція зв'язування комплексу

*У процесі виготовлення імуноферментної тест-системи для діагностики грипу та вірусного артеріїту коней збудник грипу коней культивували на курячих ембріонах десятиденної інкубації; збудник вірусного артеріїту коней культивували на культурі клітин RK-13. Очистку та концентрування вірусу проводили шляхом адсорбційної та гел'єхроматографії на макропористих сорбентах. Застосування одержаного очищеного й концентрованого вірусу (грипу та вірусного артеріїту) в імуноферментному методі з використанням антивидового імунопероксидазного кон'югату, виготовленого за методом Nakape (в нашій модифікації), показало високу активність та специфічність компонентів діагностикума, на основі чого розроблена та затверджена Департаментом ветеринарної медицини України нормативно-технічна документація.*

ту, реакція нейтралізації, реакція мікронейтралізації. Найчутливішою та високоспецифічною з них вважається реакція нейтралізації на культурі клітин, але для її постановки необхідні культуральні середовища, сироватка, висококваліфіковані спеціалісти, час; реакція трудомістка й тривала в постановці – результат дослідження стає відомий лише через 5 днів, тому вона не може бути широко впроваджена в практику роботи лабораторії державної ветеринарної медицини (1). Реакція зв'язування

комплексу дозволяє провести епізоотологічну оцінку щодо вірусного артеріїту коней у господарстві, виявити рівень специфічних антитіл, однак чутливість її недостатня.

У зв'язку зі значним розповсюдженням грипу коней та наявністю прихованої форми інфекції у вірусного артеріїту коней виникла необхідність розробки сучасних високочутливих діагностичних тест-систем, до яких належить і метод імуноферментного аналізу. Вперше цей метод був застосований у гістохімії, після чого став використовуватися для визначення різноманітних фізіологічно активних речовин – від ліків та гормонів до вірусів і бактерій (4). Нині він широко практикується для діагностики більшості вірусних та бактеріальних захворювань коней.

Імуноферментний аналіз дозволяє виявити комплекс антиген-антитіло за допомогою субстрату, який розщеплюється ферментом із появою забарвлення. Суть методу полягає у використанні антигенів та антитіл, зв'язаних із ферментами (тобто кон'югатів). Найбільшого

\*Керівник – доктор ветеринарних наук В.А.Синицин.

розповсюдження в практиці ветеринарної медицини – усього різноманіття існуючих сьогодні варіантів – набув твердофазний варіант ІФА. Він успішно використовується як для виявлення вірусних антигенів, так і специфічних антитіл у тварин-реконвалесцентів або імунізованих протівірусними вакцинами. Головна перевага методу – його висока чутливість та специфічність, яка досягається лише за використання високоочищених і концентрованих антигенних препаратів. Реагенти, що використовуються в реакції (антиген, адсорбований на твердій фазі та кон'югат антиглобулін-фермент), можуть бути стандартизовані, реакція методично проста й легко контролюється (6-8).

Популярність імуноферментного аналізу можна пояснити високою, порівняно з іншими, чутливістю методу, безпечністю, швидкістю постановки реакції, автоматизацією процесу постановки реакції, стандартизацією обліку даних та комп'ютерною обробкою результатів (5).

На сьогодні розроблені й випускаються в різних країнах світу комерційні набори для діагностики грипу і вірусного артеріїту коней.

**Мета роботи:** розробити вітчизняний набір ІФА для діагностики вірусного артеріїту та грипу коней. Виконати такі завдання: випробувати один із способів концентрації й очистки вірусу грипу і збудника вірусного артеріїту коней; одержати антивидовий імунопероксидазний кон'югат.

Роботи проводилися в лабораторії вірусології та діагностики Інституту ветеринарної медицини УААН.

**Матеріали дослідження.** В якості антигену для імуноферментного методу були використані: для грипу коней – штам А/кінь/Кембридж (63) 7N7 та А/кінь/Майами (63) H3N8, для вірусного артеріїту коней – референтний штам *Vesuvius*. Культура клітин RK-13, курячі ембріони десятиденного віку.

**Методи дослідження:** для одержання специфічного антигену грипу коней використовували курячі ембріони десятиденного віку, які закупували на птахофабриках. Титр вірусу контролювався за допомогою РГА.

Розмноження вірусу артеріїту коней – штам

*Vesuvius* – проводили на культурі клітин нирки кроля RK-13, яку отримували загальноприйнятим методом (3).

Після пересіву концентрацію клітин доводили до 500-600 тис./мл; в якості культурального середовища використовували середовище Ігла та 199 у співвідношенні 1:1, до суміші додавали 10-12% сироватки крові великої рогатої худоби, отриману суспензію розливали у флакони або матраци. Клітинну культуру через 18-24 години інфікували внесенням матричної розплідки на моношар (титр вірусу 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, у дозі для флаконів – 0,5 мл, а матраци – 1 мл). За наявності чітко вираженої цитопатичної дії культуру клітин піддавали заморожуванню при – 20 °С. Титр вірусу в рідині обчислювали за методом Ріда та Менча в тканинних цитопатичних дозах (ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). Після відтаювання отриману вірусвміщуючу рідину використовували для очищення й концентрування.

**Результати досліджень.** Для очистки та концентрування вірусів грипу та вірусного артеріїту коней використовувалася методика адсорбційної хроматографії та гелі-хроматографії на макропористому склі.

У дослідах із використанням макропористих сорбентів (МПС) для очищення вірусних антигенів встановлено, що віруси адсорбуються на поверхні МПС. Відмічено, що розділення тканинних компонентів від вірусних у значній мірі залежить від діаметра пор МПС, пористості МПС, перерізу та висоти колонки, вибору швидкості подачі на колонку вірусної рідини, умов сорбції і десорбції.

Для вільної дифузії вірусних частин у пори сорбента розмір вірусу повинен бути набагато меншим діаметра пор сорбенту. З цією метою для адсорбційної хроматографії ми використовували МПС із широким спектром пор – від 2000 до 10000 Å<sup>o</sup> (табл. 1).

Після визначення оптимальних діаметрів пор МПС і розміру гранул, продовжили дослідження з розробки інших параметрів проведення адсорбційної хроматографії: вибір швидкості подачі на колонку вірусної суспензії, умов сорбції і десорбції.

### 1. Параметри макропористих сорбентів

Марка сорбенту	Середній діаметр пор, нм	Пористість, см <sup>2</sup> /г
МПС 2000	213	2,69
МПС 4000	406	2,16
МПС 8000	880	2,00
МПС 10000	990	0,64

Висота хроматографічної колонки становила 35 см із перерізом 3,0 см<sup>2</sup>.

Швидкість подачі на колонку вірусної суспензії вибрали, виходячи з можливості сорбенту в межах 0,06-10 см/хв.

Проведеними дослідженнями встановлено, що оптимальна швидкість пропускання вірусної рідини через колонку становить 5 см<sup>3</sup>/хв., яку ми надалі й використовували.

Досліди показали, що найкраща сорбція вірусу на МПС проходить при рН 5,5-6,0, тобто при тих значеннях, коли поверхня сорбенту незаряжена або МПС несе слабкий негативний заряд.

Після проходження вірусної суспензії через колонку перед етапом десорбції додатково промивали її буферним розчином, який був підібраний так, щоб виключити можливість десорбції вірусів із поверхні сорбенту. При цьому тканинні білки вимивалися з вільного об'єму рН 7,2-7,4, десорбцію вірусу проводили буферним розчином рН 8,7-8,8. Хроматографію та контроль виходу пікових фракцій проводили за допомогою ультрафіолетового детектора з довжиною хвилі 254 нм. Хроматографію і контроль виходу пікових фракцій проводили за допомогою ультрафіолетового детектора типу "Увікорд". Вибір сорбентів здійснювали з розрахунку розмірів вірусів та їх властивостей. Вірусотримуючу рідину вірусу артеріїту коней попередньо очищали від антигенів клітинної природи шляхом адсорбції їх на сорбент МПС 4000 А°, для грипу коней 8000 А°.

Паспортні дані: середній діаметр пор – 3600 А, насипна вага – 0,21 г/см, об'єм колонки – 11 см, висота – 5 см, переріз – 2,2 см. Культуральну вірусотримуючу рідину перепускали через колонки зі швидкістю 18 см/хв при рН 7,2-7,4.

Оптимальний діаметр пор для попередньої очистки 4000 А°. Використання МПС із діаметром пор 700, 2000, 5000, 8000 А° призводило до значних витрат вірусу за рахунок сорбційних взаємодій вірусів із МПС.

Для вільної дифузії вірусних частин у пори сорбенту розміри вірусів повинні бути набагато меншими діаметру пор сорбенту, тому на другому етапі адсорбційної хроматографії використовували МПС із широким спектром діаметру пор (від 500 до 16000 А), розміри гранул сорбенту – в межах 0,1-0,3-5 мм.

Після визначення оптимальних діаметрів пор МПС і розміру гранул, продовжили дослідження з розробки інших параметрів проведення адсорбційної хроматографії: вибір швидкості подачі на колонку вірусної суспензії, умови сорбції і

десорбції.

Дослідами встановлено, що найкраща сорбція вірусу на МПС проходить при значенні рН 5,5-6,0, тобто при тих значеннях, коли поверхня сорбенту незаряжена чи МПС несе слабкий негативний заряд.

Чистоту одержаних вірусних фракцій перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ). Для електрофорезу використовували 7%-ий гель, електродний тріс-гліцинів буфер (рН = 8,6), камеру та реактиви фірми «Реанал».

Паралельно з отриманням очищеного антигену готували антивидовий імунопероксидазний кон'югат. Спочатку із нормальної сироватки крові коней осаджували гама-глобулінову фракцію за допомогою поліетиленгліколю з молекулярною масою 6000 з кінцевою концентрацією 8%. Центрифугували при 3000 об./хв. 30 хвилин; осад розчиняли у фізіологічному розчині й пропускали через колонку з ДЕАЕ Сефадексом А-50. Одержаний у такий спосіб препарат імуноглобуліну G (Ig G) використовували для гіперімунізації кролів, яку проводили в два етапи.

Через сім днів після останнього введення відбирали кров для визначення титру антитіл, далі кролів знекровили, із сироватки крові виділили IgG методом, означеним вище, і в подальшому використовували для одержання кон'югату з пероксидазою хрому за Nakane (7).

Отримані таким чином концентровані препарати давали чітку реакцію в імуноферментному аналізі з імунними сироватками: в лунки ряду А по 0,18 см<sup>3</sup> ФРТ, в лунки усіх інших рядів мікропланшети – по 0,1 см<sup>3</sup> ФРТ.

Після цього в лунки ряду А вносили по 0,02 см<sup>3</sup>: в першу і другу лунки – сироватки крові специфічної до вірусу (K<sup>+</sup>); третю і четверту – сироватки крові негативної (K<sup>-</sup>); п'яту, шосту, сьому і восьму – позитивних стандартних сироваток крові з попередньо визначеними в даній системі ІФА титрами специфічних антитіл до антигену вірусу; в дев'яту, десяту і одинадцяту – негативних стандартних сироваток крові коней; в дванадцяту лунку сироватки крові не вносили і шляхом подвійних розведень титрували сироватки всіх лунок, ретельно перемішуючи тричі кожне розведення від 1:10 до 1:1280. Потім накрили планшет кришкою і помістили в термостат на 1 годину при температурі 37,5 °С. Після інкубації вміст лунок злили й промили за допомогою автоматичного промивача.

Кон'югат розчиняли у 12 см<sup>3</sup> ФРТ. У відмиті лунки мікропланшети вносили по 0,1 см<sup>3</sup> кон'югату.

2. Результати досліджень очищених вірусних препаратів

До очищення			Після очищення		
серії вірус-вміщуючої рідини	вміст білку, мг/мл	активність	отримані фракції	вміст білку, мг/мл	активність
ВАК-реф. штам <i>Vesugus</i>	6,8	4,8 ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ВАК-реф. штам <i>Vesugus</i>	0,696	6,5 ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
грип коней – штам А/кінь/Кембридж (63) Н7N7	4,8	в РА 1:32	Грип коней – штам А/кінь/Кембридж (63) Н7N7	0,25	в РА 1:256
грип коней – штам А/кінь/Майами (63) Н3N8	7,3	в РА 1:16	Грип коней – штам А/кінь/Майами (63) Н3N8	0,73	в РА 1:512

Після інкубації 1 годину при температурі 37,5°C, мікропланшет відмивали 6-7 разів ФРТ та тричі – дистильованою водою. Для видалення вологи із лунок планшет постукали по фільтрувальному паперу.

Субстрат ортофенілдіамін (ОФД) розчиняли у темному місці в 9 см<sup>3</sup> дистильованої води. Після повного розчинення ОФД безпосередньо перед внесенням у лунки мікро планшета внесли по 0,1 см<sup>3</sup> розчину субстратної суміші, інкубували при + 18-22°C в темному місці до 15-20 хвилин. При досягненні забарвлення позитивного контролю реакцію зупиняли додаванням до кожної лунки по 50 мкл розчину кислоти. Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначили оптичну густину (492) нм на автоматичному спектрофотометрі.

У дослідях при розробці методу ІФА нами було отримано 3 серії вірусних препаратів. У всіх серіях визначали титр вірусу на культурі клітин РК-13, в РА та вміст білку до і після очищення. Результати наведені в таблиці 2.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни: Справочник / Под ред. Б.И. Антонова. – М.: Агропромиздат, 1987. – 240с.
2. Галатюк О.Є. Заразні хвороби коней // Видво: Волинь. – Житомир, 2003.
3. Голубев А.Д., Соминина А.А. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – Л.: Медицина, 1976.
4. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. Теория и практика ИФА. – М.: Высшая школа, 1991. – С.23-24.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-

Застосування одержаних компонентів ІФА-набору показало їх специфічність.

**Висновки:**

1. Для очистки вірусу артеріїту коней застосовано метод хроматографії на МПС. Одержано очищений та концентрований вірусний препарат, титр якого становив від 0,0 до 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, вміст білку – 0,696 мг/мл.

2. Для очистки вірусу грипу коней випробувано метод хроматографії на МПС. У дослідях одержано очищений і концентрований вірусний препарат штамів А/кінь/Кембридж(63)Н7N7 та А/кінь/Майами(63)Н3N8, титр становив 1:256, вміст білку – 0,25 мг/мл А/кінь/Кембридж (63) Н7N7. Для штаму вірусу грипу А/кінь/Майами (63) Н3N8 титр становив 1:512, вміст білку – 0,73 мг/мл.

3. Одержані очищені й концентровані вірусні препарати, антивидовий імунопероксидазний кон'югат проявили високу активність у реакції ІФА, що дає підстави для створення сучасних діагностичних експрес-тест систем.

биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2000. – 495с.

6. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом / Под ред. А.А. Гусева, А.Н. Панина. – Владимир, 1998. – С.6-9.

7. Фримель Г. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – 472с.

8. Oellerich M. Enzyme immunoassay in clinical chemistry/ Present status and trends// J. Clin. Chem. Biochem. – 1980. – Vol. 18. – P.197-208.

УДК: 619: 614.31:616-072/-073:637.12:616.155.392:636.2

© 2008

*Білик Р.І., Іщенко Л.М., аспіранти,  
Мельничук С.Д., доктор біологічних наук,  
Якубчак О.М., доктор ветеринарних наук,  
Спиридонов В.Г., кандидат біологічних наук,  
Національний аграрний університет, Київ*

## ПЕРСПЕКТИВИ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ МЕТОДОМ ПЛР ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ПРОБ МОЛОКА

### Постановка проблеми.

Нині, у відповідності до чинних нормативно-правових актів в Україні, законодавчовизнаним мето-

дом діагностики лейкозу у ветеринарній практиці є реакція імунодифузії (РІД). Вона є високоспецифічною з середнім показником чутливості. Однак окремі автори вказують на нестабільність показників РІД і недостатню чутливість цього методу діагностики (2). Сучасні методи імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у діагностиці лейкозу мають, порівняно з РІД, ряд переваг: більш високу точність, вищу чутливість і повторюваність результатів, а також можливість використовувати для аналізу не лише сироватку або плазму крові, а й інші біологічні субстрати організму (5-6).

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Понад століття вчені багатьох країн проводять широкомасштабні дослідження з вивчення етіології лейкозу великої рогатої худоби (ЛВРХ), отримуючи значну кількість фактів, що свідчать про інфекційну природу цієї хвороби (1).

На первинних етапах вивчення вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ) вченими доведено, що кров та молоко, отримані від хворих корів і тварин із прихованим перебігом лейкозного процесу, є факторами передачі збудника хвороби (3-4). Дослідники виділили з молока корів, хворих на лейкоз, структури за морфологією схожі на зрілі віріони типу С та виявили подібні частинки в культурах лімфоцитів крові. Цим частинкам надано морфологічну характеристику, що у майбутньому визначило пріоритет авторства на відкриття ВЛВРХ. Слід зазначити, що результати вивчення відтворення ЛВРХ оцінювалися за показниками гематологічних та цитологічних досліджень, які не вирішили проблему пошуку етіологічного фактору ЛВРХ та його досконалої діагностики (7).

*Вивчено особливості адаптації методу полімеразної ланцюгової реакції для діагностики та моніторингу лейкозу великої рогатої худоби з використанням молока, отриманого від корів різної стадії лактації.*

Доведено, що визначення в молоці, молозиві та секреті вимені сухостійних корів антитіл до ВЛВРХ методом діагно-

стики РІД та ІФА дозволяє встановити інфікованість тварин цим вірусом. У країнах ЄС використовують аналогічні методи аналізу збірного молока з метою моніторингу благополуччя ферми та поголів'я щодо ЛВРХ (5).

Слід зазначити, що ПЛР надає можливість більш достовірно встановити наявність лейкозної інфекції, завдяки виявленню в лімфоцитах крові специфічного для провірусу фрагменту ДНК.

Однак використання методу ПЛР для виявлення вірусу лейкозу в молоці є децю проблематичним. Це пов'язано з невеликою кількістю лейкоцитів у молоці корів; клітинний склад секрету молочної залози нагадує в деякому співвідношенні клітинний склад крові. Кількість клітин у секреті молочної залози залежить від стадії лактації та фізіологічного стану тварини. Найбільша кількість соматичних клітин міститься в молозиві, значно менше їх у молоці. Основну масу клітин молозива становлять лейкоцити гематогенного походження. Вони морфологічно й функціонально схожі з такими ж клітинами периферійної крові. В молозиві корів кількість їх може досягати 6-10 тис./мкл. На 5-7-му добу лактації вміст їх зменшується в 2-3 рази й становить  $0,4-1,5 \times 10^9$  л (1).

У доступній літературі нами не виявлено даних про можливість застосування методу ПЛР для аналізу сирого незбираного молока з метою моніторингу ВЛВРХ. Такі дослідження дали б змогу визначити специфічність і чутливість методу на важливому об'єкті: первинному кормі для молодняка ВРХ та сировині для виробництва молочної продукції. Крім того, використання молока для діагностики ВЛВРХ є більш гуманним і дозволяє уникнути стресів для корів на різній стадії лактації та ефективно здійснювати виробництво безпечної молочної продукції для

споживачів.

**Метою роботи** є адаптація методу ПЛР у реальному часі для виявлення вірусу лейкозу великої рогатої худоби в індивідуальних пробах молока.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проводили у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Дослід тривав 210 днів.

Досліджували проби молока, отриманого від 14 корів, які за результатами дослідження зразків крові з використанням методу ПЛР у реальному часі були позитивними.

Індивідуальні проби молока відбирали з молочної залози в одноразові стерильні стакани, в кінці доїння (альвеолярне молоко).

Лейкоцитарну ДНК із молока виділяли гуанідін тіоціонатним методом. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Biofotomer (Eppendorf) за довжини хвилі 260 нм. Для одержання ДНК із більшої кількості лейкоцитів зразки молока в кількості 1,5 см<sup>3</sup> центрифугували протягом 15 хв. при 3000 об./хв.

Кожен зразок досліджували у двох повторях. Ампліфікацію проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, що мала наступний склад: 1хПЛР буфер, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,5 мМ кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів, 5 пМ праймерів для детекції провірусної ДНК, 2,5 пМ флуоресцентних зондів, 2,5 пМ праймерів для детекції фрагменту гену PRP, 20 мкМ флуоресцентного барвника ROX, 0,2 у. урацил-ДНК-глікозилази (Fermentas) та 1 у. ДНК-полімерази. ДНК вносили в кількості 10-100 нг.

Ампліфікацію ДНК-мішені здійснювали на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) із наступним температурним профілем: активація урацил-ДНК-глікозилази – 5 хв. при 50°C, активація ДНК-полімерази – 9 хв. при 94°C й наступні 45 циклів ампліфікації, що включали денатурацію упродовж 15 с при 95°C, відпал праймерів 1 хв. при 60° С, елонгацію 30 с при 72°C.

Для отримання якісних і достовірних даних використовували серію контролів: негативний контроль – плазміда, що кодує фрагмент гену PRP; позитивний контроль – суміш двох плазмід, одна з яких кодує фрагмент провірусної ДНК лейкозу ВРХ, друга – фрагмент гену PRP, контроль без матриці (NTC) – замість ДНК до реакційної суміші додавали деіонізовану воду (18,2 мΩ).

Обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3.

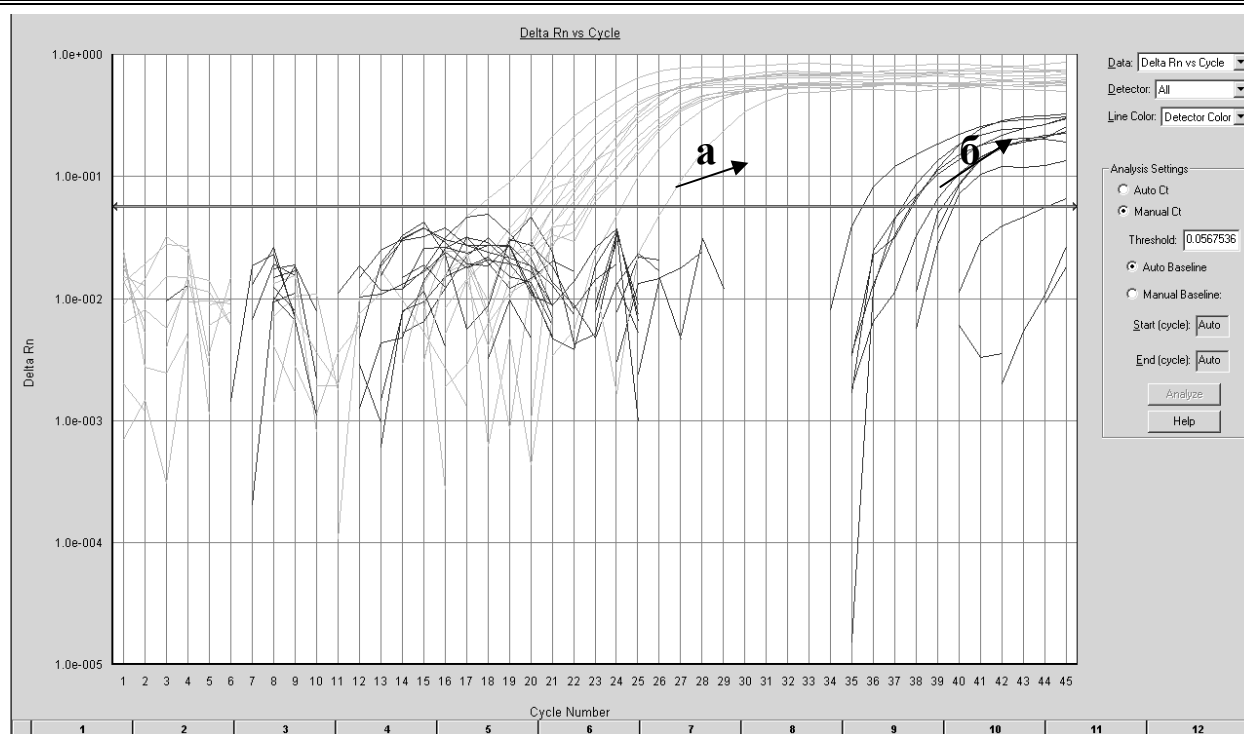
**Результати досліджень.** Результати досліджень індивідуальних зразків молока методом ПЛР наведені в таблиці.

Основним критерієм оцінки результатів, отриманих за допомогою методу ПЛР у реальному часі, є значення граничного циклу Ct, яке характеризує певний цикл ПЛР, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції, порівняно з базовим рівнем (рис. 1).

Як видно із даних, наведених у таблиці, кількість позитивних результатів щодо наявності вірусу лейкозу в пробах молока, порівняно із пробами крові, становить 78%. Слід зазначити

**Результати порівняльних досліджень зразків молока та крові методом ПЛР у реальному часі**

№ проби	Ct крові		Ct молока	
	gp51(FAM)	PRP (JOE)	gp51(FAM)	PRP (JOE)
1	26,42	24,09	33,0	22,33
2	29,12	23,30	–	25,31
3	25,67	22,60	36,78	20,30
4	26,68	23,65	33,35	21,40
5	24,44	22,87	36,76	21,72
6	24,39	23,28	34,52	23,15
7	33,61	25,18	38,71	21,75
8	22,00	20,91	31,07	19,49
9	33,60	23,19	37,63	19,86
10	31,69	20,56	37,19	19,26
11	28,99	19,50	–	19,50
12	22,30	22,09	33,03	22,08
13	24,22	22,88	34,30	20,47
14	33,23	25,13	–	26,88



**Рис. 1. Графіки ампліфікації специфічних фрагментів ДНК ВЛВРХ та внутрішнього контролю, де: а – криві ампліфікації барвника JOE (фрагмент гена PRP); б – криві ампліфікації барвника FAM (фрагмент провірусу лейкозу).**

про відмінність значення граничного циклу  $C_t$  барвника FAM, яким мічений зонд на виявлення провірусу лейкозу в пробах молока, порівняно з пробами крові. У процесі дослідження проб молока встановлено значення  $C_t$  на 8-9 одиниць нижче, ніж у пробах крові. Це пояснюється меншим вмістом лейкоцитів у молоці. Для підвищення чутливості ПЛР із метою виявлення вірусу лейкозу у молоці, нами збільшена кількість циклів ПЛР до 45, що дало можливість отримати більш вірогідні результати.

#### Висновки.

1. Відсоток позитивних результатів дослідже-

них індивідуальних проб молока, відібраних від ПЛР-позитивних по крові корів, складає 78% при збільшенні циклів ПЛР із 40 до 45.

2. Використання удосконаленого методу ПЛР з пробами молока має суттєве практичне значення в молозивний період, особливо для племінних тварин і корів-первісток.

3. Отримані позитивні результати адаптації методу ПЛР у реальному часі для діагностики вірусу лейкозу ВРХ у пробах молока потребують подальшого глибокого вивчення щодо покращання пробопідготовки до ізоляції ДНК із досліджуваних проб.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Гулюкин М.И., Симонян Г.А., Шишкин А.В. О распространении лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринарный консультант. – 2004. – №18. – С.4-5.
2. Крикун В.А. Лейкоз крупного рогатого скота (биологические свойства, особенности распространения и меры борьбы). Автореф. дисс... д-ра вет. наук. – М., 1999. – С.14-17.
3. Лейкоз сельскохозяйственных животных / В.А. Бусол, Н.Н. Доронин, Н.С. Мандыгра и др. – К.: Урожай, 1988. – 264с.
4. Ломакин А.И., Прохвятилова Л.Б., Рыбаков С.С. и др. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реак-

ции // Труды ВИЭВ. – М.: ВИЭВ. – 1999. – Т. 72. – С.192-200.

5. Сучасний метод лабораторної діагностики лейкозу великої рогатої худоби/ Л. Абрамова, Ю. Собко, І. Собко та ін. // Ветеринарна медицина України. – 2003. – № 9. – С.39-41.

6. Тест-система для виявлення ВЛ КРС полімеразної ланцюгової реакції/ Бусол В.А., Лиманська О.Ю., Лиманський А.П. и др. // Ветеринария. – 1999. – № 6. – С.27-30.

7. Miller J.M., Van der Maaten M.J. A review of methods to control bovine leukosis // J.Dairy Sei. – 1982. – V.65, № 11. – P.2194-2203.

УДК 619:617.3:636.2  
© 2008

*Черняк С.В., кандидат ветеринарних наук,  
Білоцерківський державний аграрний університет,*

*Кулинич С.М., кандидат ветеринарних наук,  
Полтавська державна аграрна академія*

## ЦИТОХІМІЧНА АКТИВНІСТЬ ГЛІКОГЕНУ НЕЙТРОФІЛІВ У КОРІВ, ХВОРИХ НА ПОДОДЕРМАТИТИ

### Постановка проблеми.

Як відомо, реакція макроорганізму на запалення характеризується активацією обмінних процесів, зокрема синтез білків у гострій фазі запалення потребує підвищених енерговитрат організму (потреби в енергії зростають від 135 до 200%, залежно від основного обміну та характеру захворювання). При цьому організм активно втрачає жирові депо, запаси глікогену в печінці також зменшуються; енергоресурси поповнюються за рахунок гліоконеогенезу (1).

Тому доцільно – паралельно з вивченням мієлопероксидази – проводити цитохімічну оцінку такого енергетичного компоненту нейтрофілів як глікоген (1, 5).

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Як відомо, у розвитку захворювання значне місце відводиться пригніченню природної резистентності організму – зниженню фагоцитарної та хемотаксичної активності лейкоцитів. Нейтрофіли першими з'являються в осередку запалення, відповідаючи за знищення та елімінацію більшості мікроорганізмів (2). Найважливішими метаболітами нейтрофільних гранулоцитів є МПО (мієлопероксидаза) та глікоген (4-5). Перша є складовою ряду ензимів, що забезпечують розвиток четвертої фази фагоцитозу – переварювання об'єкта, глікоген же є основним джерелом внутрішньоклітинної енергії.

**Мета і завдання роботи** полягали у з'ясуванні цитохімічної активності глікогену поліморфноядерних лейкоцитів у корів, хворих на пододерматити, за різних методів їх терапії.

**Матеріали і методи досліджень.** Виявлені хворі на пододерматит тварини окремих господарств Полтавської області були поділені на групи й піддані різним місцевим методам терапії. У першій групі місцево застосовували пакестики із мідним купоросом, який є складовим ор-

*Встановлена цитохімічна активність глікогену поліморфноядерних лейкоцитів у чорно-рябих корів окремих господарств Полтавської області, які страждають на гнійні пододерматити і були піддані різним методам лікування.*

топедичних наборів фірми „Шуф”, у другій – суспензію, виготовлену на основі 2-меркаптобензтіазолу, до складу якого входять диметилсульфоксид і етилен-

гліколь.

У третій на уражену підшовну поверхню застосовували мазь, що включала: диметилсульфоксид – 5,0, вазелін – 80,0, ланолін – 10,0, 2-меркаптобензтіазол – 2,5, аеросил – 1,5. Четвертій групі використовували мазь “Левоміколь”, до якої у кількості 5% додавали 2-меркаптобензтіазол.

Для місцевого лікування тварин контрольної групи застосовували розроблений нами протизапальний засіб “Санобіт” (бішофіт полтавський 90,05-99,25, аеросил 0,50-4,95, новокаїн 0,25-5,0), Деклараційний патент України №15955 А61 Р 19/ 00 від 17.07.2006р.

У хворих корів кожної з дослідних груп (на першу, десяту та п'ятнадцяту добу) та у здорових корів, дотримуючись правил асептики і антисептики, відбирали проби периферичної крові з яремної вени. Місце уколу стерильної голки ретельно протирали ватним тампоном, змоченим 70% спиртом. Після цього в умовах гематологічної лабораторії УМСА визначали цитохімічну активність глікогену.

Результати досліджень оброблені статистично за допомогою комп'ютера з використанням програми “Exsel”.

**Результати досліджень.** Проведені нами дослідження показали, що у дослідних груп, порівняно з клінічно здоровими, показники, що характеризують активність глікогену, були вірогідно ( $p < 0,001$ ) вищими.

Так, у тварин контрольної групи, порівняно зі здоровими, кількість позитивно реагуючих клітин збільшилася на 23,33%, показник цитохімічної активності нейтрофілів та середній цитохімічний коефіцієнт – на 26,44%, зростання диференційованого цитохімічного коефіцієнта становило 19,23%.



На десяту добу відсоток ПРК відносно першої доби практично не змінився, проте вірогідно ( $p < 0,001$ ) зріс ПЦАН та СЦК. Окрім того відмічали практично триразове зростання ДЦК. До п'ятнадцятої доби кількість позитивно реагуючих клітин, порівняно з десятою добою, зменшилася (3,46%) і була вірогідно нижчою ( $p < 0,01$ ) відносно показника в першу добу. Разом із тим відносно десятої доби знижувався показник цитохімічної активності, середнього (3,22%) та диференційованого цитохімічного коефіцієнта (9,8%). В порівнянні з показниками до початку лікування, вищезначені показники залишалися вірогідно вищими ( $p < 0,001$ ).

У першій групі, в якій застосовували пакетики з сульфатом міді, динаміка багато в чому була схожою до тієї, що спостерігалася в контрольній групі. Слід зазначити, що на десяту добу показники ПЦАН та СЦК стали на 2,7% вищими, ніж у контрольній групі, а ДЦК – на 18,1%.

Відповідно, у другій групі, де використовували суспензію на основі 2-меркаптбензтіазолу, в цей час число ПРК перевищувало показники контролю на 3,05%, ПЦАН та СЦК 6,43%, а ДЦК – на 18,6%.

Водночас у третій групі спостерігали вірогідне зростання ПЦАН, СЦК та ДЦК ( $p < 0,001$ ).

Стосовно контролю показники, відповідно, було вищими – ПЦАН (5,09%), ДЦК (18,6%).

У четвертій групі, на відміну від контрольної та інших груп, запропонований метод лікування сприяв вірогідному ( $p < 0,01$ ) підвищенню на десяту добу кількості ПРК. Разом із тим, ПЦАН хоча й був вищим (2,09%), ніж у контрольній групі, але водночас (0,9-8,1 ум. од.) меншим, ніж в інших дослідних групах.

Після 15 діб, у порівнянні з десятою добою, у тварин дослідних груп спостерігали зменшення кількості позитивно реагуючих клітин; при цьому найбільше показник знизився в другій групі (12,72%), найменше – в четвертій (2,06%).

У даний період в першій групі число ПРК відносно контролю було меншим на 3,14%, у другій – на 7,73%, а третій та четвертий рівні були практично однаковими.

Відносно ПЦАН та СЦК відмітили, що у дослідних тварин він був вищим на 3-11,2 ум. од. порівняно з контрольним, за винятком четвертої групи, в якій він був меншим на 8,2 ум.од. Водночас ДЦК у другій та контрольній групах був практично ідентичним, в першій та четвертій – вищим (17,05-28,37%), а у третій – нижчим (16,05).

Слід зазначити, що після проведеного лікування відносно клінічно здорових показники цитохімічної активності залишалися значно вищими.

**1. Динаміка показників цитохімічної активності глікогену нейтрофілів за різних методів терапії гнійних пододерматитів**

Показники		ПРК %	ПЦАН (ум.од.)	СЦК (ум.од.)	ДЦК (ум.од.)
Клінічно здорові n=5		75,0±4,2	112,3±5,2	1,12±0,01	2,08±0,04
Контрольна група n=36	1-а	92,5±0,49	142±1,33	1,42±0,01	2,48±0,01
	10-а	91,7±0,49	186,5±2,75*	1,86±0,01	7,15±0,44*
	15-а	89,3±0,81°	180,5±3,92*	1,80±0,02	6,45±0,36*
Перша n = 42	1 доба	91,7±0,41	139,7±3,98	1,39±0,01	3,05±0,12
	10-а	92,5±0,37	191,5±2,44*	1,91±0,02	8,45±0,33*
	15-а	86,5±0,78*	190,5±2,18*	1,90±0,01	7,55±0,47*
Друга n = 24	1-а	93,2±0,37	148,5±3,12	1,48±0,01	2,79±0,17
	10-а	94,4±0,42	198,5±2,48*	1,98±0,02	8,48±0,38*
	15-а	82,4±0,53*	191,7±2,16*	1,91±0,01	6,36±0,27*
Третя n = 35	1-а	92,2±0,41	131,2±2,22	1,31±0,009	2,52±0,12
	10-а	94,5±0,37	196±2,18*	1,96±0,01	5,42±0,57*
	15-а	88,4±0,36	183,5±2,48*	1,83±0,02	5,35±0,48*
Четверта n = 26	1-а	89,8±0,54	133,5±2,14	1,33±0,07	2,84±0,27
	10-а	92,4±0,58°	190,4±3,12*	1,90±0,01	8,17±0,22
	15-а	90,5±0,42	172,3±2,05	1,72±0,01	8,28±0,53

° –  $p < 0,05$ ; ° –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,001$

**Висновок.** Отже, отримані нами дані свідчать, що в процесі лікування відмічається підвищення цитохімічної активності глікогену за всіма показ-

никами. При цьому найбільш вірогідне воно на десяту добу, а до п'ятнадцятої спостерігали поступове зниження дослідних показників.

#### БІБЛЮГРАФІЯ

1. *Печникова Г.Н.* Показатели щелочной фосфатазы, пероксидазы и гликогена нейтрофилов крови крупного рогатого скота при фагоцитозе // С.-х. биология. – 1984. – №11. – С.99-102.
2. *Пигаревский В.Е.* Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.: Медицина, 1978. – 128с.
3. *Рейнару И.К., Мяртин Я.К., Тятсов А.А.* Актуальные вопросы иммунодиагностики и иммунотерапии. – Таллин, 1982.– С.3-6.
4. *Свирид С.Г.* Антифунгальный статус фагоци-

тов периферической крови и его комплексная неспецифическая коррекция у больных микозами стоп // Вестник дерматологии и венерологии. – 1991. – №6. – С.16.-19.

5. *Черняк С.В., Кулинич С.М.* Роль мієлопероксидази нейтрофілів у патогенезі грибкових уражень копитець у корів // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2007. – №4. – С.101-103.

УДК 619:616-091:579.882:636.4

© 2008

*Скрипка М.В., кандидат ветеринарних наук,  
Полтавська державна аграрна академія*

## ПАТОЛОГО-АНАТОМІЧНІ ЗМІНИ ПРИ ХЛАМІДІОЗІ ПОРОСЯТ ВІКОМ ДО ОДНОГО ТИЖНЯ

### Постановка проблеми.

В останні роки хламідійні інфекції тварин різних видів отримали широке розповсюдження в усьому світі, в тому числі й на Україні. Інфіковані свині тривалий час (можливо, пожиттєво) залишаються хламідієносіяма. Зниження природної резистентності свиней супроводжується появою клінічних ознак хвороби. Хламідіоз відіграє значну роль в інфекційній патології тварин.

### Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.

Не зважаючи на те, що хламідіоз свиней характеризується різноманітним клінічним проявом, відсутністю патогномонічних ознак, за даними окремих вчених (Н.З. Хазіпова, А.З. Равілова, В.А. Бортнічука, М.К. Потоцького), у поросят підсисного періоду до характерних ознак відносять набряк шкіри та підшкірної клітковини, в багатьох випадках у грудній та черевній порожнинах, а також у перикардальній сумці – скупчення трансудату, в легенях – венозне повнокров'я та набряк. У шлунку та в тонкому відділі кишечника характерним є серозно-слизовий катар, в окремих випадках стінка товстого відділу кишечника знаходиться в стані набряку. Гістологічно виявляють розлади гемодинаміки, дистрофічні зміни та вогнища ареактивного некрозу в печінці, крововиливи та зернисту дистрофію нирок. У тканині мозку – гіперемія капілярів, базофілія нервових клітин. У селезінці спостерігається незакінченість процесу диференціації органа, лімфатичні фолікули не розвинуті (1, 5). За даними Б.Н. Гусева, збудник хламідіозу пригнічує формування клону клітин селезінки та лімфатичних вузлів, які продукують антитіла, внаслідок чого спостерігається гуморальний імунодефіцит (2).

**Мета досліджень та методика їх проведення.** Метою наших досліджень було вивчення патолого-анатомічних змін в органах поросят віком до одного тижня при хламідіозі.

Досліди проводили протягом 2005-2007 рр. на

*У поросят віком до семи діб при хламідіозі характерними ознаками є набряк міокарда, стінки сечового міхура, вогнищева пневмонія з лімфоїдною інфільтрацією міжальвеолярних перегородок. Реєструється слабе заселення лімфоїдних фолікулів селезінки, лімфатичних вузлів та стінки шлунково-кишкового тракту лімфоцитами.*

базі декількох господарств Черкаської та Сумської областей. У поросят, трупи яких були використані для проведення досліджень, лабораторними методами, в тому числі й за допомогою полімераз-

ної ланцюгової реакції, було виявлено збудник хламідіозу. Патолого-анатомічний розтин проводили методом часткової евісцерації (3). Для гістологічних досліджень шматочки органів фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації й через хлороформ заливали в парафін. Одержані препарати фарбували гематоксиліном Караци та еозинном (4) і вивчали під мікроскопом Біолам Р-15 при збільшеннях 15 x 40 – 15 x 90.

**Результати досліджень.** У поросят віком до тижня, які загинули від хламідійної інфекції, підшкірна клітковина має вигляд тоненького прошарку білого кольору, шийні та підщелепні лімфатичні вузли – сіро-рожевого кольору, пружної консистенції.

Легені кремове-рожеві, з ознаками крепітації, на поверхні легень – ледь виражені ділянки м'якшої консистенції, що виступають над загальною поверхнею; спостерігаються поодинокі крапкові крововиливи. Судини кровонаповненні, кров у вигляді згустків темно-червоного кольору.

Серце неправильної форми, пружної консистенції. Верхівка видовжена, права половина значно видається над лівою, борозна між правою та лівою частинами добре виражена. Перикард прозорий, епікард – рожево-кремовий, міокард має рожево-сірий колір, потовщений, ендокард без змін. Спостерігається значне потовщення стінки лівого шлуночка, просвіт лівого шлуночка ледь простежується, правого також дещо зменшений. Співвідношення стінок правої до лівої від 1:5 до 1:7.

Лімфатичні вузли грудної порожнини без видимих змін.

Печінка нерівномірного забарвлення, загальний колір коричнево-червоний зі світлими дифузними ділянками, спостерігаються поодинокі смугасті або крапчасті крововиливи. На поверхні

органа в невеликій кількості зустрічаються сіро-білі округлі ділянки розміром із голівку шпильки і більше. Зіскоб паренхіми відсутній. Жовчний міхур має збільшений розмір, заповнений жовчу жовто-зеленого кольору.

Селезінка рожево-синювата, містить поодинокі смугасті крововиливи, зіскоб паренхіми відсутній.

Підшлункова залоза без видимих змін.

Нирки – правильної форми, сіро-коричневі, драглисті, паренхіма глинисто-рожевого забарвлення, межа між корковою та мозковою зонами згладжена.

Сечовий міхур напівпустий, стінка на 30% потовщена, рожево-білого кольору. У 20-30% випадків на слизовій оболонці зареєстровано ледь помітні поодинокі крововиливи.

Шлунок середнього наповнення, вміст – у вигляді згустків молока, слизова оболонка помірно гіперемійована. Тонкий кишечник у 30-40% тварин дифузно гіперемійований, близько 60% – має плямисте червоне забарвлення, на поверхні слизової оболонки – непрозорий, сірого кольору слиз. Товстий кишечник без видимих змін.

Брижові лімфатичні вузли глинисто-рожевого кольору, дещо збільшені, пружної консистенції.

Пахові лімфатичні вузли у 60% тварин збільшені, мають плямисте або дифузне червоне забарвлення.

Статева система самок без видимих змін.

У самців спостерігається нерівномірне червоно-синє забарвлення сім'яників.

Кровоносні судини головного мозку кровонаповненні, оболонки мозку молочно-білого кольору.

У ході гістологічного дослідження серця встановлено розширення та переповнення кровоносних судин, набряк міжм'язової сполучної тканини, зернисту дистрофію міокардіоцитів. Набряк міжм'язової сполучної тканини міокарда в ділянці лівого шлуночка, порівняно з набряком правого шлуночка, більш виражений.

У легенях спостерігається вогнищева емфізема, в інших ділянках – потовщення альвеолярних перегородок за рахунок їх інфільтрації лімфоцитами, моноцитами. Частина моноцитів трансформується в макрофаги; в цитоплазмі останніх подекуди видно тільця хламідій. Епітелій альвеол у стані гідропічної дистрофії й частково зруйнований. У великих бронхах спостерігається гіперсекреція слизу, в дрібних бронхах – набряк міжчасточкової сполучної тканини. Судини кровонаповненні.

У переважній кількості випадків у фолікулах селезінки лімфатичні клітини розташовані розрі-

джено. В окремих тварин фолікули селезінки мають ознаки гіперплазії, а з-поміж клітин фолікулів зустрічаються окремі моноцити та макрофаги. Червона пульпа інфільтрована значною кількістю лімфоцитів, моноцитів. Тільця хламідій знаходяться як у клітинах, так і в міжклітинному просторі. Реєструється осередковий набряк червоної пульпи.

Просвіти кровоносних судин печінки розширені й переповнені кров'ю, в окремих ділянках у часточках навколо капілярів реєструються мікрокрововиливи, слабо виражена дифузна інфільтрація моноцитами та лімфоцитами. Гепатоцити в стані зернистої дистрофії. В окремих ділянках частина гепатоцитів з ознаками руйнування.

У процесі гістологічного дослідження шлунка встановлено, що зміни в кардіальній, фундальній і пілоричній його частинах були подібними. Епітелій слизової оболонки знаходиться в стані зернистої дистрофії, місцями зруйнований. Всі клітини епітелію шлункових ямочок знаходяться у стані зернистої й гідропічної дистрофії та руйнування, в цитоплазмі деяких епітеліальних клітин виявляються базофільні тільця хламідій. Підслизова основа дещо набрякла. М'язова оболонка дифузно набрякла, гладкі м'язові клітини перебувають у стані зернистої дистрофії, частково руйнуються. В цитоплазмі м'язових клітин реєструються округлі базофільні тільця хламідій. Просвіти кровоносних судин розширені, судини кровонаповненні.

В стінці тонкого відділу кишечника спостерігається зменшення кількості лімфоцитів у фолікулах, їх розріджене розташування. Верхня частина ворсинок зруйнована, в окремих випадках на окремих ділянках ворсинки зруйновані до крипт. Окрім того відбувається набряк ворсинок, субепітеліальний набряк та помірна інфільтрація ворсинок лімфоцитами. Кровоносні судини всіх шарів стінки кровонаповнені, реєструється набряк підслизової та м'язової основи.

У ободовій кишці спостерігається руйнування верхньої частини слизової оболонки, інфільтрація слизової оболонки лімфоцитами, окремими моноцитами та макрофагами. В цитоплазмі частини макрофагів – округлі базофільні тільця хламідій. Характерною є гіперплазія келихоподібних клітин, набряк підслизового шару, зерниста дистрофія клітин м'язового шару.

У сліпій кишці у багатьох тварин зареєстровано субепітеліальний набряк, набряк підслизової та м'язової основи, помірна інфільтрація слизової оболонки лімфоцитами. Кровоносні судини всіх шарів стінки кровонаповнені.

У прямій кишці спостерігається помірне розширення й переповнення кров'ю частини судин підслизової основи; лімфатичні фолікули містять незначну кількість лімфоцитів.

Для нирок характерною є зерниста дистрофія та руйнування епітелію каналців. Кровоносні судини строми розширені й переповненні кров'ю. Нерідко реєструють осередковий серозний гломерулонефрит, що супроводжується руйнуванням частини клубочків. У невеликій кількості виявлено тільця хламідій; під капсулою нирок – дрібні крововиливи.

У стінці сечового міхура виражений набряк власного шару слизової оболонки, міжм'язової сполучної тканини. Епітелій слизової оболонки має ознаки гідропічної дистрофії, місцями зруйнований. У слизовій оболонці спостерігаються поодинокі крововиливи.

У тканинах головного мозку реєструється базофілія нервових клітин, перецелюлярні та периваскулярні набряки. Кровоносні судини розширені, переповнені кров'ю.

**Висновки.** 1. За результатом проведених досліджень, можна зробити висновок, що у поро-

сят тижневого віку, хворих на хламідіоз, за рахунок інфільтрації лімфоцитами, моноцитами та макрофагами альвеолярних перегородок, на поверхні та в товщі легень спостерігається утворення ділянок потовщення рожево-білого кольору.

2. Потовщення міокарда та стінок сечового міхура, а також слизової оболонки шлунково-кишкового тракту відбувається внаслідок набряку.

3. Слабке заселення лімфоїдних фолікулів селезінки, лімфатичних вузлів та стінки травної трубки лімфоцитами можна пояснити як незакінченість процесу диференціації органу, або як пригнічення збудником хламідіозу формування клітин гемопоезу в органах кровотворення.

4. У цитоплазмі клітин багатьох органів і тканин виявляються базофільні округлі чи овальні тільця-включення хламідій, що вказує на політропність збудника хвороби.

5. Розлади гемодинаміки, набряк підшкірної клітковини, скупчення трансудату в природних порожнинах, описані вченими за період 80-90-х років минулого століття, в досліджених нами випадках загибелі поросят не були характерними.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Бортничук В.А.* Хламидиоз свиней. – К.: Урожай, 1991. – 192с.
2. *Гусев Б.Н.* Распространение хламидий в органах и иммунный ответ при пероральном заражении // *Ветеринария.* – 1985. - №8. – С.27-28.
3. *Добин М.А., Кокуричев П.И.* Практикум по ветеринарной патологической анатомии и вскры-

тию. – Ленинград: Колос, 1975. – 295с.

4. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645с.

5. *Хазипов Н.З., Равилов А.З.* Хламидиозы свиней // *В кн.: Хламидиозы сельскохозяйственных животных.* – М.: Колос, 1984. – С.130-151.

УДК 619.616.98:636.22/28  
© 2008

*Литвин В.П., доктор ветеринарних наук,  
Поліщук В.В., кандидат ветеринарних наук,  
Гомзиков О.М., асистент,*

Національний аграрний університет,

*Грицай М.Ф., заступник генерального директора,  
ВАТ «Лісохімік»*

## ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ХВОЙНОЇ ХЛОРОФІЛО-КАРОТИНОВОЇ ПАСТИ І ХВОЙНОЇ МАЗІ «ВІТА» У ВЕТЕРИНАРНІЙ ПРАКТИЦІ

### Постановка проблеми.

Не дивлячись на значний спад чисельності поголів'я тварин в Україні за останнє десятиріччя, незаразні, інфекційні та інвазійні хвороби молодняку й досі залишаються актуальною проблемою.

Передусім це гострі шлунково-кишкові та респіраторні хвороби телят, поросят, ягнят, птиці раннього віку, що потребує подальшого пошуку і впровадження у виробництво нових лікарських засобів.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми.** За результатами досліджень вчених і науковців України, ближнього і дальнього зарубіжжя, найбільш поширеними інфекційними хворобами шлунково-кишкового й респіраторного трактів (ГРШК, ГРЗ) молодняку сільськогосподарських тварин і птиці залишаються грип, парагрип-3, вірусна діарея, інфекційний ринотрахеїт, рота-, корона- та парвовірусні інфекції, хламідіози, мікоплазмози, ешеріхіози, сальмонельози, пастерельози, дипло- та стрептококози. Окремі з них зумовлюють також і спалахи харчових токсикоінфекцій у людей (1-2, 4-5, 12).

Зазначені хвороби поширені в більшості країн світу, характеризуються високою контагіозністю, смертністю і за величиною економічного збитку не мають собі рівних серед інфекційної патології тварин. Виникненню цих захворювань сприяють порушення годівлі, технології вирощування й утримання матерів і молодняку, стресові навантаження та інфекційна напруженість внаслідок накопичення патогенних мікроорганізмів (1, 3-5).

Ця проблема залишається актуальною і знаходиться в центрі уваги сучасного наукового пошуку нових біологічно-активних антимікробних препаратів та удосконалення методів їх застосування. В Україні вперше розроблено, апробовано

*Експериментально доведено, що аерозолі 0,5% розчину хвойної хлорофіло-каротинової пасту і хвойна мазь «Віта» проявляють антимікробні, фунгіцидні, сануючі та репаративні властивості, позитивно впливають на імунний та біохімічний статус телят, поросят і птиці.*

і запропоновано виробництву вітчизняні препарати: протекфлазид, восурель, флавосмолон, хвойна хлорофіло-каротинова паста та хвойна мазь «Віта». Актуальним залишається

подальше вивчення їх дії на показники природної резистентності та імунобіологічної реактивності організму тварин, у тому числі й молодняку при ГШК та ГРЗ (5-9).

**Мета досліджень та методики їх проведення.** Основна мета наших досліджень полягала в розробці способу профілактики і лікування ГШК та ГРЗ телят, поросят, птиці за допомогою ХХКП, а мазі «Віта» – при дерматомікозах, травмах і ранових процесах.

Важливим моментом у вивченні сануючих властивостей ХХКП слугувала монографія та наукові праці О.В. Семенова і Ч.Г. Хасанова (1983) «Групова профілактика інфекційних хвороб тварин». Санацію тваринницьких приміщень у присутності телят, поросят і птиці проводили аерозолями 0,5% розчину ХХКП із розрахунку 1 л на 300 м<sup>3</sup> повітря при експозиції 60 хв., тричі з інтервалом у 7 днів.

Науково-виробничі дослідження з вивчення лікувально-профілактичних властивостей зазначених препаратів проведено в неблагополучних із ГШК та ГРЗ господарствах Київської, Черкаської і Хмельницької областей.

Дослідні й контрольні групи телят формували за принципом аналогів у ПСП «Шевченківське», а свиней у ВАТ «Антонов-Агро» Київської області.

Аерозольну обробку дослідних тварин проводили за допомогою аерозольного розпилювача АР-10 0,5%-вим розчином ХХКП щоденно упродовж семи днів і повторно через тиждень із розрахунку 1 л на 300 м<sup>3</sup> повітря приміщення при експозиції 60 хв. Контрольні групи тварин аерозолями не обробляли.

Дослідження мікрофлори тваринницьких приміщень проводили методом осаду мікроорганізму повітря на чашки Петрі з використанням середовищ Ендо, Плоскірева – для ентеробактерій; МПА з вмістом 5 % крові – для коків, ентерококів та гемолітичних штамів бактерій; жовтково-сольвий агар Чистовика – для стафілококів; середовища Сабуро, сусло-агар – для грибів.

Імунологічний та біохімічний статус дослідних і контрольних груп телят вивчали за гематологічними показниками крові, визначення Т- і В-лімфоцитів, фагоцитарної активності лейкоцитів (ФАЛ), бактерицидної активності сироваток крові (БАСК), лізоцимної активності (ЛАСК), загального білку і білкових фракцій, вмісту гемоглобіну; поросят – за гематологічними показниками крові, фагоцитарної активності лейкоцитів (ФАЛ), бактерицидної активності сироваток крові (БАСК), лізоцимної активності, вмісту гемоглобіну.

**Результати досліджень.** Проведеними дослідженнями встановлено, що ХХКП (ТУ У 46.15.397.99), до складу якої входять вітаміни А, С, Е, ферменти, пробіотики, мікроелементи, пігменти, стеарини та інші біологічно-активні речовини, є важливим профілактичним, лікувальним і сануючим засобом. Найчутливішими до ХХКП і виготовленої на її основі мазі «Віта» були стафілококи, стрептококи, ешеріхії, сальмонели, протей, сінна паличка і більш стійкими – збудники бешихи, сибірки, коринібактерії.

Узагальнені результати досліджень наведено в таблиці 1. Вони свідчать про ефективність застосування ХХКП при дисбактеріозах та ешеріхіозах телят, поросят і птиці як активної біологічної речовини з вираженими протимікробними влас-

твостями. Використання в акушерській, хірургічній практиці та лікуванні дерматомікозів хвойної мазі «Віта» також підтвердили її високу ефективність.

Біохімічні дослідження сироваток крові дослідної птиці підтвердили, що під впливом ХХКП стабілізувалися показники каротину, загального білку, кальцію, вітамінів А і Є до рівня фізіологічної норми.

Результати досліджень дали можливість оптимізувати лікувальні і профілактичні дози ХХКП. Так, у разі виникнення гострих шлунково-кишкових захворювань заводську ХХКП необхідно розводити 1:1 перекип'яченою водою і задавати тваринам чи птиці з водою з розрахунку 0,02 г/кг маси тіла протягом 8-10 діб. При спалаху респіраторної хвороби тварин чи птахів обробляють упродовж 3-5 днів аерозолями ХХКП із розрахунку 1 л 0,5%-вого розчину пасту на 300 м<sup>3</sup> приміщення при експозиції 60 хв. У разі необхідності через 5-7 днів обробку повторюють. При цьому слід пам'ятати, що підготовлений для аерозольної обробки тварин 0,5% розчин ХХКП обов'язково пропускають через фільтри для відбору воскоподібних речовин.

Результати визначення імунного статусу поросят за аерозольної обробки хвойною хлорофіло-каротиновою пастою наведено в таблиці 2. До початку аерозольних обробок дослідних груп поросят показники фагоцитарної активності нейтрофілів, бактерицидна активність сироватки крові, кількісні показники гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів та загальний білок, у порівнянні з контрольною групою, були стабільними і не відрізнялися між собою.

**1. Лікувальна і профілактична ефективність застосування хвойної хлорофіло-каротинової пасту і мазі «Віта» на тваринах та птиці**

Перелік хвороб	Вид тварин	Кількість, гол.	Одержані результати			
			одужало, гол.	загинуло, гол.	відсоток збереження	тривалість лікування, профілактики, діб
Ешеріхіоз	Телята	102	97	5	95	8-10
Дисбактеріоз (диспепсія)	Поросята	41	38	3	92,5	7-8
Профілактика ешеріхіозу	Телята	309	306	3	99	45
Ешеріхіоз	Птиця	29630	29073	557	98,2	21
Профілактика ешеріхіозу	Птиця	29073	28851	222	99,2	18
Рани, тріщини сосків вим'я, запальні процеси кінцівок, абсцеси, флегмони і т. ін.	Корови	35	35	-	100	7-12
	Кози	4	4	-	100	5-6
	Собаки	5	5	-	100	4-5
	Кролики	50	50	-	100	4-5
Трихофітія	Телята	27	27	-	100	10-12

**2. Результати гематологічних та імунологічних досліджень крові поросят через 21 добу від початку аерозольних обробок ХХКП ( $M \pm m, n=10$ )**

Групи тварин	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, Т/л	Лейкоцити, Г/л	Загальний білок, г/л	ФАН, %	ФІ, м.к.	БАСК, %
Контрольна	98,8±2,82	5,23±0,09	15,55±0,15	52,7±0,70	82,20±4,77	7,56±0,72	15,70±2,02
Дослідна	108,8±2,8*	5,68±0,27	16,12±0,19*	55,9±1,22*	83,72±4,63	8,67±0,54	16,87±1,66

Примітка. \*  $p < 0,05$  – порівняно з контрольною групою

**3. Результати дослідження гематологічних показників дослідних телят, оброблених ХХКП ( $M \pm m, n = 10$ )**

Групи тварин	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, Т/л	Лейкоцити, Г/л	Лейкограма, %				
				Е	П	С	Л	М
До обробки								
Контрольна	107,0±1,1	5,32±0,03	6,89±0,20	2,9±0,24	2,1±0,21	33,7±0,41	48,7±0,25	12,6±0,3
Дослідна	106,6±0,33	5,31±0,04	7,15±0,04	1,7±0,25	3,1±0,21	33,9±0,24	48,6±0,83	12,7±0,41
Через 14 діб								
Контрольна	106,2±0,2	5,32±0,01	6,79±0,02	2,9±0,24	2,0±0,66	33,5±0,2	48,8±0,35	12,8±0,26
Дослідна	108,6±1,05	5,90±0,18**	7,41±0,01***	1,4±0,21***	3,0±0,81	32,5±0,33***	50,2±0,2***	12,9±0,41
Через 21 добу								
Контрольна	106,5±0,2	5,30±0,2	6,76±0,02	2,8±0,26	2,2±0,25	33,6±0,2	48,8±0,54	12,6±0,39
Дослідна	108,8±0,3***	6,10±0,04***	8,80±0,1***	1,2±0,25	2,9±0,4	32,4±0,96	50,3±0,2*	13,2±0,78

Примітка. \*\* $p < 0,01$  –; \*\*\* $p < 0,001$  – порівняно з контрольною групою

**4. Результати дослідження біохімічних показників крові дослідних телят, оброблених ХХКП ( $M \pm m, n = 10$ )**

Групи тварин	Загальний білок, г/л	Білкові фракції, %			
		альбуміни	глобуліни		
			α -	β -	γ -
До обробки					
Контрольна	65,6±1,1	43,6±0,43	18,4±0,47	15,0±0,6	23,0±0,62
Дослідна	65,0±2,1	43,5±0,47	18,5±1,47	15,0±0,9	23,0±1,52
Через 7 діб					
Контрольна	65,7±0,7	43,4±0,62	18,3±0,43	15,1±1,56	23,2±0,53
Дослідна	66,9±1,1	43,4±0,39	18,4±1,45	14,9±0,66	23,3±0,7
Через 14 діб					
Контрольна	64,8±0,42	43,5±0,62	18,3±0,43	15,0±0,4	23,2±0,4
Дослідна	68,3±1,03**	43,3±0,42	18,5±1,13	17,8±0,58***	23,4±0,69**
Через 21 день					
Контрольна	64,6±0,43	43,6±0,49	18,2±0,48	14,9±0,5	23,3±0,48
Дослідна	70,5±1,05***	43,6±0,21	18,3±0,67	14,6±1,04	23,5±0,4

Примітка:  $p < 0,01$  – \*\*;  $p < 0,001$  – \*\*\* порівняно з контрольною групою

Одержані результати досліджень із застосування аерозолі 0,5%-вих розчинів ХХКП на 21-шу добу свідчать про вірогідне зростання рівня гемоглобіну, кількості лейкоцитів і загального білка ( $p < 0,05$ ), порівняно з контрольною групою та по відношенню до початку дослідження. В дослідній групі спостерігалася виражена тенденція до зростання фагоцитарного індексу у порівнянні як із контрольною групою тварин, так і з початком дослідження. Відносно бактеріцидної активності сироватки

крові слід відмітити тенденцію до збільшення, в порівнянні з контрольною групою. Зміни інших показників були не вірогідні.

Результати визначення імунного статусу телят за аерозольної обробки хвойною хлорофіло-каротиновою пастою наведено в табл. 3-6. Як видно з даних табл. 3, через 21 день після аерозольних обробок 0,5%-вим розчином ХХКП у крові телят дослідної групи вірогідно ( $p < 0,001$ ) зріс вміст гемоглобіну на 2,3 г/л у відношенні до початку обробки.



**5. Результати дослідження імунологічних показників крові дослідних телят, оброблених ХХКП ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )**

Групи тварин	Лімфоцити, Г/л	Види лімфоцитів, %		
		T	B	To
До обробки				
Контрольна	3,40±0,33	39,4±0,20	17,5±0,9	43,1±0,9
Дослідна	3,14±0,52	39,3±0,35	17,2±0,82	43,5±0,62
Через 7 діб				
Контрольна	3,30±0,42	39,3±0,34	17,6±0,84	43,1±0,87
Дослідна	3,40±0,20	39,4±0,21	17,4±0,39	43,2±0,5
Через 14 діб				
Контрольна	3,30±0,34	39,3±0,42	16,9±0,57	39,0±1,02
Дослідна	3,41±0,28	39,8±0,63	18,0±0,62**	42,2±0,75***
Через 21 день				
Контрольна	3,30±0,48	39,3±0,58	17,2±0,67	43,5±1,06
Дослідна	3,40±0,31	39,3±0,63	19,0±0,91**	43,5±0,7

Примітка: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – порівняно з контрольною групою.

**6. Результати дослідження ФАЛ, БАСК, ЛАСК крові дослідних телят після аерозольних обробок ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )**

Групи тварин	ФАЛ, %	БАСК, %	ЛАСК, %
До обробки			
Контрольна	40,3±0,53	24,0±1,49	10,3±0,25
Дослідна	40,2±0,58	24,5±1,23	11,2±0,66
Через 7 діб			
Контрольна	40,2±0,34	24,1±0,31	10,2±0,47
Дослідна	40,8±0,53	24,6±0,45	11,4±0,24**
Через 14 діб			
Контрольна	40,8±0,5	24,8±0,26	10,3±0,53
Дослідна	40,9±0,51	24,8±0,34	12,9±0,41***
Через 21 день			
Контрольна	40,8±0,35	24,1±1,23	10,2±0,34
Дослідна	41,3±0,42	24,9±0,39	13,1±1,09

Примітка: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – порівняно з контрольною групою.

На фоні вірогідного збільшення загальної кількості лейкоцитів відносно контрольної групи, відбувся перерозподіл їх відсоткового співвідношення. Так, на 21-шу добу від початку досліду в крові телят дослідної групи, у порівнянні із початком досліду, було відмічено тенденцію до зменшення еозинофілів і паличкоядерних лейкоцитів.

У крові телят дослідної групи вірогідно ( $p < 0,05$ ) збільшилася кількість лімфоцитів на 1,7%. Разом із тим відмічалася тенденція до збільшення кількості моноцитів у дослідній групі. Такий вплив аерозолі 0,5%-вих розчинів ХХКП пояснюється насамперед тим, що до їх складу входять біологічні активні речовини, яким властиво стимулювати кровотворну функцію червоного кісткового мозку та інших кровотворних органів.

При біохімічному дослідженні крові дослідних телят (табл. 4) було встановлено наступну закономірність: у телят дослідної групи, порівняно з початком досліду, відмічено вірогідне ( $p < 0,001$ ) збільшення вмісту загального білку в сироватці крові на 5,5 г/л, у той же час у контрольній групі вміст останнього залишився без змін.

На фоні зміни загальної кількості білка було встановлено також перерозподіл у співвідношенні білкових фракцій. Відсотковий вміст альбумінів зберігав сталу величину протягом усього досліду з несуттєвим відхиленням (0,1-0,3 %) як у дослідній групі, так і в контрольній. Зміни відбулися на рівні фракцій глобулінів. Так, до початку досліду відсотковий вміст  $\alpha$ -глобулінів складав у середньому по 18,5±0,5% двох групах. На 21-шу добу від початку досліду вміст останнього в контрольній та дослідній групах суттєво не

змінився. Вміст  $\beta$ -глобулінів і  $\gamma$ -глобулінів, порівняно з контрольною групою, також суттєво не змінився.

Аналізуючи результати імунологічних досліджень крові дослідних телят (табл. 5), слід сказати, що через 21 добу загальна кількість лімфоцитів не змінилася по відношенню до початку дослідження та до контрольної групи тварин. Вміст Т-лімфоцитів у крові телят дослідної мав тенденцією до зменшення. Водночас було відмічено незначне збільшення В-лімфоцитів по відношенню як до початку дослідження, так і до контрольної групи тварин.

У результаті проведення аерозольних обробок телят (табл. 6), нами було встановлено тенденцію до збільшення фагоцитарної активності лейкоцитів у дослідній групі по відношенню до початку дослідження і до контрольної групи ( $p < 0,001$ ) тварин.

Спостерігалася тенденція до зростання бактеріцидної активності сироватки крові на 21-шу добу в телят дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи.

Лізоцимна активність сироваток крові характеризувалася тенденцією до зростання в дослідній групі, і вірогідне збільшення ( $p < 0,01$ ) по відношенню до початку дослідження. Такий результат пояснюється імуностимулюючою дією ХХКП.

Проведеними дослідженнями мікрофлори повітря свинарників і телятників до аерозольних

обробок ХХКП нами встановлено, що переважну кількість колоній мікроорганізмів становили: стафілококи – 25-30%, ентерококи – 20-25%, гриби *Asp. flavus* – 15-20%, ешеріхії – 10-15% та інша спорова мікрофлора. Після аерозольної обробки дослідних тварин ХХКП, кількість колоній означених мікроорганізмів зменшилася майже у 20 разів.

#### Висновки:

1. Експериментально доведено, що хвойна хлорофіло-каротинова паста і хвойна мазь "Віта" проявляють антимікробні, фунгіцидні, сануючі та репаративні властивості, позитивно впливаючи на імунний статус телят, поросят і птиці.

2. У разі виникнення гострих шлунково-кишкових захворювань заводську ХХКП розводять 1:1 перекип'яченою водою і випоюють хворим тваринам чи птиці з водою або задають з кормом із розрахунку 0,02 г/кг маси тіла упродовж 8-10 діб. У разі необхідності курс лікування продовжують до 20 діб.

У випадку спалаху респіраторної хвороби з підготовленого маточного розчину ХХКП (1:1) готують 0,5%-вий розчин, який пропускають через заводський фільтр і обробляють хворих тварин аерозолем із розрахунку 1 л розчину на 300 м<sup>3</sup> приміщення щоденно протягом 7-8 діб. Експозиція – 60 хв. У разі необхідності курс аерозольної обробки повторюють через 5-7 діб.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Андреев Е.В. Ассоциированное воздействие на организм вируса и условно-патогенных бактерий // Ветеринария. – 1984. – №7. – С.13-15.
2. Зароза В.Г. Колибактериоз новорожденных телят: Обзор информации. – М., 1995. – 56с.
3. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекция иммунных нарушений / Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г. и др. – К., 1995. – 210с.
4. Левченко В.І., Заярнюк В.П., Панченко І.В. та ін. Шлунково-кишкові хвороби новонароджених телят. // Ветеринарна медицина України. – 1997. – №4. – С.30-33.
5. Литвин В.П. Ефективні біологічні препарати при дисбактеріозі та ешеріхіозі у тварин і птиці // Науковий вісник НАУ. – К., 2000. – №28. – С.129-133.
6. Литвин В.П. Наукове забезпечення сталого розвитку сільського господарства в Поліссі України. – К., 2004. – Т.2. – С.579-588.
7. Лікарські рослини /Енциклопедичний довідник/ Під ред. Гродзінського А.М. – К., 1999. – 545с.
8. Настанова по застосуванню хлорофілокаротинової пасту і хвойної мазі «Віта» у ветеринарній медицині. К.: ДДВМ, – 1999. – 5с.
9. Нові активні біологічні препарати у ветеринарній медицині. // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. / Литвин В.П., Поліщук В.В., Постой В.П., Литвиненко В.М. – Одеса, ОДАУ. – 2004. – Ч.1. – С.68-75.
10. Попов В.И., Шапиро Д.К., Данусевич И.К. Лекарственные растения. – Минск: Полымя, 1999. – 303с.
11. Селиванов А.В., Хасанов Ч.Г. Групповая профилактика инфекционных болезней животных. М.: Колос, 1983. – 302с.
12. Урбан В.П. Классификация болезней новорожденных телят // Ветеринария. М. – 1978. – №1 – С.55-57.

УДК 619:616.98.99:636.22/28  
© 2008

*Литвин В.П., доктор ветеринарних наук,  
Поліщук В.В., кандидат ветеринарних наук,  
Національний аграрний університет*

## ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВІТЧИЗНЯНИХ ПРОБІОТИКІВ ПРИ КИШКОВИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ МОЛОДНЯКУ ТВАРИН

### Постановка проблеми.

За визначенням академіків В.П. Урбана та В.І. Шевченка, гострі шлунково-кишкові хвороби новонароджених характеризуються порушенням секреторної, моторної, всмоктувальної, екскреторної функцій травного каналу, розладом обміну речовин, зневодненням, дисбактеріозом та інтоксикацією організму. Це комплексні захворювання, пов'язані передусім із неповноцінною годівлею маточного поголів'я, порушенням обміну речовин у вагітних маток та в організмі новонароджених. Найчастіше хворіють телята, ягнята і поросята наприкінці зими – на початку весни (2, 5, 7, 9-10).

### Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.

Наші спостереження і дослідження свідчать, що аліментарна, автоімунна і токсична диспепсія переростають у дисбактеріоз, який призводить до зміни співвідношення між окремими групами мікроорганізмів: замість корисних молочнокислих, грампозитивних бактерій (лактобактерії, ацидофільні, біфідобактерії, ентерококи, ешеріхії та ін.) збільшується кількість гнільних, грамнегативних ешеріхій, вульгарного протею, анаеробів, синьогнійної палички, дріжджоподібних та інших представників патогенної мікрофлори. У разі дисбактеріозу зменшується насамперед кількість лактобактерій, біфідобактерій та анаеробних спороутворюючих бактерій, для яких характерна висока антагоністична активність щодо патогенної й гнільної мікрофлори, здатність створювати у кишечнику кисле середовище, нагромаджувати ферменти, синтезувати амінокислоти, вітаміни та інші корисні для макроорганізму біологічно активні речовини. Місце локалізації корисної мікрофлори в тонкому і товстому кишечнику заселяють грамнегативні та гнільні мікроорганізми, які вступають у нові незвичайні асоціації, особливо з рота-, корона- і парвовірусами та найпростішими – криптоспори-

*Запропоновані виробництву нові вітчизняні пробіотики – споролакт, моноспорин-ПК, біфідубактерин ветеринарний – є більш активними щодо умовно-патогенної і патогенної мікрофлори травного каналу, порівняно з відомими аналогами. Лікувально-профілактична ефективність споролакту у разі гострих шлунково-кишкових захворювань телят раннього віку сягає 98-100%.*

діями (1, 3-5, 7-8, 11).

Таким чином, на основі токсичної форми диспепсії та інших незаразних захворювань можуть виникати специфічні інфекційні хвороби: ешеріхіоз (колібактеріоз), сальмонельоз, анаеробна ентерото-

ксемія, стрептококоз, кандидамікоз, рота-, корона- і парвовірусні інфекції з ознаками діареї. Зазначені інфекційні хвороби характеризуються певною стаціонарністю, перебігають у формі ензоотії, коли збудник, як правило, не занесено з інших господарств. Пасажуючись через організм сприйнятливих тварин, патогенні мікроорганізми посилюють свою вірулентність і, виділяючись із секретами та екскретами в довкілля, викликають захворювання у цілком здорового молодняку (3-8).

**Мета досліджень та методики їх проведення.** Основна мета наших досліджень полягала у визначенні ефективності нових пробіотиків – споролакту, моноспорину-ПК і біфідубактерину – відносно умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, у порівнянні з відомими бактеріоном-SL, лактобактеріоном та біоспорином. Досліди проведено на сільськогосподарських і домашніх тваринах раннього віку та птиці. Використано загальноприйнятні в мікробіології і епізоотології методи дослідження й поживні середовища (МПА, МПБ, Ендо, Плоскірева, МРС, тіогліколеве, Сабуро, Громико, жовтково-сольовий агар та ін.). Обчислення здійснювали за традиційними методами.

Кількість мікроорганізмів у 1 мл вихідного матеріалу (С) розраховували за формулою:  $C=N/VK$ , де N – середня кількість колоній в одній бактеріологічній чашці; V – об'єм суспензії, який наносять під час висівання на поверхню агару; K – кратність розведення. Отримані дані оброблено статистично.

**Результати досліджень.** Традиційні методи лікування хворих тварин із застосуванням анти-

біотиків, сульфаніламідних та фунгіцидних препаратів призводять до зменшення в кишечнику не лише патогенних ентеробактерій, а й представників нормофлори, особливо молочнокислих і біфідобактерій (7-8, 11). Враховуючи зазначене і виходячи з етіопатогенетичної спрямованості терапії у разі інфекційних захворювань, нами разом із науковими співробітниками Інституту вірусології і мікробіології НАН України (С.Р. Рєзнік, І.Б. Сорокулова, В.О. В'юницька, В.В. Смірнов, 1992) розроблено і впроваджено у виробництво новий профілактичний і лікувальний препарат **споролакт** (ТУ У 46.15.057-94), до складу якого ввійшли в рівних об'ємах нормальні аеробні спороутворюючі бактерії *Bac. subtilis*, *Bac. licheniformis* і лактобактерії – *Lactobacillus fermentum* (Роспатент № 2035186).

Створення подібного комплексного препарату дало можливість інтенсифікувати продукування антибіотичних речовин, протеолітичних ферментів, лізоциму тощо.

Бактеріологічним дослідженням кишкового вмісту встановлено, що кількість життєздатних бацил після введення споролакту в дозі 1-10 млрд мікробних клітин в 1 г вмісту становить  $10^6$ - $10^7$  КУО.

Споролакт є високоефективним засобом профілактики і лікування гострих кишкових інфекцій та дисбактеріозів різної етіології. Найбільш виражений клінічний ефект препарат виявляє в ранні строки лікування (3-7 днів). Характерно, що за протимікробною активністю до музейних і польових штамів тест-культур споролакт перевершує бактерин-SL, біоспорин і лактобактерин (табл. 1).

Такий же позитивний вплив мав пробіотик і на умовно патогенну мікрофлору кишечника тварин з експериментальним дисбактеріозом (табл. 2) під час терапії хворих телят.

Завдяки п'ятирічному науковому пошуку разом із доцентом Ужгородського державного університету Н.В. Бойко створено новий пробіотик із ширшим спектром протимікробної дії – моноспорин-ПК (ТУ У 46.15.275-97). Основою препарату є культура *Bac. subtilis* ВКПМ № В-5225, що має специфічну протиклебсієльозну активність, виявляє бактеріостатичну, бактерицидну, антитоксичну і фунгіцидну дію на низку патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів та їх токсинів, стимулює фагоцитарну активність моноцитів і нейтрофілів, індукує продукцію ендогенного інтерферону.

**1. Порівняльна характеристика протимікробної активності пробіотиків до музейних і польових штамів тест-культур**

Тест-мікроорганізми	Зони пригнічення росту тест-культур, мм			
	біоспорином	бактерином-SL	споролактом	лактобактерином
	<i>Музейні штами</i>			
<i>Salmonella thyphimurium</i>	15	19	22	5
<i>S. newport 5751</i>	12	18	20	2
<i>S. derby 1519</i>	12	20	22	0
<i>S. equiabortus</i>	10	14	16	0
<i>S. greis 1190</i>	12	20	23	4
<i>S. reading 5720</i>	12	28	32	15
<i>S. stenley 5266</i>	17	22	26	6
<i>Shigella sounei</i>	16	20	22	4
<i>Pr. vulgaris 72</i>	18	30	35	-
<i>Pr. vulgaris 181</i>	16	21	27	-
<i>Kl. pneumoniae 5055</i>	10	10	10	-
<i>E. coli 111</i>	12	18	29	12
<i>E. coli 064</i>	11	17	23	11
<i>Staph. aureus 209</i>	17	22	25	-
<i>Cand. albicans</i>	25	25	35	-
	<i>Польові штами</i>			
<i>Klebsiella sp. (Т-2)</i>	17	16	21	-
<i>Cand. albicans (Л.)</i>	14	12	22	-
<i>Staph. aureus (В.Н.)</i>	13	15	28	-
<i>E. coli (Л.)</i>	9	15	22	-

Примітка: «-» облік не проводили.

**2. Коригуючий вплив споролакту, бактерину-SL та лактобактерину на мікрофлору кишечника з експериментальним дисбактеріозом**

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів (КУО/г)					
	до лікування споролактом	через 5 діб після 10-денного курсу лікування споролактом	до лікування бактерином-SL	через 5 діб після 10-денного курсу лікування бактерином-SL	до лікування лактобактерином	через 5 діб після 10-денного курсу лікування лактобактерином
Біфідобактерії	відсутні	10 <sup>8</sup>	відсутні	10 <sup>7</sup>	відсутні	10 <sup>8</sup>
Лактобактерії	відсутні	(2,7-5,4)х10 <sup>7</sup>	відсутні	(3,1-4,1)х10 <sup>6</sup>	відсутні	(5,4-7,2)х10 <sup>7</sup>
Ентерококи	(3,1-3,7)х10 <sup>7</sup>	(2,4-7,7)х10 <sup>6</sup>	(2,6-5,2)х10 <sup>7</sup>	(4,4-5,4)х10 <sup>6</sup>	(5,2-8,1)х10 <sup>7</sup>	(3,1-3,8)х10 <sup>7</sup>
Лактозопозитивні БГКП	(4,2-5,3) х10 <sup>6</sup>	(3,2-6,6)х10 <sup>6</sup>	(2,1-6,2)х10 <sup>6</sup>	(3,7-4,2)х10 <sup>6</sup>	(2,4-5,3)х10 <sup>7</sup>	(2,8-5,2)х10 <sup>7</sup>
Лактозонегативні БГКП	(3,1-6,4)х10 <sup>6</sup>	(2,8-5,4)х10 <sup>4</sup>	(2,4-3,8)х10 <sup>6</sup>	(2,2-4,4)х10 <sup>4</sup>	(3,4-4,2)х10 <sup>6</sup>	(2,2-4,9)х10 <sup>5</sup>
Бактерії роду <i>Proteus</i>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
Стафілококи	(2,6-5,1)х10 <sup>6</sup>	(3,4-4,1)х10 <sup>4</sup>	(2,8-5,2)х10 <sup>6</sup>	(3,6-4,1)х10 <sup>5</sup>	(3,4-7,1)х10 <sup>6</sup>	(2,2-2,6)х10 <sup>5</sup>
Аеробні спороутворюючі бактерії	відсутні	(2,2-3,6)х10 <sup>7</sup>	відсутні	(3,6-7,2)х10 <sup>7</sup>	відсутні	(1,4-3,3)х10 <sup>4</sup>
Дріжджоподібні гриби	(3,4-7,1)х10 <sup>5</sup>	(1,4-2,8)х10 <sup>4</sup>	(2,6-5,1)х10 <sup>5</sup>	(3,8-6,9)х10 <sup>4</sup>	(2,6-5,4)х10 <sup>5</sup>	(4,1-4,8)х10 <sup>5</sup>

**3. Результати застосування споролакту при дисбактеріозах та ешеріхіозі телят**

Господарство	Всього тварин	Із них		
		одужало	загинуло	одужало, %
<i>Лікування</i>				
Радгосп «Вороньківський», Київська обл.	37	36	1	97,3
Головний селекційний центр України, Київська обл.	4	4	—	100
КСП «Перемога», Хмельницька обл.	38	37	1	97,4
ДПЗ «Плосківський», Київська обл.	12	12	—	100
Всього	91	89	2	97,8
<i>Профілактика</i>				
Радгосп «Вороньківський», Київська обл.	43	43	—	100
Головний селекційний центр України, Київська обл.	5	5	—	100
ДПЗ «Плосківський», Київської обл.	17	17	—	100
Всього	65	65	—	100

Державним Департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України затверджено Тимчасову настанову з його застосування у виробництві для профілактики і терапії гострих шлунково-кишкових захворювань молодняку сільськогосподарських тварин і птиці. Нами визначено профілактичні дози моноспорину-ПК: телятам і лошатам вперше випоюють 1-2 дози (10-20 млрд. мікр. кл.); поросят, ягнятам, хут-

ровим звірам – 0,5-1 дозу (5-10). Повторно препарат випоюють через 24 і 48 годин.

Під час лікування хворих тварин пробіотик задають двічі на добу з інтервалом 10-12 год. протягом 7-12 днів із розрахунку: телятам і лошатам – 6 доз (60 млрд. мікр. кл.); поросят, ягнятам, хутровим звірам – 3 дози (30 млрд. мікр. кл.).

**4. Профілактичні та лікувальні дози біфідумбактерину ветеринарного для тварин**

Тварини	Вік, діб	Профілактичні дози	Тривалість застосування, діб	Лікувальні дози	Тривалість застосування, діб	Ефективність, %
	1-10	15	3-5	15	7-12	98
Телята	11-30	30	3-5	30	7-14	100
	1-10	5	3-5	5	7-12	95
Поросята	11-35	10	3-5	1С	7-12	96
Ягнята	1-10	10	3-5	10	7-12	96
Собаки	61 і більше	10	3-5	15	7-12	100

У співпраці з доцентом О.В. Григор'євим нами апробовано пробіотик **біфідумбактерин ветеринарний**, до складу якого ввійшли високоактивні біфідобактерії-антагоністи зі штамів 1 або 791 та наповнювачі – каолін, лактоза і активоване вугілля. Одна доза означеного препарату містить  $10^7$  мікробних клітин біфідобактерій.

Застосовують пробіотик для профілактики і лікування дисбактеріозу різної етіології, у разі гострих кишкових інфекцій та запальних процесів геніталій у домашніх та сільськогосподарських тварин різних видів.

При пероральному застосуванні препарату біфідобактерії протягом 3-5 днів забезпечують швидкий ефект колонізації слизової оболонки кишечника тварин сприяють розмноженню корисних лактобактерій, ешеріхій, стрептококів, що швидко відновлює природний мікробіоценоз у травному каналі.

Нами відпрацьовано профілактичні й лікувальні дози біфідумбактерину ветеринарного (табл. 4).

Науково-виробничі дослідження на телятах і поросятах засвідчили, що високий рівень біфідобактерій у складі нормофлори запобігає розвитку дисбактеріозу, сприяє нормальному мікробіоценозу кишечника, нормалізує функцію травлення, підвищує неспецифічну резистентність організму тварин.

Для профілактики і лікування кишкових інфекцій пробіотик застосовують перорально у суміші з кормом або водою за 20-30 хв. до годівлі. Новонародженим телятам по 15 доз біфідумбактерину в 100 мл води (з 10-денного віку – по 30 доз у 200 мл води) випоюють двічі на добу, з профі-

лактичною метою – протягом 3-5 днів, з лікувальною – до зникнення ознак діареї (7-12 днів). Тваринам інших видів пробіотик рекомендовано в дозах, наведених у табл. 4.

Під час гострих інфекційних захворювань тварин лікують комплексно з використанням пробіотиків, не застосовуючи перорального введення антибактеріальних препаратів.

**Висновки**

Нові пробіотики – споролакт, моноспорин-ПК, біфідумбактерин ветеринарний, – порівняно з відомими пробіотиками бактерином-SL, лактобактерином та біоспорином є більш активними щодо умовно-патогенних і патогенних тест-мікроорганізмів. Серед них найчутливішими до споролакту були ешеріхії, протей, окремі види сальмонел та гриби роду *Candida*.

Лікувально-профілактична ефективність споролакту в разі гострих шлунково-кишкових захворювань телят досягає 98%.

Запропоновані при гострих кишкових інфекціях новонароджених нові пробіотики (споролакт, моноспорин-ПК, біфідумбактерин ветеринарний) протягом 3-5 днів забезпечують швидку колонізацію слизової кишечника травного каналу корисними лактобактеріями, ешеріхіями, стрептококами та іншими мікроорганізмами, що дає змогу відновити природний мікробіоценоз.

Пробіотики споролакт, моноспорин-ПК, біфідумбактерин ветеринарний схвалено державним Департаментом ветеринарної медицини Міністерства АПК України та Департаментом ветеринарії Мінсільгосппроду Росії і рекомендовано для впровадження у ветеринарну практику.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Андреев Е.В. Ассоциированное воздействие на организм вируса и условно-патогенных бактерий // Ветеринария. – 1984. – № 7. – С. 25-27.  
2. Біохімічні методи дослідження крові тварин // Метод. реком. для лікарів хіміко-токсиколо-

гічних відділів держ. лабораторій вет. медицини України, слухачів факультетів підвищення кваліфікації та студентів / В.І. Левченко, Ю.М. Новажицька, В.В. Сахнюк і ін. – К., 2004. – 104 с.  
3. Болезни молодняка сельскохозяйственных

- животных: Справочник / В.П. Литвин, В.И.Береза, В.Г. Скибицкий и др. – К.: Урожай, 1992. – 168 с.
4. *Головко А.М.* Засоби діагностики та специфічної профілактики колибактеріозу телят на основі факторів патогенності збудника / Автореф. дис. ... докт. вет. наук. – Харків, 1996. – 33 с.
5. *Зароза В.Г.* Колибактериоз новорожденных телят: Обзор информ. – М., 1995. – 56 с.
6. *Карпуть И.М.* Иммунология и иммунопатология болезней молодняка. — Минск: Ураджай, 1993.– 288 с.
7. *Литвин В.П.* Життєдайна дія пробіотиків // Ветеринарна медицина України. – 1996. – №2.– С. 12-14.
8. *Литвин В.П., Поліщук В.В., Постой В.П. та ін.* Нові активні біологічні препарати у ветеринарній медицині / Матер. міжнар. наук.-практ. конф. – Одеса, ОДАУ. – 2004. – Ч.І. – С.68-75.
9. *Урбан В.П.* Классификация болезней новорожденных телят // Ветеринария. – 1978. – № 1. – С. 55-57.
10. Шлунково-кишкові хвороби новонароджених телят / В.І. Левченко, В.П. Заярнюк, І.В. Панченко та ін. // Ветеринарна медицина України. – 1997. – № 4. – С. 30-33.
11. *Stiven M.F.* Probiotica intestinal inoculants for production animals // Veterinary med. – 8. – 1991. – P. 806-824.

УДК 619:617.55  
© 2008

*Передера Р.В., кандидат ветеринарних наук,  
Полтавська державна аграрна академія*

## ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ АМНІОТИЧНОЇ РІДИНИ НА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ КРОВІ В ПОСТОПЕРАЦІЙНИЙ ПЕРІОД

### Постановка проблеми.

Біогенні стимулятори (гр. bios “життя” + gennaō “створювати, робити”) –

це біологічно активні речовини, що мають властивість стимулювати низку життєво важливих функцій організму. Механізм дії, на думку В.П. Філатова, це вплив на ферментні системи організму, що призводить до зміни обмінних і енергетичних процесів та вплив їх на метаболізм і регенерацію.

Достовірно відомо, що парентеральне введення тканинних препаратів стимулює функції тваринного організму. Під їх впливом нормалізуються коркові процеси збудження і гальмування; покращується трофічна функція нервової системи; підвищується функція тиреоїдної залози і наднирників; збільшується утворення АКТГ, стимулюється виділення кортикостероїдів; поліпшується секреторна і моторна функції шлунково-кишкового тракту та безліч інших показників (1-4).

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв’язання проблеми.** При введенні в організм дія більшості препаратів неспецифічна. Їх використовують для стимуляції обмінних і регенераційних процесів, а також із метою підвищення резистентності організму. В хірургічній практиці біостимулятори найбільш широко застосовують в офтальмології (блефарити, помутніння склоподібного тіла, кон’юнктивіти, кератити), в ортопедії (ревматоїдні арт-

*Використання біопрепарату із амніотичної рідини прискорює загоєння післяопераційних ран та сприяє відновленню біохімічних показників крові.*

рити, артози, для прискорення консолідації кісткових переломів), а також при лікуванні гнійних ран,

трофічних виразок, опіків (екстракти і таблетки алое, фібс, суспензія й екстракт плаценти) (3-4).

Основним недоліком препаратів тваринного походження є значна кількість у них білкових сполук, що, в свою чергу, може викликати алергічну реакцію на чужорідний білок і (як наслідок) побічні ефекти.

**Метою роботи** був пошук нових ефективних біологічних препаратів та вивчення їх впливу на репаративні процеси в післяопераційний період.

**Матеріал і методи досліджень.** Роботу проводили в умовах клініки, стаціонару і лабораторії кафедри хірургії та акушерства Полтавської державної аграрної академії, в біохімічній лабораторії четвертої міської клінічної лікарні. Біохімічні показники амніотичної рідини та сироватки крові визначали з допомогою аналізатора Super-Z.

**Результати досліджень.** Останнім часом широкого розповсюдження як у гуманній, так і в ветеринарній медицині, набули препарати плаценти. В зв’язку з тим, що обмежене їх використання пов’язане зі складною очисткою від білку, ми вирішили використати амніотичну рідину, яка, за результатами наших досліджень, містить мінімальну кількість загального білку й цілу низку біохімічних сполук і мінеральних елементів (табл. 1).

### 1. Біохімічний склад амніотичної рідини собак, n = 3

Показники	Кількість	Показники	Кількість
Заг. білок, г/л	0,1±0,03	ГГТП, од./л	2,3±0,2
Альбумін, г/л	0,4±0,08	Амілаза, од./л	28,8±1,6
Білірубін заг., мкмоль/л	0	АЛТ, од./л	0
Глюкоза, мкмоль/л	3,6±0,3	АСТ, од./л	9,1±0,07
Холестерин, мкмоль/л	1,3±0,04	ЛДГ, од./л	59,6±3,5
Тригліцериди, мкмоль/л	0,2±0,02	Лужна фосфатаза, од./мл	5,4±0,3
Креатинін, мкмоль/л	70,8±3,1	Кальцій, мкмоль/л	2,03±0,14
Сечовина, мкмоль/л	4,5±0,26	Фосфор, мкмоль/л	1,25±0,09



У подальшому із амніотичної рідини виготовляли біопрепарат. Для цього після її відбору проводили послідовне центрифугування, охолодження та автоклавування. Відбір проб амніотичної рідини проводили після оваріогістероектомії собак у другому триместрі вагітності.

Виготовлений біопрепарат вводили підшкірно через 24 год по закінченню оперативного втручання на собаках (оваріогістероектомія) у дозі 0,5 мл на 10 кг. Контролем слугувала група тварин із подібною операцією, яким препарат не вводили.

У собак, яким застосовували імуностимулятор, через 36 годин після операції краї розрізу були сухими, не досить болючими, з частково вираженим набряком та дещо підвищеною місцевою температурою. На другу-третю добу набряк був мінімальним, інших ознак запалення не реєстрували. Загоєння рани відмічали вже на п'яту-шосту добу. Тваринам, яким не застосовували амніотичну рідину, клінічні ознаки запалення післяопераційної рани істотно зменшувалися

лише на четверту-шосту добу, а повне загоєння рани спостерігали на сьому-дев'яту добу.

Отже, результати наших досліджень показали, що підшкірне введення амніотичної рідини прискорювало клінічний перебіг загоєння ран у середньому на 32 години.

У ході дослідження біохімічних показників сироватки крові встановлено, що на другу добу після оперативного втручання у собак обох груп відмічали збільшення кількості загального білку на 13% ( $p>0,001$ ), АЛТ – на 53% ( $p>0,01$ ), лужної фосфатази – на 28% ( $p>0,001$ ), кальцію – на 9% ( $p>0,05$ ). Майже у 3,5 рази підвищилася концентрація ЛДГ, АСТ, загального білірубину ( $p>0,001$ ). При цьому спостерігали зниження вмісту глюкози на 35% ( $p>0,001$ ) та на 5% ( $p>0,001$ ) креатиніну. ГГТП та неорганічний фосфор був менший у 2,9 ( $p>0,001$ ) та у 2,2 рази ( $p>0,001$ ) відповідно. Без змін залишилася кількість альбуміну, сечовини, холестерину, тригліцеридів та хлоридів (табл. 2).

**2. Зміни біохімічних показників крові собак у постопераційний період при використанні біопрепарату з амніотичної рідини**

Показники	До оперативного втручання, n=7	Через 24 год, n=7	Через 5 діб після операції	
			дослід, n=3	контроль, n=4
Заг. білок, г/л	64,2±1,4	77,5±2,8*	60,3±3,1	68,7±2,3
Альбумін, г/л	23,5±1,2	22,3±0,9	18,7±1,8°	21,3±1,5
АЛТ, од./л	11,4±3,1	24,4±2,9*	18,2±2,3	25,1±2,7*
АСТ, од./л	13,2±3,2	48,4±6,4*	21,5±2,0°	36,3±4,4*
ЛДГ, од./л	427,7±12,7	1455,1±18,4*	1253,6±13,5*	1348,8±15,9*
ГГТП, од./л	19,6±1,2	6,8±1,4*	5,0±0,9*	8,2±0,95*
Лужна фосфатаза, од./мл	75,3±4,33	104,2±5,01*	55,6±3,97*	93,4±4,7°
Амілаза, од./л	2050,6±14,31	1980,9±16,1*	2130,8±8,56*	2010,1±13,4
Креатинін, мкмоль/л	61,0±0,15	58,1±0,25*	51,6±0,19*	55,6±0,23*
Сечовина, мкмоль/л	6,3±0,11	6,9±0,28	3,8±0,38*	6,8±0,10*
Глюкоза, мкмоль/л	5,4±0,19	3,5±0,23*	1,9±0,42*	2,1±0,39*
Білірубін заг., мкмоль/л	4,2±0,15	14,6±1,13*	12,8±1,09*	14,1±1,16*
Прямий, мкмоль/л	2,1±0,08	4,4±0,52*	4,2±0,56*	3,3±0,48*
Непрямий, мкмоль/л	2,1±0,07	10,2±0,61*	8,6±0,53*	11,9±0,68*
Тригліцериди, мкмоль/л	1,0±0,05	0,9±0,07	0,8±0,13	1,1±0,08
Холестерин, мкмоль/л	5,5±0,12	5,7±0,15	4,7±0,21	5,6±0,18
Сечова кислота, мкмоль/л	16,4±2,14	84,9±5,3*	53,1±4,9*	68,4±4,6*
Хлориди, мкмоль/л	95,1±3,11	103,7±2,37	99,5±1,98	102,4±2,06
Фосфор, мкмоль/л	0,96±0,04	0,44±0,06*	1,12±0,1	1,09±0,14
Кальцій, мкмоль/л	2,14±0,05	2,34±0,07°	1,86±0,11°	1,95±0,09

° –  $p>0,05$ ; \* –  $p>0,01$ , \* –  $p>0,001$  (по відношенню до оперативного втручання клінічно здорових тварин)

Із даних таблиці 2 видно, що на п'яту добу у тварин дослідної групи, яким додатково вводили препарат із амніотичної рідини, спостерігали нормалізацію вмісту загального білку, лужної фосфатази, АЛТ, неорганічного фосфору. Високими залишалися ЛДГ (у 2,9 разу;  $p > 0,001$ ), загальний білірубін (утричі;  $p > 0,001$ ), АСТ (на 39%;  $p > 0,05$ ), порівняно з тваринами до оперативних втручань. При цьому кількість глюкози була нижчою у 2,8 разу ( $p > 0,001$ ), а концентрація альбуміну, сечовини та кальцію була меншою, відповідно, на 20% ( $p > 0,05$ ), 40% ( $p > 0,001$ ) та 17% ( $p > 0,05$ ).

У тварин контрольної групи на п'яту добу післяопераційного періоду реєстрували повернення до норми загального білку, кальцію та неорганічного фосфору. Кількість лужної фосфатази, АЛТ, АСТ, ЛДГ, загального білірубину залишалася досить високою, порівняно з тваринами до

оперативного втручання, хоча й мали тенденцію до зменшення. Нижче норми був вміст глюкози (у 2,3 разу;  $p > 0,001$ ). Без змін залишилася концентрація альбуміну та сечовини.

Кількість холестерину, тригліцеридів і хлоридів у обох групах упродовж проведених досліджень залишалася незмінною.

#### **Висновки:**

1. Оваріогістероектомія собак характеризується різким збільшенням загального білку, АЛТ, АСТ, ЛДГ, лужної фосфатази, загального білірубину, кальцію, а також зменшенням ГГТП, глюкози та неорганічного фосфору.

2. Використання біопрепарату з амніотичної рідини в післяопераційний період зменшує місцевий загальний процес, прискорюючи загоєння ран та сприяючи швидшому відновленню показників крові.

#### **БІБЛІОГРАФІЯ**

1. *Калашиник І.С.* Біологічні стимулятори у ветеринарії і тваринництві. – К.: Урожай, 1974. – 246 с.  
2. *Сотникова Е.П.* Экспериментальное обоснование применения препаратов по В.П. Филатову при заболеваниях зрительно-нервного аппарата глаза // Тез. доп. IX з'їзду офтальмологів України.

– Одеса, – 1996. – С.429-430.

3. *Herndon D.N., Hayward P.G., Rutan R.L., Barrow R.E.* Growth hormones and factors in surgical patients // *Adv Surg.* – 1992. – V.25. – 65-97.

4. *Peschel C., Huber C., Aulitzky W.E.* Clinical applications of cytokines // *Presse Med.* – 1994. – V.18;23 (23). – P.1083-1091.

УДК 619:612.017:579.62:636.2

© 2008

*Киричко О.Б., кандидат ветеринарних наук,*

Полтавська державна аграрна академія

## ВПЛИВ РОЗЧИНУ ПОЛТАВСЬКОГО БІШОФІТУ НА ДИНАМІКУ КОМПЛЕМЕНТАРНОЇ АКТИВНОСТІ СИРОВАТКИ КРОВІ КОРІВ

### Постановка проблеми.

Сільське господарство, зокрема тваринництво та ветеринарна медицина, мають значну потребу в природних екологічно чистих засобах. Одним із них є полтавський бішофіт. Він уже знайшов своє

використання у різних галузях гуманної та ветеринарної медицини, але його вплив на організм залишається недостатньо вивченим.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Розчин полтавського бішофіту є джерелом мінеральних речовин. У ньому нараховують понад 30 макро- та мікроелементів. Переважну частину з них складає магній (1).

Відомо, що з метою підвищення рівня неспецифічних факторів захисту частіше всього застосовують макро- та мікроелементи, які вводять до раціону годівлі (2-3).

Численні дослідження показують, що фактори неспецифічного захисту організму реагують першими, і зниження їх рівня може призвести до захворювання і загибелі тварин. До числа неспецифічних гуморальних факторів відносяться комплемент, пропердин, лізоцим, лейкоцити, β-лізини, що складають бактерицидну активність сироватки крові, а також противовірусні інгібітори, інтерферон та інші (4-5).

Одним із найважливіших неспецифічних факторів гуморального імунітету є комплемент. Комплемент бере участь у феноменах імунного гемолізу, бактеріолізу, імунного прилипання, опсонно-фагоцитарній реакції та реакції конглютинації й інших неспецифічних захисних реакціях. Основна функція комплементу – лізуюча (руйнівна по відношенню до антигену, зв'язаного антитілами) (4-6).

На динаміку комплементарної активності сироватки крові найбільший вплив мають іони магнію. Вони входять до складу системи пропердину і тому збільшують активність комплементу майже на 80%, а також проявляють антагоністичну дію по відношенню до бактеріальних токсинів (6).

*Наведені результати досліджень динаміки комплементарної активності сироватки крові здорових та хворих на субклінічний мастит корів при зовнішньому застосуванні розчину полтавського бішофіту з різними інтервалами. Спостерігається підвищення її рівня. Найбільш ефективним було застосування розчину полтавського бішофіту з інтервалами 12 та 24 години.*

**Метою** нашого дослідження стало вивчення впливу розчину полтавського бішофіту на динаміку комплементарної активності сироватки крові корів.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили на здорових та

хворих на субклінічний мастит, стрептококової та стафілококової етіології, коровах. Із них, за принципом аналогів, сформували дев'ять груп по 6-10 корів у кожній. Корови перших семи груп були хворими на субклінічний мастит. Їм втирали розчин полтавського бішофіту в шкіру вим'я переважно ураженої запаленням частки протягом 5-7 хвилин відразу після доїння з інтервалами 12, 24, 48 та 60 годин тваринам із першої до четвертої груп, відповідно, до зникнення ознак захворювання. Для корів п'ятої групи застосували препарат на його основі – санобіт, за такою ж схемою, як і розчин полтавського бішофіту, з інтервалом 24 години. У шостій групі корів лікували традиційним методом – шляхом застосування внутрім'язево стрептоміцину сульфату та бензилпеніциліну натрієву сіль у загальноприйнятій дозі двічі на добу протягом 5-7 діб до одужання. Попередньо визначали чутливість до них виділених із проб молока бактерій. У восьму і дев'яту групу ввійшли здорові корови. Тваринам восьмої групи розчин полтавського бішофіту втирали за вище вказаною методикою з інтервалом 24 години. Корови сьомої та дев'ятої груп були контрольними.

За всіма тваринами встановили постійне клінічне спостереження. До застосування розчину полтавського бішофіту та протягом 28 діб після цього кожні 7 діб відбирали проби молока для бактеріологічних досліджень і крові для вивчення динаміки біохімічних та імунологічних показників.

**Результати досліджень.** Бактеріологічні дослідження молока показали, що субклінічний мастит у корів протікає за стрептококової та стафілококової етіології.

Результати дослідження комплементарної активності сироватки крові здорових та хворих на субклінічний мастит корів наведені у таблиці.

*Динаміка комплементарної активності сироватки крові корів,  $M \pm m$ ,  $C'H_{50}$*

Групи тварин	n	Відбір проб крові крові			
		до застосування препаратів	після застосування препаратів, діб		
			7	14	21
1	6	0,92±0,08	1,78±0,08***	1,77±0,03***	1,75±0,08***
2	10	1,07±0,07	1,72±0,05***	1,74±0,05***	1,75±0,02***
3	6	1,11±0,11	1,43±0,07	1,43±0,07	1,42±0,07
4	6	0,99±0,10	1,18±0,08	1,16±0,07	1,20±0,10
5	6	0,98±0,06	1,75±0,08***	1,75±0,03***	1,73±0,08***
6	6	0,95±0,10	0,95±0,09	0,97±0,09	0,98±0,03
7	6	0,98±0,09	0,95±0,09	0,93±0,06	0,94±0,05
8	10	1,21±0,03	1,75±0,05***	1,76±0,02***	1,75±0,02***
9	6	1,22±0,09	1,25±0,05	1,23±0,05	1,25±0,05

*Примітка.* \*\*\* -  $p < 0,001$  у порівнянні з контрольними здоровими тваринами.

У наших дослідженнях ми спостерігали знижену комплементарну активність сироватки крові у хворих тварин, у порівнянні зі здоровими, на 17,7%.

На сьому добу досліджу у корів, яким застосували розчин полтавського бішофіту та санобіт, реєстрували підвищений рівень комплементарної активності сироватки крові. Так, у тварин, яким застосовували розчин полтавського бішофіту з інтервалом 12 годин, цей показник підвищився на 48,3% ( $p < 0,001$ ), 24 години – на 37,8% ( $p < 0,001$ ), 48 годин – на 22,4%, 60 годин – на 16,1%. У корів, яким застосовували санобіт він був вищим на 44,0% ( $p < 0,001$ ). У здорових тварин, яким застосовували розчин полтавського бішофіту – на 30,9% ( $p < 0,001$ ). Такий рівень

комплементарної активності сироватки крові зберігався упродовж досліджу.

До застосування розчину полтавського бішофіту кількість магнію у крові піддослідних тварин знаходилася майже на однаковому рівні.

На 7 добу після застосування розчину полтавського бішофіту з інтервалом 24 години у крові здорових та хворих корів, кількість магнію достовірно збільшувалась у 1,7-2,4 рази.

**Висновок.** У здорових та хворих на субклінічний мастит корів спостерігали достовірне ( $p < 0,001$ ) збільшення комплементарної активності сироватки крові та магнію після застосування розчину полтавського бішофіту з інтервалом 12-24 години.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Бердник В.П. Проблеми та завдання ветеринарної медицини // Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту. – 1998. – № 1. – С.31-34.
2. Булгаков А.В., Каврус М.А., Клетецкий М.Т. Влияние комплекса солей микроэлементов и витаминов на некоторые показатели обмена веществ и резистентность бычков на откорме. // Ветеринарная наука производству. – 1989. – №1. – С.136-140.
3. Вишняков С.И. Обмен микроэлементов у сель-

- скохозяйственных животных. М.: Колос, 1967. – 256с.
4. Демченко А.В., Бортничук В.О., Скибіцький В.Г. та ін. Ветеринарна мікробіологія та імунологія. К.: Урожай, 1996. – 368с.
5. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1987. – 414с.
6. Резникова Л.С. Комплемент и его значение в иммунологических реакциях. – М.: Медицина, 1967. – 271с.

УДК 619:616.98:578.824.11:616.-036.22

© 2008

**Недосєков В.В., доктор ветеринарних наук,  
Гришок Л.П., кандидат ветеринарних наук,  
Полупан І.М., науковий співробітник,  
Іванов М.Ю., аспірант\*,**

Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ

## КОНЦЕПЦІЯ ВИКОРИСТАННЯ ВАКЦИННИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ

### Постановка проблеми.

Сказ – світовий зооноз, незважаючи на значний прогрес у його вивченні й контролі, до сьогодні залишається важливою проблемою як у гуманній, так і ветеринарній медицині.

Його нозоареал має глобальний характер. Уже понад 30 років в Європі триває епізоотія сказу природного типу, основним джерелом якого є дикі м'ясоїдні, головним чином лисиці. В останнє десятиріччя епіцентром її стали країни східної Європи (10). Україна – одна з найбільш неблагополучних щодо сказу країн Європи. Емерджентність епідемічної та епізоотичної ситуації в Україні свідчить про значну загрозу й непередбачуваність епідемічного прояву природновогнищевості сказу. Спостерігається погіршення епідемічної ситуації. За 9 місяців 2007 р. в Україні зареєстровано 6 випадків захворювання людей (у 2006 році було чотири), в чотирьох випадках джерелом збудника стали домашні м'ясоїдні (66,7%). Незважаючи на щорічне збільшення обсягів специфічної профілактики, домашні м'ясоїдні продовжують брати активну участь в епізоотичному процесі (1). В 2007 році їх частка в загальній кількості діагностованих випадків становила 42,0%.

Одним із основних шляхів позитивного вирішення проблеми, яка постійно загострюється, є розробка концептуально прогресивних технологій контролю, імунопрофілактики і лабораторної діагностики сказу та їх теоретичного обґрунтування.

Передусім це стосується імунопрофілактики сказу, успіх якої досягається наявністю високоімуногенних і безпечних антирабічних вакцин.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Розробка високоімуногенних та безпечних вак-

*Наводяться дані про молекулярно-біологічні властивості вакцинних штамів вірусу сказу. На цій основі запропонована концепція їх використання для створення антирабічних вакцин.*

цин особливо актуальна нині в зв'язку з виділенням нових некласифікованих ізолятів вірусів, нових генотипів, пов'язаних із

летючими мишами. Встановлено, що існуючі антирабічні вакцини не захищають проти вірусів другої філогрупи, а для захисту проти європейських лісавірусів (генотип 5 і 6) необхідні вакцини з високою імуногенністю (6, 8).

Створення високоімуногенних, безпечних антирабічних препаратів залежить від штамів вірусу, що використовуються, технології їх отримання. В зв'язку з цим Комітет експертів ВООЗ рекомендує постійно проводити відбір нових штамів вірусу сказу для виробництва антирабічних вакцин, здійснювати оцінку ідентичності штамів, які вже використовуються (13).

**Мета досліджень та методика їх проведення.** Враховуючи вищезгадане, метою роботи було вивчення молекулярних та імунобіологічних властивостей вакцинних штамів вірусу сказу та розробка науково-обґрунтованої концепції їх використання.

**Матеріали та методи.** У роботі вивчені й проаналізовані літературні дані, що стосуються сучасних даних по класифікації лісавірусів, походження та історії пасажування вакцинних штамів вірусу сказу, їх імунологічних властивостей.

Здійснена порівняльна оцінка молекулярно-біологічних властивостей вакцинних штамів вірусу сказу двох антигенних груп – групи Пастер (PV) – це штам РБ-71, РБ-71М, “Щолково-51”, “Щолково”-51К, “Овечий” і SAD (Street Alabama Duffirin) – ТС-80, “Внуково-32”, “SAD-B19”.

Були вивчені інфекційна активність, патогенність, імуногенність та проведений молекулярно-генетичний аналіз вищезгаданих штамів вірусу сказу.

\* Науковий керівник – доктор ветеринарних наук Недосєков В.В.

*Інфекційну активність* вірусу визначали методом титрування в культурі клітин нирки сайги (НС) і на безпородних білих мишах масою 6-7 г (для штаму ТС-80) та 9-11 г за методом (3).

*Вивчення патогенності вірусу:* вірусмістимий матеріал інокулювали тваринам інтрацеребрально, внутрішньом'язово та підшкірно. Ступінь атенуації вірусу сказу оцінювали за його здатністю проникати в тканини й органи тварин (індекс інвазивності), репродукуватись у них, а також за тривалістю інкубаційного періоду, клінічних ознаках та тривалістю хвороби.

*Визначення імуногенності:* імуногенність вірусу сказу визначали на кроликах за рівнем і динамікою формування антирабічних віруснейтралізуючих антитіл при внутрішньом'язовому введенні культурального вірусмістимого матеріалу, а також за результатами контрольного інтрацеребрального зараження вакцинованих тварин тест-штамом вірусу сказу CVS.

*Молекулярно-генетичний аналіз:* рестрикційний аналіз ПЛР продуктів проводили відповідними ферментами і розділяли в 2,0 % агарозному гелі за допомогою електрофорезу (7).

Нуклеотидну послідовність фрагментів геному вірусу сказу визначали методом секвенування ампліфікованих фрагментів набором «fmo DNA Sequencing System» («Promega», США).

**Результати досліджень.** Незважаючи на чималу кількість робіт із вивчення сказу, відомостей про характеристику штамів збудника, а тим більше про порівняльні дослідження імуногенних й антигенних властивостей мало. Тому важко говорити про перевагу того або іншого штаму. Відносно порівняльних характеристик вітчизняних і закордонних штамів вірусу сказу відомості взагалі поодинокі. При інтрацеребральному введенні фіксовані штами вірусу сказу викликають після короткого інкубаційного періоду паралітичне захворювання, хоча здатність передаватися по відцентрових нервах у них різко знижена. Тому вони не виявляються в слині й не передаються при укусі.

При порівнянні нуклеотидної та амінокислотної послідовності гену глікопротеїну вакцинного штаму Внуково-32 з фіксованими штамми ERA, SADB19, PV, HEP-Flury, CVS та двома вуличними ізолятами від собак, виявили 98,9% гомології (6 замінів), 98,3% (9), 96,2 % (20), 91,4% (45), 87,0% (68), 93,5% (34) і 91,4% (45), відповідно (4).

Результати проведених досліджень показали, що найбільш консервативним регіоном глікопротеїну є ектодомен, у той час як трансмембранний і цитоплазматичний домени мають сут-

тєві розбіжності (2).

Для порівняння вакцинних штамів вірусу (5) використали праймери, комплементарні консервативному регіону, що фланкує ділянку псевдогену. У порівнянні з польовими ізолятами, дана ділянка регіону вакцинних штамів відрізняється більшою розбіжністю (близько 14,7%) для груп ERA-SAD і PV-PAS. Така розбіжність не була несподіванкою, оскільки більшість вакцинних штамів виділені 40-100 років тому. Відзначено, що польові ізоляти, виділені в Європі, були ближчими до груп ERA-SAD і PV-PAS, ніж до груп CVS (Av1)-PM (9).

Ці дослідження свідчать про необхідність одержання нових вакцинних штамів, що, насамперед, корисно для тих країн, де поширені інші генотипи лісавірусів (2-4,5,6 генотипів), але в яких застосовуються вакцинні штами 1-го серотипу (12).

Таким чином, однією з основних вимог при виготовленні вакцин є вибір штаму вірусу, оскільки дані літератури свідчать, що окремі штами вірусу сказу (ERA і Flury Lep) можуть мати високу вірулентність для мишей при природному шляху введення (11).

У зв'язку з цим, необхідним є вивчення та аналіз імуно- і молекулярно-біологічних властивостей та характеристик штамів вірусу сказу, що є перспективними для імунізації тварин.

У лабораторії сказу ІВМ створена колекція і вивчені імунобіологічні властивості вакцинних штамів вірусу сказу: РБ-71, РБ-71М, Щолково-51, Щолково-51 К, ТС-80, SAD-B19, Овечий, Сайраб та Внуково-32, а також тест-штаму вірусу сказу CVS. Вивчення адаптаційно-культуральних властивостей показало гетерогенну пермісію перещеплюваних ліній культур клітин до дослідних штамів вірусу сказу. Максимальним накопиченням в оптимальній культурі клітині НС характеризувався штам Щолково-51 К (6,8±0,2 lg МЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). На основі штаму Щолково-51 К методом адаптації до технологічно ліквідної і пермісивно-продуктивної клітинної системи НС був отриманий штам Сайраб. Підібрані оптимальні параметри культивування вірусу сказу, штаму Сайраб (множинність інфікування – 0,1-0,01 МЛД<sub>50</sub>/кл, час максимального накопичення – 96-120 годин, температура для зараження вірусом культури клітин НС – 37° С). Культивування вірусу протягом 12 пасажів у культурі клітин НС показало стабільність його властивостей.

Проведений молекулярно-генетичний аналіз вакцинних штамів вірусу сказу SAD, ТС-80,

Щолково-51, РБ-71 і CVS методом рестрикційного аналізу псевдогену, регіону, на який здійснюється найбільший еволюційний пресинг. Аналіз ампліконів псевдогену і нуклеопротеїну, з використанням підібраних рестриктаз, показав, що штами ТС-80 і Внуково-32 є близькоспорідненими до штаму SAD (мають однакову картину рестрикції), а штами РБ-71 і Щолково-51 – до штаму PV.

За допомогою молекулярно-генетичного аналізу розроблений спосіб диференціації вакцинних штамів вірусу сказу з метою визначення походження і належності дослідних штамів вірусу сказу, що має суттєве значення для розробки та застосування антирабійних вірусвакцин, а також вірусологічного моніторингу епізоотій сказу.

Вивчення нейропатогенних властивостей вакцинних штамів вірусу сказу Сайраб, РБ-71 и ТС-80 показало гетерогенну чутливість лабораторних моделей. Вивчення антигенної активності штамів Сайраб і РБ-71 при парентеральному введенні показало високий рівень формування захисту протягом тривалого періоду.

На підставі проведених досліджень розроблена „Концепція використання вакцинних штамів вірусу сказу.”

**Висновок.** *Положення концепції.* Підсумовуючи результати аналізу літературних даних та власних досліджень про молекулярно-біологічні властивості вакцинних штамів вірусу сказу, необхідно відзначити, що в світі існує величезне різноманіття вакцинних штамів, які відрізняються своїми імунобіологічними характеристиками.

Встановлення розбіжності вакцинних штамів із польовими ізолятами на молекулярно-генетичному рівні свідчить про необхідність селекції та отримання нових вакцинних штамів. Це має особливе значення для України, де поряд із генотипом 1 зареєстрований 5-й генотип лісавірусів.

Основними критеріями для відбору штамів є патогенність, молекулярно-біологічні властивості, імуногенність та антигенність.

Проведений аналіз показав наявність двох антигенних груп вакцинних штамів вірусу сказу – групи PV та SAD, які відрізняються патогенними властивостями. Слабовірулентними штамми виявилися штами групи PV – РБ-71, Сайраб, Щолково-51 та інші, до авірулентних віднесені штами ТС-80 та SAD B19 із групи SAD.

Для виготовлення високоєфективних інактивованих вакцин вважаємо доцільним використовувати штами групи PV (Щолково-51, Сайраб та РБ-71) та групи SAD (Внуково-32 та ТС-80) у

зв'язку з їх високими репродуктивними властивостями. Їх використання дозволить отримувати урожай вірусу, що забезпечує рівень протективної активності  $> 1,5$  МО.

З тим, аби бути впевненими, що штами, які використовуються для виробництва антирабійних вакцин, володіють захисними властивостями відносно інфекції, що викликається місцевими ізолятами вуличного сказу, необхідна чітка ідентифікація як вакцинних штамів, так і вуличних ізолятів. Із цією метою можна використовувати моноклональні антитіла проти різних антигенних детермінант нуклеокапсидів і глікопротеїнів вірусу сказу, а також молекулярно-генетичний аналіз, секвенування нуклеотидів, використання рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації псевдогену і гену нуклеопротеїну із застосуванням підібраних рестриктаз.

При відборі штамів вірусу сказу для виготовлення вакцин для пероральної імунізації необхідно чітко дотримуватись вимог ВООЗ щодо їх безпечності та імуногенності (Expert Consultation on Rabies, WHO, 2005), а саме:

- титр вірусу в пероральній вакцині повинен бути не менше  $7,0 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> або  $6,0 \lg$  МЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>;
- штами вірусу повинні бути генетично стабільними;
- бути безпечними для молодих тварин (у віці 3-6 місяців) при пероральному введенні 10-кратної дози;
- не повинно бути виділення вакцинного вірусу зі слиною та іншими секретами;
- бути безпечними як для цільових видів тварин, так і для інших тварин, які можуть їх вживати, а також людини;
- бути стійкими при зберіганні, термостабільними в польових умовах.

Цим вимогам найбільш відповідають вакцинні штами вірусу сказу групи SAD.

Штам SAD B19 у зв'язку з високою імуногенністю та апатогенністю для векторних тварин може використовуватися для оральної імунізації диких м'ясоїдних. Проте Комітет експертів ВООЗ (Expert Consultation on Rabies, WHO, 2005) вважає за необхідне відмовитися від модифікованих живих вірус-вакцин у зв'язку із залишковою патогенністю для окремих видів гризунів при різних шляхах введення. Рекомендовано для оральної імунізації рекомбінантні вакцини та вакцини на основі делеційного мутанту SAG<sub>2</sub>.

**Пропозиції.** 1. На основі штамів групи Пастер (Щолково-51, Сайраб, РБ-71 тощо) удосконалю-

вати і розробляти інактивовані вакцини, що матимуть активність не менше 2 МО і дозволятимуть формувати імунну відповідь не менше 1 МО (мінімальний протективний рівень віруснейтралізуючих антитіл  $\geq 0,5$  МО).

2. На основі штамів групи SAD (Внуково-32, ТС-80 і SAD B19) удосконалювати і розробляти оральні вакцини, які володітимуть активністю не менше  $6 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$  і забезпечать формування імунної відповіді не менше 1 МО.

3. Проводити вивчення молекулярної епізоотології вуличних ізолятів для ідентифікації і порівняльного аналізу еволюції ізолятів та вакцин-

них штамів.

4. Проводити щорічний відбір вакцинних штамів вірусу сказу, які використовуються для виготовлення антирабічних вакцин (парентеральних та оральних), і на базі ІВМ УААН ("Науково-дослідний центр з питань вивчення та профілактики сказу в Україні") проводити вивчення ідентичності й збереженості їх імунобіологічних властивостей.

5. Усі вакцини, що надходять на використання в Україну, повинні оцінюватися згідно зі штамовою приналежністю на відповідність вимог, закладених у ТУ.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Гришок Л.П., Недосєков В.В., Падалка О.В. та ін. Моніторинг популяційного імунітету вакцинованих проти сказу м'ясоїдних тварин // Матер. наук.-практ. конф. з проблем дрібних тварин. – Львів, 2007. – С.5-7.
2. Метлин А.М. Разработка средств диагностики бешенства животных // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Владимир, 2004. – 25с.
3. Недосєков В.В. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бешенства животных и контроля эффективности антирабических вакцин // Дис. д-ра вет. наук: 16.00.03. – Покров. – 2003. – 48с.
4. Цыбанов Я.С. Разработка тест-системы для идентификации вируса арктического бешенства на основе методов анализа генома // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Покров, 2004. – 26с.
5. Bernardi F. et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir // J. Gen. Virol.- 2005.- Vol. 86. – No. 11. – P.3153-3162.
6. Brookes S.M., Healy D.M., Fooks A.R. Ability of rabies vaccine strains to elicit cross – neutralising antibodies // Development in Biological. – 2005. –

Vol. 125. – P.185-193.

7. Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series 924 // WHO. – 2005. – 143p.
8. Hanlon C.A., Kuzmin I.V., Blanton J.D. et al. Efficacy of rabies biologics against new Lyssaviruses from Eurasia // Virus Res. – 2005. – 111 (1). – P.44-54.
9. Park Y.J., Shin M.K., Kwon H.M. Genetic characterization of rabies virus isolates in Korea // Virus Genes. – 2005. – Vol. 30. – No. 3. – P.341-347.
10. Rabies bulletin Europe. WHO, Information surveillance research. 2007. – vol. 31. – № 1. – P.18-19.
11. Rupprecht C. et al. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines // Virus Research. – 2005. – Vol. – No. 111. – P.101-105.
12. Wandeler A.I. Rabies Vaccinology and Immunology // First International Conference on Rabies in Europe. – 2005. – P.181-185.
13. Webster W.A., Casey G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. Laboratory techniques in Rabies Fourth edition. Ed. Meslin, M. Kaplan, A. Koprowski. – WHO. – 1996. – P.96-103.



УДК 619: 612.017: 619: 616.155.392: 636.2

© 2008

*Кісера Я.В., кандидат біологічних наук\*,*

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій  
імені С.З. Гжицького

## АКТИВНІСТЬ ОКРЕМИХ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ КРОВІ У ІНФІКОВАНОЇ ВІРУСОМ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

### Постановка проблеми.

Лейкози становлять одну з найактуальніших проблем патології людей і тварин. На сьогодні проблема специфічної, високочутливої, швидкої, простої, доступної й дешевої діагностики лейкозу повністю не вирішена. Для успіху на цьому шляху в рамках сучасних вимог необхідне залучення нових даних, які характеризують біохімічні зміни в процесі розвитку інфекційного процесу при лейкозі великої рогатої худоби.

Для пізнання патогенетичної сутності лейкозу суттєве значення має вивчення обмінних процесів не лише безпосередньо в клітині, але й в ураженому органі та в організмі. Зміни в крові, яка є внутрішнім середовищем організму, відображають сутність патологічних процесів у ньому.

Обмін вуглеводів є невід'ємною складовою загального обміну речовин живого організму. Енергія, як результат розпаду вуглеводів, використовується для життєдіяльності організму так, як і проміжні продукти їх обміну (1-2, 7).

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Проблемам етіології та патогенезу лейкозів людини і тварин присвячені зокрема дослідження З.А. Бутенко (1989), Л.Г. Ковальова (1990). Є очевидним той факт, що порушення в мембранних структурах відіграють значну роль у патогенезі багатьох захворювань, у тому числі, й у розвитку різних форм гемобластозів. Не дивлячись на те, що в основі розвитку лейкозів лежить ураження білих клітин крові РНК-геномним вірусом, що зумовлює їх нерегульовану проліферацію і порушення процесів диференціювання, дані літератури вказують на втягування в цей процес еритроцитів (Николаева Н.В., 1987). Дані В.В. Рязанцева (1996) свідчать, зокрема, про те, що у тварин як із прихованим перебігом лейкозного процесу, так і на стадії гематологічних проявів змінюються структурно-функціональні

*У інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби активність ФФК, альдолази, глюкозофосфатізомерази та АТФ-ази є нижчою в середньому на 2-8%, порівняно з їх активністю у здорових тварин, тоді як активність фосфатази Ф-6-Ф не змінюється.*

властивості еритроцитів. Уже на початкових етапах розвитку лейкозу, коли організм реагує на проникнення вірусу утворенням антитіл, а змін у картині

крові не спостерігається, проходить підвищення активності глутатіонпероксидази (GSH-P), що гальмує розвиток процесів перекисного окислення ліпідів і відкладання в клітині токсичних продуктів окислення ліпідів.

**Мета досліджень та методика їх проведення:** провести дослідження взаємозв'язку окремих ланок обміну вуглеводів. Досліджувалося використання Ф-6-Ф і перетворення його в Г-6-Ф, Ф-1,6-Ф, тріози, нефосфорильовану фруктозу і неорганічний фосфат. На основі цього визначали активність глюкозофосфатізомерази, фосфофруктокінази (ФФК), альдолази, фосфатази Ф-6-Ф і АТФ-ази еритроцитів у здорової та інфікованої вірусом лейкозу великої рогатої худоби.

Дослідження проводилися на 15 бичках чорно-рябої породи. Було сформовано дві групи тварин. Одна група – контрольна (здорові тварини – 5 голів), друга група – дослідна. Тваринам дослідної групи (10 голів) введено кров у дозі 1,0 мл від гематологічно хворої на лейкоз корови (23,6 г/л лейкоцитів при 81% лімфоцитів). Кров для досліджень брали з яремної вени. Як антикоагулянт використовували 5 М оксалат калію. Еритроцити одержували шляхом центрифугування цільної крові при 6000 об./хв. протягом 15 хвилин. Після видалення плазми їх двічі промивали охолодженим фізіологічним розчином NaCl. Еритроцити гемолізували бідистильованою водою в співвідношенні 1:1, гемолізати еритроцитів використовували для інкубації.

Для дослідження процесів перетворення Ф-6-Ф інкубаційна суміш проб складалася з 0,27 мл гемолізату еритроцитів; 1,09 мл 50 мМ Тріс HCl буфера рН 8,0; 0,32 мл 12 мкМ Ф-6-Ф (фірми

\*Наукові консультанти – доктор біологічних наук, академік УААН Р.Й. Кравців,

– доктор ветеринарних наук, член-кореспондент УААН М.С. Мандигра

„Reanal”); 0,32 мл 12 мкМ АТФ (фірми „Reanal”). Інкубацію проводили в ультратермостаті при 30°C протягом п'яти хвилин. Після інкубації білки осаджували хлорною кислотою з розрахунку 6% кінцевої концентрації, а також барій-цинковим реактивом за Somogii B.M. (9), використовуючи 0,3N Ва (ОН)<sub>2</sub> і 5% ZnSO<sub>4</sub>.

У фільтрах визначали вміст Г-6-Ф за Hohorsty H.J. (3), використовуючи 0,1 М Триц НСІ буфер рН 7,6 – 2,45 мл; 0,25 мл фільтрату; 0,2 мл НАДФ (2·10<sup>-6</sup> М) фірми „Reanal”; 0,1 мл глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (50 мкг) фірми „Reanal” на одну пробу.

Утворення Ф-1,6-Ф і тріоз досліджували за Lowzer R.B., Rowland Z.P. (6). До складу проби входили 1,8 мл 50 мМ Триц НСІ буфера рН 8,0; 1,0 мл фільтрату; 0,1 мл 0,25 мМ НАДН фірми „Reanal”; 0,05 мл гліцерофосфатдегідрогенази (500 мкг) фірми „Reanal” і 0,05 мл альдолази (300 мкг) фірми „Reanal”. Утворення дефосфорильованої фруктози визначали за методом Kulka R.G. (4), використовуючи для цього фільтрат осаджений барій-цинковим реактивом. Неорганічний фосфат визначали за методом Lowry O.H., Lopez J.A. (5).

Активність ФФК визначали по утворенню Ф-1,6-Ф і тріоз, а активність альдолази – по утворенню тріоз. За утворенням Г-6-Ф визначали активність глюкозофосфатізомерази. АТФ-азну активність визначали за утворенням неорганічного фосфату з вирахуванням фосфату дефосфорильованої фруктози. По утворенню дефосфори-

льованої фруктози визначали активність фосфатази Ф-6-Ф. Проведені розрахунки співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф.

Дослідження проводилися на спектрофотометрі СФ-16 у термостатуючій кюветі і фотоелектроколориметрі (ФЕК-60). Одержані дані ферментативної активності виражені в мкмолях на 1 мл еритроцитів за 1 хвилину інкубації, а використання Ф-6-Ф і співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф виражені в мкмолях на пробу.

**Результати досліджень.** Проведені нами дослідження показали, що в інфікованих тварин спостерігається незначне зниження активності ФФК, альдолази, глюкозофосфатізомерази (таблиці 1, 2) по відношенню до здорових тварин.

Для функціонування клітини повинні отримувати енергетичні речовини з навколишнього середовища. Визнано, що безпосереднім джерелом енергії під час активного транспорту є АТФ. Швидкість активного транспорту є фактором, контролюючим тканинне дихання, що цілком сумісне з гіпотезою про зв'язок процесів утворення АТФ. На думку F.E. Samson (8), підвищена активність АТФ-ази є біохімічним показником підвищеного енергетичного обміну, тобто процеси, що доставляють енергію, залежать від реакцій, які для свого існування вимагають затрат енергії. Активність АТФ-ази знижується в інфікованих тварин, порівняно з її активністю у здорових тварин, у середньому на 7,7%.

**1. Динаміка перетворення Ф-6-Ф гемолізатами еритроцитів здорового молодняка великої рогатої худоби  $M \pm m$ , n=5**

Назва показників	Одиниця виміру	Вік в місяцях						
		12	13	14	15	16	17	18
ФФК	мкМ/мл.ер./хв. інк	0,159± 0,018	0,170± 0,053	0,161± 0,036	0,165± 0,046	0,166± 0,061	0,159± 0,012	0,163± 0,011
Альдолаза	-//-/-	0,027± 0,003	0,027± 0,001	0,026± 0,004	0,028± 0,002	0,028± 0,001	0,026± 0,002	0,027± 0,002
Глюкозо-фосфат-ізомераза	-//-/-	2,851± 0,195	2,878± 0,577	2,803± 0,382	2,873± 0,054	2,846± 0,487	2,819± 0,556	2,785± 0,033
АТФ-аза	-//-/-	0,368± 0,053	0,397± 0,060	0,471± 0,075	0,442± 0,040	0,412± 0,029	0,427± 0,043	0,441± 0,066
Фосфатаза Ф-6-Ф	-//-/-	0,059± 0,006	0,057± 0,003	0,057± 0,003	0,058± 0,002	0,058± 0,004	0,056± 0,002	0,059± 0,003
Співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф	мкМ/проба	1,024± 0,185	1,247± 0,198	1,043± 0,211	1,147± 0,148	1,174± 0,175	1,232± 0,195	1,13± 0,198
Залишок Ф-6-Ф	-//-/-	2,169± 0,182	1,891± 0,320	2,205± 0,281	1,970± 0,266	1,806± 0,160	1,857± 0,339	2,045± 0,420

Примітка: у даній і наступній таблицях вірогідність порівняно з 12-місячними тваринами: \* при P < 0,001; \*\* при P < 0,01; \*\*\* при P < 0,05.

2. Динаміка перетворення Ф-6-Ф гемолізатами еритроцитів інфікованого вірусом лейкозу молодняка великої рогатої худоби  $M \pm m, n=10$

Назва показників	Одиниця виміру	До інфікування, вік 12 міс.	Після інфікування					
			1 місяць, вік 13 міс.	2 місяці, вік 14 міс.	3 місяці, вік 15 міс.	4 місяці, вік 16 міс.	5 місяців, вік 17 міс.	6 місяців, вік 18 міс.
ФФК	мкМ/мл.ер./хв. інк	0,140± 0,021	0,157± 0,017	0,170± 0,024	0,166± 0,006	0,154± 0,052	0,135± 0,054	0,127± 0,006
Альдолаза	-//-/-	0,023± 0,002	0,025± 0,001	0,028± 0,008	0,027± 0,001	0,025± 0,009	0,022± 0,001	***0,018± 0,001
Глюкозо-фосфат-ізомераза	-//-/-	2,787± 0,053	2,738± 0,348	2,790± 0,269	2,838± 0,289	2,787± 0,211	2,510± 0,181	*2,360± 0,031
АТФ-аза	-//-/-	0,324± 0,061	0,383± 0,032	0,412± 0,033	0,420± 0,035	0,390± 0,022	0,294± 0,027	0,243± 0,025
Фосфатаза Ф-6-Ф	-//-/-	0,057± 0,003	0,058± 0,010	0,059± 0,008	0,058± 0,001	0,056± 0,003	0,052± 0,002	**0,046± 0,002
Співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф	мкМ/проба	1,074± 0,263	1,416± 0,157	1,203± 0,107	1,236± 0,148	1,366± 0,139	***2,022± 0,316	0,900± 0,093
Залишок Ф-6-Ф	-//-/-	2,123± 0,156	***1,528± 0,202	1,896± 0,212	1,863± 0,209	***1,592± 0,176	*1,008± 0,188	2,197± 0,321

Активність фосфатази Ф-6-Ф не змінюється протягом чотирьох місяців після інфікування, залишаючись на одному рівні активності зі здоровими тваринами. Спостерігається підвищення співвідношення Г-6-Ф/Ф-6-Ф у інфікованих тварин до 1,366 мкМ/пробу, тоді як у здорових тварин воно складає 1,174 мкМ/пробу.

Отже, в перші чотири місяці інфікування вірусом лейкозу в інфікованих тварин активність фосфофруктокінази, альдолази, глюкозофосфатізомерази, АТФ-ази і фосфатази Ф-6-Ф коливається в межах їх активності у здорових тварин, що свідчить про відсутність суттєвих змін в обміні вуглеводів на початкових етапах гліколітичного шляху перетворення вуглеводів.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Головацький І.Д. Обмін вуглеводів у сільськогосподарських тварин. – К.: УСГА, 1961. – 211с.  
 2. Гульй М.Ф., Дворникова П.Д., Литвиненко Л.Т. Об изменении первичной структуры белков, синтезирующихся в условиях изменения физиологического состояния организма // Доклады АН СССР. – М., 1970. – Т. 193. – № 6. – С.1411-1414.  
 3. Hohorst H.J. D-Glucose-6-phosphat and d-Fructose-6-phosphat. – Bergmeyer H. „Methoden der enzymatischen Analyse”. – 1962. – v. 3. – P.1238-1242.  
 4. Kulka R.G. Colorimetric estimation of ketopentoses and hexoses. – Biochem. J. – 1956. – V. 63. – P.542.  
 5. Lowry O.H., Lopez J.A. Determination of inorganic phosphate in the present of labeling ester. – J.

Порушення в обміні вуглеводів на початкових етапах гліколітичного шляху перетворення вуглеводів спостерігається з п'ятого місяця інфікування, яке характеризується зниженням активності всіх досліджуваних ферментів.

**Висновки.**

1. У перші чотири місяці інфікування вірусом лейкозу в інфікованих тварин відсутні зміни в обміні вуглеводів на початкових етапах гліколітичного шляху перетворення вуглеводів.

2. Суттєві зміни в обміні вуглеводів на початкових етапах гліколітичного шляху перетворення вуглеводів спостерігаються з п'ятого місяця інфікування, що характеризуються зниженням активності всіх досліджуваних ферментів.

Biol. Chem., 1946. – V. 162. – P.421.  
 6. Lowzer R.B., Rowland L.P., Bank W.J. Physical and Kinetic Properties of Human Phosphofruktokinaze from Skeletal Muscle and Erythrocytes. – The Journal of Biologic Chemistry. – 1969. – V. 244, №14. – P.3823-3831.  
 7. Lumeng L., Davis E. The oxidation of acetate by liver mitochondria // FEBS Lett. – 1973. – V.29. – P.124-126.  
 8. Samson F.E., Guinn D.P. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> activated AT-Fase in rat brain development // J. Neurochem. – 1967. – V. 14. – P.421-427.  
 9. Somogui B.M. A new reagent for the determination of sucars. – The Journal of Biological Chemistry. – 1945. – v.160, №1. – P.61-68.

УДК 619:616.9  
© 2008

*Мартинюк О.Г., науковий співробітник  
ТОВ «Алтекс»*

## ПІДБІР ОПТИМАЛЬНОЇ СХЕМИ ІМУНІЗАЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ГІПЕРІМУННОЇ ХЛАМІДІЙНОЇ СИРОВАТКИ

### Постановка проблеми.

На сьогодні інфекції хламідійної етіології характеризуються поширенням і прогресуючим збільшенням питомої ваги серед хвороб у людей та тварин (3-4).

Встановлено, що завдяки унікальним біологічним властивостям представники порядку *Chlamydiales* сприяють розвитку захворювань, що розрізняють за патогенезом та клінічними ознаками – залежно від рівня взаємодії в системі «паразит – хазяїн» (3). Разом із тим в епідеміології хламідіозів відмічають формування персистентних інфекцій, що характеризуються хронічним перебігом із латентним пасажуванням збудника в організмі хазяїна, що обумовлено зниженням функціональної активності імунної системи останнього й супроводжується тривалими субклінічними проявами. Відсутність клінічної маніфестації, або поліморфізм ознак, у свою чергу, ускладнює діагностику, в результаті чого вони стають резервуаром збудника в популяції (1-2, 5).

Актуальність проблеми діагностики хламідіозу, особливо у дрібних домашніх тварин, зокрема собак та котів, обумовлена тим, що вони є носіями цієї небезпечної для людей інфекції, яка досить часто має безсимптомний перебіг.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Одним із основних методів ідентифікації хвороби є лабораторна діагностика. Проте, на жаль, нині в Україні немає зареєстрованих діагностичних препаратів як вітчизняного, так і зарубіжного виробництва.

Тому розробка ефективних діагностичних препаратів залишається досить важливою складовою частиною стратегії боротьби з хламідіозом. Розробка більшості препаратів для ретроспективної діагностики базується на одержанні гіперімунних сироваток. Їх виробництво передбачає підбір тварин-донорів, які відповідали б на введення антигену активною продукцією антитіл, приготування високоочищеного антигену, розробка оптимальної схеми імунізації та вивчення процесу антитілоутворення.

**Мета досліджень та методика їх проведен-**

*Наведені результати досліджень із підбору оптимальної схеми імунізації та тварин-продуцентів із метою одержання гіперімунної сироватки.*

**ня.** У зв'язку з вищевказаним, метою досліджень було підібрати оптимальні схеми імунізації тварин

для одержання гіперімунної хламідійної сироватки.

Дослідження проводили на базі ТОВ «Алтекс» та ЗАТ «НВАП «Новогалещинська біофабрика», на дільниці вірусних препаратів.

Із метою підбору тварин-донорів, продуцентів гіперімунної хламідійної сироватки в якості піддослідних тварин використовували овець (вага 30-40 кг), кроликів (вага 2,5-3,0 кг) та мурчаків (350-400 г).

Для імунізації використовували групоспецифічний антиген хламідій, отриманий з кон'юнктивальних змивів кішки, культивований на жовточних оболонках курячих ембріонів, з інфекційною активністю до інактивації 7,8lg ЕЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, який вводили чотирьом вівцям з інтервалом у 7 діб. При першій імунізації антиген вводили підшкірно в п'ять точок у дозі 1 см<sup>3</sup> та внутрішкірно в 10 точок по 0,2 см<sup>3</sup>. Наступні імунізації проводили введенням антигену підшкірно в 10 точок та внутрішкірно – в 15 точок у тих же дозах, а також внутрішньотрахеально вводили 3 см<sup>3</sup>/голову.

Кролям вводили антиген підшкірно та внутрішкірно в 10 точок по 0,2 см<sup>3</sup>. При першій імунізації антиген вводили підшкірно й внутрішкірно в п'ять точок. Починаючи з другої імунізації внутрішньотрахеально вводили по 0,5 см<sup>3</sup>.

Мурчаків імунізували за такою ж схемою, але, починаючи з другого введення, антиген вводили інтраперитонеально в дозі 2 см<sup>3</sup>.

Перед початком циклу імунізацій від кожної з тварин відбирали кров, одержували сироватку та досліджували її в РЗК із метою виключення тварин, які містять антитіла до хламідій. Перед кожним наступним циклом імунізації досліджували сироватки крові тварин на наявність протихламідійних антитіл в РЗК. За титр антитіл брали середній титр, виявлений у тварин дослідної групи.

З метою постановки РЗК застосовували набір антигенів та сироваток для серологічної діагнос-

тики хламідіозів виробництва ВНДВІ, м. Казань.

**Результати досліджень.** На першому етапі метою досліджень було визначення оптимального способу введення антигену; використовували овець, з яких було сформовано групи по п'ять тварин у кожній:

- тваринам першої групи антиген вводили внутрішкірно в 20 точок по  $0,2 \text{ см}^3$ ;

- тваринам другої групи антиген вводили підшкірно в 10 точок по  $0,5 \text{ см}^3$ ;

- тваринам третьої групи антиген вводили внутрішньотрахеально в дозі  $5 \text{ см}^3$ . Кожна група пройшла шість циклів імунізації через кожних 7 днів.

Тварин четвертої групи імунізували підшкірно в дозі  $15 \text{ см}^3$  одноразово.

Для отримання якісних і достовірних даних використовували контрольну групу, тваринам якої замість антигену вводили плацебо.

В результаті досліджень антитіла були виявлені на сьому добу при підшкірному та внутрішньотрахеальному введенні антигену та на чотирнадцяту добу – у тварин, імунізованих внутрішкірно, з титром антитіл 11,2; 12,8 та 12,4, відповідно. Це свідчить про швидшу відповідь організму при підшкірному та внутрішньотрахеальному введенні антигену.

Максимальні титри антитіл виявляли після четвертої імунізації на 28-му добу у тварин першої і другої груп, та на 21-шу добу – у тварин третьої групи, 128,0; 281,6; 230,4 відповідно. Слід зазначити, що такий титр антитіл залишався незмінним після наступних імунізацій.

У тварин четвертої групи, яким антиген вводили одноразово підшкірно, антитіла виявляли на сьому добу в титрах 12,0. Максимальний рівень антитіл спостерігали на 21-шу добу: він становив 128,0, що набагато нижче рівня антитіл у групах, де було проведено ряд повторних імунізацій.

Сироватки крові тварин контрольної групи не реагували з хламідійним групоспецифічним ан-

тигеном у РЗК.

Найвища активність сироватки спостерігалася у тварин другої групи. Внутрішкірне введення антигену є досить трудомістким процесом, особливо при застосуванні його на значній кількості тварин в умовах виробництва.

Взявши за основу одержані результати, для імунізації тварин нами була підібрана комбінована схема, що включала підшкірне та внутрішньотрахеальне введення одночасно. Цю схему ми використали в наступному досліді з підбору тварин, які були б оптимальними продуцентами гіперімунної сироватки (табл. 1).

Як показують дані, представлені в таблиці 1, комплементзв'язуючі антитіла виявлялися на чотирнадцяту добу від першої імунізації в овець та кролів, та на сьому – у мурчаків. Найвищий титр протихламідійних антитіл виявили в овець на двадцять восьму добу після імунізації – він становив 1:438,4. У результаті імунізації кролів та мурчаків одержали значно менші титри протихламідійних антитіл, які склали, відповідно, 1:212 та 1:244.

Максимальні титри антитіл виявляли у кролів на двадцять восьму добу, а у мурчаків – на чотирнадцяту. У кролів та овець після п'ятої імунізації не спостерігалася значного зростання титру антитіл, а у мурчаків – після четвертої.

Таким чином, вівці виявилися найбільш придатними для використання їх у ролі донорів гіперімунної сироватки, оскільки в їх сироватках виявляються хламідійні антитіла у більш високих титрах, а також з огляду на те, що з вівці можна одержати більший об'єм сироватки. Використання їх є більш технологічно обгрунтовано.

#### **Висновки:**

Отже, проведені дослідження дозволили встановити:

1. Оптимальним донором для одержання сироватки є вівці, які забезпечують високий рівень антитіл, простоту проведення та технологічність одержання.

#### **1. Динаміка накопичення протихламідійних антитіл у результаті імунізації тварин групоспецифічним антигеном хламідій, n=3**

Доба від початку імунізації	Вівці	Кролі	Мурчаки
0	-	-	-
7	-	-	1:16
14	1:14,4	1:8	1:244
21	1:240	1:76,8	1:268
28	1:438,4	1:212	1:270,4
35	1:464,4	1:240	1:315,6

2. На основі результатів досліджень підібрана оптимальна схема імунізації тварин, що включає одночасне введення тваринам антигену підшкірно та внутрішньотрахеально.

3. Вивчення динаміки накопичення антитіл показало, що мінімальний рівень антитіл виявлений на 7-му добу з наступним наростанням до

14-ої та 35-ої доби (термін спостереження) залишається у вигляді плато. Одержані результати дозволили обґрунтувати шестикратне введення антигену, переваги його над одноразовим введенням та визначити час найвищої активності сироватки.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Белоусов В.И. Разработка набора для иммуноферментной серодиагностики хламидиоза овец // Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. – 1995. – 76с.

2. Горовиц Э.С. и др. Диагностика хламидийных инфекций человека и животных. // ЖМЭИ. – 1998. – С.72-75.

3. Гранитов В.М. Хламидиозы. – 2000. – 192с.

4. Маилян Э.С. Орнитоз (хламидиоз птиц). // Ветеринария. – 2000. – С.4-10.

5. Мананков В.В. и др. Выявление антигенов хламидий у птиц методом прямой иммунофлуоресценции. // Актуальные проблемы ветеринарии. – Барнаул. – 1995. – С.94-95.

УДК 619:616-08:615.844:57.063.8:578.826:636.5  
© 2008

*Пащенко О.О., кандидат ветеринарних наук,  
Луганський національний аграрний університет*

## МОНІТОРИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ СІНАНТРОПНОЇ, СВІЙСЬКОЇ ТА ДИКОЇ ПТИЦІ ЩОДО АДЕНОВІРУСУ ПЕРШОГО СЕРОТИПУ

**Постановка проблеми.** В останні роки аденовірусна інфекція птиці значного широкого поширення в усіх країнах світу із розвиненим птахівництвом.

В Україні дослідники О.В. Волосянко, В.В. Герман (1) встановили суттєве розповсюдження аденовірусної інфекції першого серотипу з-поміж птиці в промислових птахогосподарствах.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Проведені серологічні дослідження щодо розповсюдження аденовірусів серед птиці на території колишньої Чехословаччини свідчать про наявність антитіл проти семи серотипів аденовірусів. Окрім того, відмічено тенденцію збільшення позитивних результатів із віком птиці (3).

З метою діагностики аденовірусної інфекції птиці з-поміж серологічних методів частіше використовують реакцію непрямой гемаглютинації (РНГА) та імуоферментний аналіз (ІФА) (2).

*Викладено результати серологічних досліджень синантропної, свійської та дикої птиці із визначення рівня антитіл до аденовірусу першого серотипу. Найбільший титр антитіл виявлено у свійської птиці ( $4,0 \log_2$ ). У дикої та синантропної птиці антитіла реєструвалися на рівні від 1 до  $3,6 \log_2$ .*

**Мета досліджень.** Визначити розповсюдження аденовірусу першого серотипу серед синантропної, свійської та дикої птиці, яка мешкає на території Луганської області.

### Матеріали і методи досліджень.

Для визначення рівня антитіл до аденовірусу першого серотипу використовували реакцію непрямой аглютинації (РНГА) з еритроцитарним діагностикумом до штамму Phelps ННЦ «ІЕКВМ» аденовірусу першого серотипу першої групи (2).

Всього досліджено 120 зразків сироватки крові синантропної птиці (горобці, голуби), 60 зразків – сироватки крові дикої птиці (граки, дикі качки), 170 зразків сироватки крові свійської птиці (кури, гуси).

**Результати досліджень.** Необхідно зазначити, що у процесі дослідження сироваток крові від синантропної, дикої та свійської птиці в усіх випадках виявлялися антитіла до аденовірусу першого серотипу на різному рівні (табл. 1).

### 1. Рівень антитіл щодо аденовірусу першого серотипу у синантропної, свійської та дикої птиці

Район Луганської області	Рівень антитіл щодо аденовірусу, $\log_2$		
	синантропної птиці	свійської птиці	дикої птиці
Біловодський	-	$4,0 \pm 0,09$	-
Лутугінський	$3,1 \pm 0,15$	$1,5 \pm 0,06$	-
Станично-Луганський	$2,0 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,12$	$3,0 \pm 0,03$
Троїцький	-	$3,2 \pm 0,06$	-
Білокуракинський	-	$3,1 \pm 0,21$	-
Слав'яносербський	-	$3,0 \pm 0,24$	$2,0 \pm 0,16$
Антрацитівський	$2,0 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,02$
Марківський	-	$3,0 \pm 0,21$	$3,0 \pm 0,5$
Сватівський	$3,0 \pm 0,04$	$2,5 \pm 0,03$	-
Перевальський	$3,1 \pm 0,21$	$3,4 \pm 0,02$	-
Новопсковський	$2,0 \pm 0,16$	$3,2 \pm 0,06$	-
Кременський	$2,0 \pm 0,14$	$2,3 \pm 0,16$	-
Свердловський	$2,0 \pm 0,14$	$2,4 \pm 0,15$	-
Міловський	$2,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,03$	-
Старобільський	$2,0 \pm 0,21$	$3,4 \pm 0,15$	$1,0 \pm 0,1$
Краснодонський	$3,6 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,03$	-
Попаснянський	$2,5 \pm 0,34$	$3,1 \pm 0,24$	$3,0 \pm 0,02$

Великий відсоток реагуючої до аденовірусу синантропної птиці, встановлено у Сватівському, Станично-Луганському, Краснодонському та Перевальському районах Луганської області.

Все поголів'я дослідженої дикої птиці у Слав'яносербському районі мало антитіла до цього вірусу.

Найбільший рівень антитіл до аденовірусу спостерігали серед свійської птиці у Біловодському районі Луганської області. Важливо зауважити, що високий рівень антитіл до аденовірусу ( $3,6 \log_2$ ) відмічено з-поміж синантропної птиці на території промислових птахогосподарств Краснодонського району, ВАТ "Агроукрптаха" та ВАТ "Сімейкінське". Аналогічна ситуація спостерігалася також серед синантропної птиці на території ВАТ "Червоний прапор" Перевальського району та СТОВ "Авіс" Лутугінського району Луганської області, в яких антитіла до цього вірусу реєстрували на рівні  $3,0 \log_2$ .

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Волосянко Е.В., Герман В.В.* Изучение распространения аденовирусной инфекции птиц первого серотипа в птицеводческих хозяйствах. // Республиканский межвед. темат. науч. сборник. Ветеринария. – К., 1990. – Вып. 65. – С.6-9.
2. *Панікар І.І., Скибицький В.Г., Калініна О.С.*

Серед дикої птиці антитіла до визначеного вірусу в титрі  $3 \log_2$  реєстрували у Станично-Луганському, Марківському та Попаснянському районах Луганської області.

Таким чином, антитіла до аденовірусу першого серотипу у синантропної птиці реєструвалися на рівні від  $2,0$  до  $3,6 \log_2$ , у дикої птиці – від  $1,0$ – $3,0 \log_2$ . Найбільший рівень антитіл відмічено у свійської птиці: від  $1,5$  до  $4,0 \log_2$ .

#### Висновки.

1. Результати досліджу свідчать про те, що антитіла до аденовірусу першого серотипу виявлено у всіх видів досліджуваних птахів.
2. Найбільший рівень антитіл до аденовірусу першого серотипу ( $4,0 \log_2$ ) встановлено серед свійської птиці.
3. Антитіла до аденовірусу 1 серотипу в максимальній кількості у дикої птиці виявлено на рівні  $3 \log_2$ , у синантропної – на рівні  $3,6 \log_2$ .

Практикум з ветеринарної вірусології. – Суми: Вид-во „Козацький вал”, 1997. – С.85-116.  
3. *Casnocha E., Lietava P.* Dynamics of maternal and post-infection adenovirus antibodies in fowl // Vet Med (Praha). – 1980. – Vol.25. – №5. – P.277-284.



УДК 619:616.98.001.5:578.831:616-078/.079.4:636.5

© 2008

*Пархоменко Л.І., кандидат ветеринарних наук,  
Ховяков Ю.О., аспірант\*,*

Луганський національний аграрний університет

## СТАБІЛІЗАЦІЯ ТА ВИЯВЛЕННЯ ПТАШИНОГО МЕТАПНЕВМОВІРУСУ В ПОЛЬОВИХ МАТЕРІАЛАХ

### Постановка проблеми.

Епізоотична ситуація з пташиної метапневмовірусної інфекції в Україні не вивчена у зв'язку з тим, що не було виділено збудника і немає діагностичних систем для індикації, хоча проводиться вакцинопрофілактика. Виділення збудника ускладнюється дуже високою лабільністю віріонів, тому матеріал слід якнайшвидше використовувати для ізоляції.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Клінічний прояв метапневмовірусної інфекції, за даними J.K.A. Cook, в індиків проявляється важкою респіраторною інфекцією (ринотрахеїт індиків), а в індичок – також погіршенням яйценосності та якості ячної шкаралупи; у курей захворювання характеризується легкою респіраторною інфекцією, зниженням яйценосності та синдромом набряклої голови: набряком тканин голови, опістотонусом і пригніченням (3, 5). Вказані ознаки властиві багатьом респіраторним захворюванням, у тому числі вірусним, тому слід диференціювати метапневмовірусну інфекцію, використовуючи засоби, що дають змогу визначити специфічність збудника, спираючись на дані про відсутність гемаглютинації та можливість індикації вірусу серологічними методами.

За даними багатьох авторів, виділення пташиного метапневмовірусу не завжди успішне, що пов'язано з високою лабільністю пневмовірусів і коротким терміном перебування в організмі зараженої птиці після початку інфекції. Тому стабілізація біологічної активності метапневмовірусів залишається актуальною (1, 3).

Для ізоляції пневмовірусів всіх видів тварин, вказує К. Прингл, що слід проводити змиви з поверхні слизових оболонок дихальних шляхів, використовуючи в якості середовища для проведення змивів і транспортування ексудатів склад-

*Проведено клінічне дослідження та відбір патологічного матеріалу від домашньої птиці приватних господарств Луганської області з використанням стабілізуючого середовища з ефективною комбінацією антибіотиків. Встановлена наявність пташиного метапневмовірусу.*

не буферне середовище з білковим стабілізатором, зберігати матеріали за температури танучого льоду і якнайшвидше проводити лабораторні дослідження (2). Для деконтамінації

отриманих матеріалів від супутньої мікрофлори J.K.A. Cook рекомендує додавати до середовища для змивів антибіотики: 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (4). Однак вказана комбінація неефективна проти грибків. Найефективніше звільняти матеріали від супутньої мікрофлори шляхом ультрафільтрації, хоча це може призвести до адсорбції вірусу на фільтрувальних мембранах і зниження титру. Тому окремим завданням є підбір оптимального й ефективного складу антибіотиків, що діє проти супутньої мікрофлори дихальних шляхів, дозволяючи скоротити час на проведення бактеріологічних досліджень матеріалу.

**Метою наших досліджень** було вивчення епізоотичної ситуації щодо метапневмовірусної інфекції у сприйнятливих видів невакцинованої птиці приватного сектора різних регіонів Луганської області та підбір середовища з оптимальним складом для проведення назофарингеальних і трахеальних змивів.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили в приватних господарствах Луганської області, в яких вирощують птицю (курей та індиків), невакциновану проти пташиного метапневмовірусу. Всього обстежили шість господарств: три – в м. Луганську, два – в м. Красний Луч, одне – в с. Попівка Краснодонського району. Обстежено 29 голів курей та 7 голів індиків, із них 20,7% курей було обстежено в літній період, інша птиця – в осінньо-зимовий період (листопад-грудень).

Птицю досліджували клінічно на наявність специфічних для метапневмовірусної інфекції ознак, використовуючи шкалу оцінювання, запропоновану М. Van Look та ін. (6) й

*Керівник – кандидат ветеринарних наук, професор Л.І. Пархоменко.*

модифіковану нами для зручності, враховуючи за 1 бал субклінічне протікання інфекції: 0 = клінічно здорова птиця; 1 = спад яйценосності, катар дихальних шляхів та кон'юнктиви (без ексудатції); 2 = носові виділення; 3 = двосторонні носові виділення (каламутний ексудат) та запалення синусів; 4 = діспное. За результатами обстеження стада виводиться середній бал.

Під час обстеження від хворої та клінічно здорової птиці відбирали стерильним тампоном назофарингеальні та трахеальні змиви в стерильне середовище, склад якого підбирали емпірично. Одержані змиви зберігали при +4°C до початку дослідження. В якості середовищ для змивів використовували фізіологічний розчин і стабілізуюче середовище наступного складу: 0,218 г калію фосфорнокислого 1-заміщеного, 0,86 г натрію фосфорнокислого 2-заміщеного 12-водного, 1,8 г хлориду натрію, 1 г желатини харчової, води дистильованої до 200 см<sup>3</sup>, рН=7,0, яке стерилізували автоклавуванням. Ми використовували стабілізаційне середовище без антибіотиків і з різними їх комбінаціями, які додавали до стерильного середовища перед проведенням дослідів (табл. 1).

У лабораторії отримані змиви об'єднували в досліджувані матеріали; одержані матеріали зберігали в холодильнику при +4°C на весь період дослідження. Матеріали досліджували бактеріологічними (посіви на МПБ і МПА; в разі позитивного бактеріального контролю до них додавали

використану до цього кількість бактеріостатичних антибіотиків) та вірусологічними методами: проводили РГА з 1% суспензією еритроцитів півня за стандартною методикою (для виключення гемаглютинуючих збудників) та інфікували кожним матеріалом по 6 тест-об'єктів культури клітин фіброblastів ембріонів курей (ФЕК) та 6-добових курячих ембріонів (КЕ) в жовтковий мішок (культивували 8 діб). Згідно з літературними джерелами, пташиний метапневмовірус у культурі клітин характеризується симпластотворенням, а у курячих зародках викликає крововиливи і летальність.

Для підтвердження наявності антигену пташиного метапневмовірусу в досліджуваних матеріалах та матеріалах, отриманих після інфікування тест-об'єктів, проводили детекцію антигену в РДП із гіперімунною сироваткою кроля. Контроль специфічності проводили за допомогою нормальної сироватки кроля та вакцинного штаму пташиного метапневмовірусу BUT1 #8544.

**Результати досліджень.** За результатами дослідження було встановлено: відсутність у індиків будь-яких ознак респіраторних хвороб, наявність у трьох господарствах у 82,6% курей помірного респіраторного захворювання птиці (від 1 до 2,2 балів) із наступними субклінічними і клінічними проявами: у 45% – спад яйцекладіння, у 45% – гіперемії видимих слизових оболонок дихальних шляхів, у 17% – носові витікання, у 10% –

**1. Результати обстеження приватних господарств Луганської області на респіраторні захворювання та використані середовища для змивів**

Господарство, в якому досліджували птицю	Вид птиці	п, голів	Виразеність клінічних ознак, балів	Використане середовище для змивів	Бактеріологічне дослідження отриманих матеріалів	Дослідження отриманих матеріалів в РГА
Луганськ-1	кури	3	0	фізіологічний розчин <sup>1)</sup>	МПБ – помутніння МПА – кремові колонії	н/п
Луганськ-2	кури	3	0	те ж	те ж	н/п
с. Попівка	кури	5	1	стабілізаційне середовище <sup>2)</sup>	н/п	негативно
с. Попівка	індики	7	0	те ж	н/п	негативно
Луганськ-3	кури	5	2,2	стабілізаційне середовище <sup>3)</sup>	МПБ – помутніння МПА – кремові колонії	негативно
Красний Луч-1	кури	5	0	стабілізаційне середовище <sup>4)</sup>	негативно	негативно
Красний Луч-2	кури	8	1,5	те ж	негативно	негативно

*Примітка:* 1) з додаванням 100 ОД/см<sup>3</sup> бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг/см<sup>3</sup> стрептоміцину сульфату; 2) деконтамінація методом ультрафільтрації через фільтр Steriflip 0,2 μm; 3) з додаванням 1000 ОД/см<sup>3</sup> бензилпеніциліну натрієвої солі, 1000 мкг/см<sup>3</sup> стрептоміцину сульфату та 40 ОД/см<sup>3</sup> ністатину; 4) з додаванням 1000 ОД/см<sup>3</sup> бензилпеніциліну натрієвої солі, 1000 мкг/см<sup>3</sup> стрептоміцину сульфату, 40 ОД/см<sup>3</sup> ністатину та 250 мкг/см<sup>3</sup> гентаміцину сульфату, н/п – не проводилось.

порушення дихання, в 3% – пригнічення (рис. 1, табл. 1). Також у с. Попівка Краснодонського району встановлено, що індики і кури знаходяться в тісному контакті, що може призводити до переінфікування.

Стабілізуюче середовище з комбінацією 1000 ОД/см<sup>3</sup> бензилпеніциліну натрієвої солі, 1000 мкг/см<sup>3</sup> стрептоміцину сульфату, 40 ОД/см<sup>3</sup> ністатину та 250 мкг/см<sup>3</sup> гентаміцину сульфату мало кращі бактеріостатичні властивості для супутньої мікрофлори дихальних шляхів, виявлених за допомогою бактеріологічних методів (табл. 1) і не мало гемаглютинуючих властивостей при контролі його в РГА.

За результатами РГА, не виявлено гемаглютинації в матеріалах змивів, що вказує на відсутність інших гемаглютинуючих респіраторних вірусів.

Після інфікування чутливих тест-об'єктів спостерігали патологічні зміни (табл. 2), відсутні в інтактному контролі. У процесі інфікування курячих ембріонів матеріалами, отриманими в господарствах Луганськ-1 і Луганськ-2, встановлено 100% загибель від грибової контамінації (ріст грибкових колоній у порожнині яйця), що надалі визначило використання нами в складі стабілізуючого середовища протигрибкового антибіотика ністатину в оптимальній концентрації.

Для культури клітин ФЕК після інфікування матеріалами з господарств в с. Попівка (індики і кури) та в м. Красний Луч-2 були характерні деградація моношару і формування агрегатів клітин, оточених пустотами після трьох діб після інфікування (рис. 2 а, б).

Найбільшу кількість уражень у курячих ембріонів встановлено при інфікуванні матеріалом, отриманим від індиків с. Попівка, а найменшу –

отриманим від курей у цьому ж селі. Це свідчить про неоднакову біологічну дію збудника, отриманого від різних хазяїв в одному вогнищі. Найбільший відсоток уражень (100%) склали гіперемія печінки і нирок у курячих ембріонах, заражених матеріалом, отриманим від індиків с. Попівка. Інші матеріали давали поодинокі випадки прояву патологічної картини. Специфічної картини, описаної для пташиного метапневмовірусу, не спостерігали.

За результатами проведення детекції в РДП встановлено наявність чітких ліній преципітації між матеріалами змивів, отриманих у с. Попівка, та гіперімунною сироваткою, які вважали за позитивний результат. При встановленні специфічності ці позитивні матеріали не давали ліній преципітації з контрольною сироваткою, а зі специфічним антигеном проти гіперімунної сироватки утворювали неперервну лінію преципітації (рис. 2). Інші матеріали змивів та чисте стабілізуюче середовище не давали позитивних результатів.

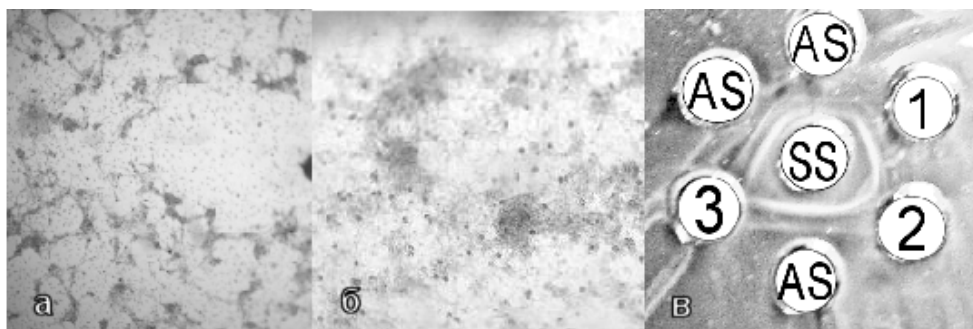


**Рис. 1. Клінічний прояв респіраторного захворювання при обстеженні птиці в приватному господарстві м. Луганська:**  
а) носові виділення; б) пригнічення.

**2. Результати інфікування чутливих тест-об'єктів польовими матеріалами (n=6)**

Господарство, з якого отримали матеріал	Формування клітинних агрегатів на ФЕК, %	Загибель ембріону, %	Крововиливи на тілі, %	Урати в екстраембріональній рідині, %	Гіперемія ХАО, %	Набряк ХАО, %	Гіперемія жовткового мішка, %	Дистрофія серця, %	Гіперемія печінки, %	Гіперемія нирок, %
Луганськ-1	н/п	100*	-	-	-	-	-	-	-	-
Луганськ-2	н/п	100*	-	-	-	-	-	-	-	-
с. Попівка, індики	100	0	0	33,3	33,3	66,7	33,3	66,7	100	100
с. Попівка, кури	100	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Луганськ-3	0	33,3	0	33,3	0	0	33,3	0	33,3	33,3
Красний Луч-1	0	66,7**	0	0	0	33,3	0	0	0	0
Красний Луч-2	100	66,7**	0	0	0	33,3	33,3	0	0	0

Примітка: н/п – не проводили; \* – ембріони пали від грибової контамінації; \*\* – неспецифічна асептична загибель.



**Рис. 2.** а) культура клітин ФЕК, заражена вірусом вірусом змивів, отриманих від індиків в с. Попівка: деструкція моношару та утворення клітинних агломератів; б) культура клітин ФЕК – контроль; в) утворення позитивними матеріалами, отриманими в приватному господарстві в с. Попівка від курей (1) та індиків (2) зі специфічним антигеном (AS) проти гіперімунної сироватки (SS) неперервної лінії преципітації, відсутньої в контрольному зразку (3).

При детекції в РДП матеріалів, отриманих після інфікування, встановили наявність антигену пташиного метапневмовірусу в суспензії жовткових мішків курячих ембріонів, інфікованих матеріалами змивів із господарств у с. Попівка та м. Красний Луч-2. Культуральна рідина ФЕК не мала детектабельної кількості антигену пташиного метапневмовірусу після шести діб культивування.

#### Висновки.

1. За результатами епізоотологічного обстеження приватних господарств Луганської області встановлено, що в трьох господарствах виявлені субклінічні й клінічні (від 1 до 2,2 балів) прояви респіраторних хвороб птиці у 100% курей в осінньо-зимовий період. За результатами РГА не виявлено гемаглютинації в змивах.

2. Використання стабілізуючого середовища для проведення змивів із комбінацією 1000 ОД/см<sup>3</sup> бензилпеніциліну натрієвої солі, 1000 мкг/см<sup>3</sup> стрептоміцину сульфату, 40 ОД/см<sup>3</sup> ністатину та 250 мкг/см<sup>3</sup> гентаміцину сульфату дозволяє зберегти пташиний метапневмовірус у

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Букринская А.Г. Вирусология. – М.: Медицина, 1986. – С.271-274.
2. Вирусология. Методы: Пер. с англ. /Под ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – С.131-159.
3. Соок J. K. A. Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens //The Veterinary Journal 2000, 160. – P.118-125.
4. Cook, Jane K. A. and Cavanagh, Dave (2002) Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses) //Avian Pathology, 31:2. – P.117-132.
5. Ganapathy K. Richard Charles Jones. Vaccina-

tion of Chicks with Live Attenuated Subtype B Avian Metapneumovirus Vaccines: Protection Against Challenge and Immune Responses Can Be Unrelated to Vaccine Dose. //AVIAN DISEASES 51:733–737, 2007.

3. Після інфікування культури клітин ФЕК матеріалами, отриманими в приватних господарствах в с. Попівка та м. Красний Луч-2, встановлено формування агрегатів клітин, характерне для метапневмовірусу.

4. За результатами інфікування курячих ембріонів отриманими матеріалами змивів встановлено такі патологічні зміни: асептичну загибель, каламутність екстраембріональних рідин, гіперемію та набряк ХАО, гіперемію жовткового мішка, дистрофію серця, гіперемію серця і нирок, які були відсутні в інтактних курячих ембріонах.

При використанні детекції в РДП встановлено наявність специфічного антигену пташиного метапневмовірусу в матеріалах змивів, отриманих у с. Попівка та в суспензії жовткових мішків курячих ембріонів, заражених матеріалами змивів, отриманих у приватних господарствах с. Попівка та в м. Красний Луч-2.

6. Van Loock M., K. Loots, S. Van de Zande, M. Van Heerden, H. Nauwynck, B.M. Goddeeris, D. Van ompay. Pathogenic interactions between Chlamydia psittaci and avian pneumovirus infections in turkeys. //Veterinary Microbiology 112 (2006). – P.53-63.

*Нестерова Л.Ю., пошукач\*,  
Пащенко О.О., кандидат ветеринарних наук,  
Аль Равашдех М., аспірант\*,  
Луганський національний аграрний університет*

## БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

### Постановка проблеми.

Не зважаючи на те, що епізоотична ситуація щодо ІБК як у світі, так і в Україні взагалі стабільна, викликає тривогу виникнення спалахів хвороби, що наносить великі економічні збитки птахівництву (10). Вірус інфекційного бронхіту курей (ВІБК) разом із коронавірусом індиків і фазанів відноситься до 3-ї групи роду *Coronavirus* і родини *Coronaviridae* (4). Здебільшого вірус викликає респіраторне захворювання й зниження яєчної продуктивності, проте окремі штами також спричиняють нефрити (9).

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** У зв'язку з антигенним і біологічним різноманіттям штамів ВІБК (6-8) популяція збудника в окремій країні не є постійною. Ізольовані на території України штами ВІБК у переважній більшості мали спорідненість із серотипом Массачусетс і значно рідше зустрічалися штами з серотипу Коннектикут (2). Хоча багато країн застосовують в якості вакцинного загальний антигенний тип, штами ВІБК у межах географічного регіону мають певні молекулярно-генетичні особливості, наприклад, у Європі, США та Австралії. Тому вакцинопрофілактика ІБК не можлива без визначення епізоотичної ситуації в птахогосподарстві та виявлення циркулюючих штамів вірусу (1).

**Мета досліджень** – вивчити біологічні властивості ізолятів вірусу ІБК, виділених від курей у птахогосподарствах Луганської області.

**Методики досліджень.** Для порівняльної оцінки, дослідження ізолятів проводили порівняно до вакцинних штамів ВІБК: Н-120 (жива ліофілі-

*Встановлена циркуляція польових ізолятів ВІБК у птахогосподарствах Луганської області. Серед виділених, ізолят ЛІ-2 є патогенним для КС, курчат, культур клітин ФКС і Vero, чутливий до дії температури 45 °С. За електрофоретичним профілем і гемаглютинуючої активності ізолят ЛІ-2 відрізняється від вакцинних штамів Ма-5, Н-120 и 4/91 ВІБК.*

зована вакцина ТАД ІВ вас І Н120, 5000 доз  $10^{6,0}$  ЕІД<sub>50</sub>, штамп Н-120 серотипу Массачусетс); Ма-5 (жива ліофілізована вакцина Нобіліс® ІВ Ма5, 2500 доз, штамп Ма-5 серотипу Массачусетс); 4/91 (атенуйована вакцина Но-

біліс® ІВ 4/91, штамп 4/91), які вводили в дозі  $10^4$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Вірусовиділення проводили з патологічного матеріалу (нирки, трахеї, яєчники з яйцеводами, легені), відібраного від трупів загиблої та тушок забитої з діагностичною метою птиці, а також КЕ (ХАО, екстраембріональна рідина, нирки, печінка, легені). Патматеріал суспендірували на розчині Хенкса, 15 хв. центрифугували за 2-3 тис. об./хв. Надосадову рідину обробляли бензилпеніциліном-КМП ( $1000$  ОД/см<sup>3</sup>) та стрептоміцином ( $1000$  мкг/см<sup>3</sup>) і витримували 30-60 хв. за кімнатної температури. При негативному результаті бактеріологічного контролю 10% вірусомісною суспензією заражали курячі ембріони (КЕ) 9-11-добової інкубації в дозі  $0,2$  см<sup>3</sup> на хоріоналантоїсну оболонку (ХАО). Інфіковані ембріони інкубували за температури  $37$  °С, вологості повітря 60-70% упродовж п'яти діб. Смертність КЕ в перші 24 год. після інфікування вважали за неспецифічну. Через 96 год. після інфікування КЕ розтинали й оцінювали характерні для ВІБК зміни: карликовість ембріонів, набряк ХАО і амніотичної оболонки, збільшення об'єму екстраембріональної рідини з наявністю уратів, збільшення нирок.

Інфекційну активність ВІБК визначали титруванням на КЕ і культурі клітин Vero, за результатами якого визначали титр відповідно в ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> та ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> за методом Ріда і Менча.

\* Керівник – кандидат ветеринарних наук О.О. Пащенко.

Патогенність ізолятів визначали на курчатах трьохдобового віку, отриманих із безпечних щодо інфекційних хвороб птахогосподарств. Курчат – по 10 голів у кожній групі – інфікували інтраназально в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup> матеріалом, отриманим після пасажів на КЕ. Курчатам контрольної групи вводили 0,2 см<sup>3</sup> фізрозчину. Спостереження за клінічним станом птиці, інфікованої ізолятами, а також серологічний контроль сироваток крові до ВІБК здійснювали впродовж 25-ти діб. Патологоанатомічний розтин курчат проводили через 7 і 25 діб після інфікування.

Визначення патогенності ізолятів ВІБК для культур клітин проводили на фібробластах курячого ембріону (ФКЕ) та клітинах Vero. Вірусний матеріал вносили в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup>, множинність зараження становила 0,1 ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Оцінку морфологічних змін у клітинах проводили щодня безпосереднім спостереженням культури під світловим мікроскопом.

Гемаглютинуючу активність визначали за РГА при температурі 4, 18-22 та 37°C із 1% зависсю еритроцитів півня. За умов отримання негативного результату реакції, до зразків вірусомішучого матеріалу додавали 1% розчин трипсину у співвідношенні 1:1 та інкубували 90 хв. за температури 37°C.

Для концентрації та очищення вірусний матеріал осаджували на 30% сахарозній подушці, розчин якої робили на TSE буфері (25 mM трис-НCl, 100 mM NaCl, 1 mM ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), рН 7,6) із наступним центрифугуванням упродовж 1,5 год. за температури 5 °C та 25 000 об/хв. (76 000 g) (3). Отриманий вірусний осад ресуспендірували у 0,5 см<sup>3</sup> TSE буфері й використовували для електрофорезу.

Горизонтальний електрофорез штамів ВІБК проводили у 2% ПААГ за методикою Cörg A., Postel W. (5). Фіксацію зразків проводили з використанням 20% трис-Cl-оцтової кислоти протягом 20 хв., фарбування – кумассі-бриліантовим синім упродовж 30 хв. Оцінку молекулярної ваги білків здійснювали порівняно до стандарту білків (Cytochrom C, Ferritin, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, BSA).

**Результати досліджень.** З метою виявлення циркуляції збудника ІБК було проведено епізоотологічне обстеження двох промислових птахогосподарств (ВАТ «Сімейкінське» та СТОВ «Авіс») та трьох фермерських господарств Луганської області приватної форми власності з невеликою кількістю птиці.

У СТОВ «Авіс» у курей віком 240-270 діб виявлено зниження яєчної продуктивності на 20,0%, появу 5,0% яєць із деформованою і тонкою шкаралупою. Смертність птиці, що здебільшого зумовлена хворобами репродуктивних органів та органів травлення, становила 13,7% від загальної кількості загиблої птиці. Серед відходів інкубації встановлено 25,0% задохликів, а також карликовість та муміфікація ембріонів. У загиблої птиці реєстрували оваріосальпінгіти, кісти і дистрофії яєчників, жовтковий перитоніт, збільшення нирок та відкладення солей у ниркових каналцях.

Епізоотичним обстеженням курей ВАТ «Сімейкінське» 120-130-добового віку зареєстровано зниження несучості на 15,0% та смертність – на рівні 4,6%, спричинена, здебільшого, хворобами репродуктивних органів (клоацити, дистрофії яєчників), а також порушенням умов утримання та світлового режиму. Крім того, у курей реєстрували збільшення нирок, гіперемію легень. Серед відходів інкубації встановлено наявність 30,0% задохликів, карликовість та приставання ембріонів до підшкаралупної оболонки.

У дрібних фермерських птахогосподарствах, за умов відсутності вакцинопрофілактики ІБК, встановлено низьку яєчну продуктивність (120-180 шт. яєць за рік) та наявність яйця подовженої форми з депігментованою, тонкою шкаралупою у птиці 180-200-добового віку.

З патологічного матеріалу та КЕ, отриманих від птиці, яка належала досліджуваним господарствам, виділено 6 ізолятів (табл. 1).

Виділення та визначення патогенності ізольованих штамів ВІБК проводили на КЕ у порівнянні з патогенною дією вакцинних штамів Н-120 та 4/91 ВІБК.

**1. Ізоляти ВІБК, виділені від птиці з птахогосподарств Луганської області**

Ізоляти	Джерело виділення		Птахогосподарство
ЛІ	кури	яйцеводи, нирки, легені	СТОВ «Авіс» Лутугінського району
ЛІ-2, ЛІ-3, ЛІ-4			ВАТ «Сімейкінське» Краснодонського району
ЛІ-5, ЛІ-6	КЕ	Нирки, легені, ХАО	3 фермерських птахогосподарства Краснодонського району

Ізолят ЛІ-2 із 6 виділених, був найбільш патогенними для КЕ і викликав типові для ВІБК патологоанатомічні зміни (смертність, карликовість, набряк ХАО, збільшення екстраембріональної рідини, наявність уратів в останній, крововиливи на тілі зародка) починаючи з 1-го пасажу впродовж 7 пасажів. Характерною патологоанатомічною зміною КЕ, індукованою ізолятом ЛІ-2, порівняно до вакцинних штамів 4/91 та Н-120 ВІБК, були гіперемія та крововиливи на тілі ембріонів. Титр ізоляту ЛІ-2 після 1-го пасажу становив  $10^{6,26}$  ЕД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Що стосується ізолятів ЛІ, ЛІ-3, ЛІ-4, ЛІ-5 та ЛІ-6, то після 1-го пасажу на КЕ вони викликали незначні (10-30%) патологоанатомічні зміни, а ще через 4 пасажі ізолят ЛІ виявився слабо патогенним, водночас ізоляти ЛІ-3, ЛІ-4, ЛІ-5, ЛІ-6 – апаатогенними для КЕ.

Визначення патогенності виділених ізолятів проводили на невакцинованих 3-добових курчат чутливого віку, сироватка крові яких не містила АТ до ВІБК, яких інфікували інтраназальним методом. Ізолят ЛІ-2 викликав у 100% курчат захворювання через 12 год. після інфікування, що характеризувалося загальним пригніченням, зниженням апетиту і відмовою від води. Через 24 год. після інфікування у курчат відмічали важке дихання, хиткість ходи та водянистий пронос. Розвиток клінічних ознак спостерігали впродовж тижня. Починаючи з третьої доби після введення ізоляту, у 100% заражених курчат виявляли АТ до ВІБК у титрі 1:16. Під час патологоанатомічного розтину курчат, проведеного через сім діб після інфікування ізолятом ЛІ-2, виявлено дегідратацію й нерівномірне забарвлення скелетних м'язів, а також скупчення серозного ексудату в трахеї.

Ізоляти ЛІ, ЛІ-3, ЛІ-4, ЛІ-5 та ЛІ-6 не викликали у курчат захворювання, патологоанатомічних змін внутрішніх органів та появу АТ до ВІБК. За умов дослідження сироваток крові курчат у біопробі ізолятів ЛІ, ЛІ-2, ЛІ-3, ЛІ-4, ЛІ-5 та ЛІ-6 на наявність АТ до вірусів НХ, інфекційного ларинготрахеїту та СЗН отримано негативний результат.

Задля визначення патогенності ізолятів для культур клітин проводили інфікування первинно-трипсинізованої культури клітин ФКЕ та перещеплюваної культури клітин Vero. Встановлено, що ЦПД ізоляту ЛІ-2 у культурі клітин ФКЕ проявилась деструктивними змінами клітинного моношару (розрив моношару, дегенерація клітин) через 36 год. після інфікування, тоді як ізоляти ЛІ, ЛІ-3, ЛІ-4, ЛІ-5 і ЛІ-6 не викликали змін моношару впродовж 2-х пасажів.

Тому для інфікування перещеплюваної культури клітин Vero був обраний ізолят ЛІ-2, патогенну дію якого вивчали в порівнянні з дією вакцинних штамів 4/91 і Н-120 ВІБК упродовж 3-х послідовних пасажів.

ЦПД ізоляту ЛІ-2 на культуру клітин Vero розпочиналася через 96 год. після інокуляції з появи вогнищ дрібнозернистої дегенерації, що проявлялася посиленням переломлюванням світла клітинами, округленням і відторгненням останніх від скла. Подібні зміни клітин індукували появу вакцинного штаму Н-120 ВІБК через 72 год. після інфікування. Водночас, розмноження вакцинного штаму 4/91 ВІБК супроводжувалося виникненням генералізованого ЦПД за типом симпластоутворення через 96 год. після інокуляції. Час появи ЦПД ізоляту ЛІ-2 впродовж 3-х пасажів скоротився вдвічі. Титр виділеного штаму після 3-х пасажів на культурі клітин Vero становив  $10^{5,25}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Узагальнюючи результати індикації та культивування виділених ізолятів на КЕ, первинно-трипсинізованої та перещеплюваної культурах клітин, а також біопроби на курчатах, ізолят ЛІ-2 віднесено до ВІБК і визначено як патогенний, й тому обраний для проведення майбутніх досліджень.

За допомогою РГА визначено, що ізольований штам ЛІ-2, як і вакцинний штам Н-120 ВІБК, володіє гемаглютинуючою активністю до еритроцитів півня за температури 4, 18-22, 37°C. Після ізоляції штам ЛІ-2 ВІБК викликав аглютинацію у титрі 1:16, що нижче за титр штаму Н-120 ВІБК, гемаглютинуючі властивості якого проявилися після обробки трипсином у титрі 1:32. У процесі зберігання впродовж двох років в умовах морозильника (-20°C) гемаглютинуюча активність ізольованого штаму знижувалася до повної втрати.

Прогріванням за температури 45 °C упродовж 90 хв. встановлена чутливість ізоляту ЛІ-2, подібно до вакцинного штаму Ма-5 ВІБК.

У результаті дії температурного фактору, інфекційна активність ізоляту ЛІ-2 знизилася з  $10^{6,23}$  до  $10^{2,23}$  ЕД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, штаму Ма-5 – з  $10^{7,33}$  ЕД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> до повної інактивації.

Електрофоретичними дослідженнями ізоляту ЛІ-2 – у порівнянні з вакцинними штамми Н-120, Ма-5 і 4/91 ВІБК – встановлено відмінності в складі їх білкових компонентів. За результатами електрофорезу ізоляту ЛІ-2 ВІБК виявлені білки з молекулярною масою від 25,1-77,0 кДа, тоді як молекулярна маса основних структурних білків вакцинних штамів Н-120, Ма-5 і 4/91

ВІБК становила 14,5-155,0 кДа. Встановлено, що саме білки з молекулярною масою 25,1 та 28,8 кДа є характерними для всіх досліджуваних штамів ВІБК, окрім вакцинного 4/91, тоді як, притаманним лише для ізоляту була білкова фракція з молекулярною масою 67,0 кДа. Схожість між вакцинним штамом 4/91 та ізолятом ЛІ-2 встановлено за наявності білка масою 77,0 кДа.

#### Висновки.

1. Ізолят ЛІ-2, патогенний для КЕ, курчат та первинно-трипсинізованої й перещеплюваної культур клітин, виділений від курей із птахогосподарства Луганської області, відрізняється від вакцинних штамів Ма-5, Н-120 та 4/91 за електрофоретичним профілем і гемаглютинуючою активністю.

2. Ізолят ЛІ спричиняє смертність, карликовість, набряк ХАО, збільшення об'єму екстраембріональної рідини з наявністю уратів, гіперемію, крововиливи на тілі КЕ 9-11-добової інкубації, захворювання 100% курчат у біопробі, а

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Іммуно-епізоотологічний моніторинг найбільш небезпечних та маловивчених вірусних хвороб птиці (грипу, ньюкаслської хвороби, ІВХ, ІБК, ІТС, вірусного ентериту гусей) / В.І. Сікачина, Л.С. Короленко, Г.А. Мартиненко та ін. // *Вет. медицина України*. – 2006. – № 10. – С. 9-13.
2. *Снасов А.М.* Серологічний моніторинг інфекційного бронхіту курей в птахогосподарствах України та вивчення біологічних властивостей польового ізоляту вірусу // *Вет. медицина. Міжвідом. темат. наук. зб.* – X., 2002. – С. 560-563.
3. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих – М.: Изд-во «Мир». – 1975. – С. 301-305.
4. *Cavanagh D.* Commentary. A nomenclature for avian coronavirus and the question of species status // *Avian Pathology*. – 2001. – Vol. 30. – P. 109-115.
5. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins / A. Cörg, W. Postel, J. Weser, H.W. Schwara at all // *Sci. tool*. – 1985. – Vol. 32, № 1. – P. 5-9.

також дегенеративні зміни моношару культури клітин ФКЕ і Vero (подібно до вакцинного штаму Н-120 ВІБК). Інфекційна активність ізоляту в КЕ становить  $10^{6,26}$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, у культурі клітин Vero –  $10^{5,25}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

3. Ізолят ЛІ-2 ( $10^{6,23}$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) на відміну від вакцинного штаму Ма-5 ВІБК ( $10^{7,33}$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), є більш терморезистентним до температури 45°C упродовж 90 год., під впливом якої інфекційна активність штамів знижувалася, відповідно, на  $10^4$  і  $10^{7,33}$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

4. Встановлена відмінність за гемаглютинуючою активністю ізоляту ЛІ-2 (титр без обробки трипсином 1:16) від вакцинного штаму Н-120 ВІБК, який викликав гемаглютинацію після обробки розчином трипсину у титрі 1:32.

5. За електрофоретичним профілем характерною білковою фракцією як для ізоляту ЛІ-2, так і для вакцинних штамів є фракція з молекулярною масою 25,1 кДа, що відповідає внутрішньому мембранному білку (М) та матричному глікопротеїну (Е1) ВІБК.

6. *Ignjatovic J., Sapats S.* Avian infectious bronchi is virus // *Rev. Sci. Tech.* – 2000. – Vol. 19, № 2. – P. 493-508.
7. Isolation and characterization of a novel antigenic subtype of infectious bronchitis virus serotype DEO 072 / S.P. Mondal, B. Lucio-Martinez, S.A. Naqi // *Avian Dis.* – 2001. – Vol. 45, № 4. – P. 1054-1059.
8. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains / J. Ignjatovic, G. Gould, S. Sapats // *Arch. Virol.* – 2006. – Vol. 151, № 8. – P. 1567-1585.
9. *Matthijs M.R.J., van Eck J.H.H., Landman W.J.M.* Ability of Massachusetts-type infection bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus // *Avian Pathology*. – 2003. – Vol. 32. – P. 473-481.
10. *McIartney E.* Infectious bronchitis update // *Egg. Ind.* – 1989. – Vol. 95, № 8. – P. 12, 14, 16.



УДК 619:616.98:578.824.11:616-036.22

© 2008

*Полупан І.М., науковий співробітник,*  
Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ

## ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМУ ВІРУСУ СКАЗУ САЙРАБ

### Постановка проблеми.

Сказ займає виключно важливе місце в інфекційній патології людини і тварин. Висока сприйнятливість до збудника даної інфекції всіх видів домашніх і диких тварин і значна небезпека для людини, визначають її соціальне та економічне значення, привертаючи увагу представників сучасної науки і практики.

У процесі розробки технології виготовлення ефективних живих та інактивованих вакцин проти сказу важливою умовою є відбір високоімуногенних і нешкідливих штамів вірусу. Вибір вакцинного штаму вірусу сказу і способу його культивування – визначальні фактори отримання безпечних і високоефективних антирабічних вакцин.

### Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.

Нині біологічною промисловістю у процесі виробництва антирабічних препаратів використовуються різні штами вірусу сказу, а саме: Paris Pasteur, Kelev, SAD, ERA, Flury HEP і LEP, Pitman-Moog, Щолково-51, Внуково-32, ТС-80, РБ-71 та інші (2). Однак, не дивлячись на наявність уже існуючих штамів, Комітет експертів ВООЗ зі сказу в своїх доповідях рекомендує постійно проводити відбір нових штамів вірусу сказу для виробництва антирабічних вакцин (3).

**Мета досліджень та методика їх проведення.** Враховуючи вищезгадане, метою досліджень було отримання нового штаму вірусу сказу та вивчення його імунобіологічних властивостей.

**Матеріали і методи.** *Вірус:* у роботі використовували фіксований штам вірусу сказу Щолково-51 К (одержаний в ІВМ УААН та задепонований в Депозитарії ДНКІБШМ), адаптований до культури клітин ВНК-21 і тест-штам вірусу сказу CVS. *Культура клітин:* у роботі використовувалися перещеплювані лінії культури клітин нирки сірійського хом'яка (ВНК-21), нирки зеленої африканської мартишки (Vero), сублінії нирки сайги (НС) та тестикул поросяти (ПТП). Культивування ліній культур клітин та вірусу сказу проводили в стаціонарному пристінковому мо-

*Наведені дані з адаптації та культивування вакцинного штаму вірусу сказу "Щолково-51 К" в культурі клітин нирки сайги та отримання нового штаму вірусу сказу Сайраб, а також результати дослідів із вивчення його імунобіологічних властивостей in vitro та in vivo.*

ношарі. Використовували середовище 199 та Ігла (MEM) із додаванням 5-7% сироватки крові ВРХ (при культивуванні культури клітин Vero використовували 5% фетальної

сироватки крові ВРХ). Інкубацію проводили в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> та 95% вологості. *Тварини:* кролі (вагою 3-5 кг) та безпородні білі миші (вагою 9-11 г). *Інфекційну активність* вірусу визначали методом титрування в культурі клітин НС і на безпородних білих мишах масою 9-11 г згідно з методикою (5).

Постановку реакції імунофлуоресценції, виділення вірусу сказу на культурі клітин здійснювали за допомогою метода Webster W.A., Casey G.A. та згідно з методиками, описаними в посібнику з діагностики сказу МЕБ і ВООЗ (4).

**Результати.** У процесі використання різних культурально-клітинних моделей встановлено, що штам вірусу сказу Щолково-51 К репродукується в високих титрах у культурі клітин НС.

Максимальна репродукція вірусу була досягнута в результаті 5-8 послідовних пасажів. На рівні 8-го пасажу в культурі клітин НС його інфекційна активність становила  $6,8 \pm 0,2$  Іг МЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. У культурі клітин ВНК-21 штам Щолково-51 К репродукувався в дещо меншому титрі ( $6,0 \pm 0,3$  Іг ЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). Найменшою чутливістю до вірусу сказу володіли культури клітин ПТП та Vero (табл. 1).

Вивчення адаптаційно-культуральних властивостей показало гетерогенну пермісію перещеплюваних ліній культур клітин до штаму вірусу сказу Щолково-51 К. Результати дослідження показали, що протягом 12 пасажів у культурі клітин НС штам вірусу сказу Щолково-51 К не знижував своєї інфекційної активності й репродукувався у високих титрах – до  $6,8 \pm 0,2$  Іг МЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Отже, вакцинний штам вірусу сказу Щолково-51 К адаптовано до культури клітин НС і показана стабільність його репродукції. Штам Щолково-51 К у культурі клітин НС 8-го пасажу знаходиться на депонуванні як штам вірусу сказу – Сайраб.

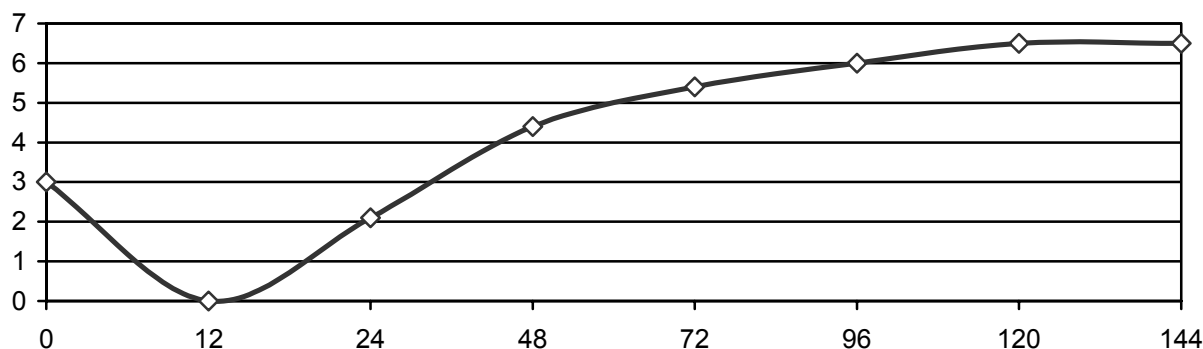
**1. Пасажування штаму вірусу сказу Щолково-51 К у стаціонарному моношарі різних культурально-клітинних моделей**

Вірус	Культура клітин	Титр вірусу ( $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ ) (пасаж)				
		1	3	5	8	12
Щолково-51 К	НС	-	$5,6 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,2$
	ВНК-21	$6,0 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,2$	-	-
	ПТП	н/в	н/в	-	-	-
	Vero	$2,7 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	-	-	-

н/в – не виявлено

**2. Вплив дози зараження та тривалості інкубування культури клітин НС на репродукцію вірусу сказу**

Вірус	Множинність зараження ( $\text{МЛД}_{50}/\text{кл}$ )	Час максимальної репродукції (діб)	Титр вірусу ( $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ )
Сайраб	1,0	3-4	$4,6 \pm 0,3$
	0,1	4-5	$6,8 \pm 0,2$
	0,01	5-6	$6,5 \pm 0,2$
	0,001	6-7	$5,2 \pm 0,3$



**Рис. Динаміка репродукції штаму вірусу сказу Сайраб у культурі клітин НС**

Досліди з вивчення впливу дози зараження на репродукцію вірусу сказу штаму Сайраб показали, що при використанні малої множинності зараження ( $\leq 0,001 \text{ МЛД}_{50}/\text{кл}$ ) відбувається збільшення часу культивування. Використовуючи високу множинність зараження ( $\geq 1,0 \text{ МЛД}_{50}/\text{кл}$ ), можна припустити прояв інтерферуючих властивостей вірусу (репродукції у великій кількості дефектних інтерферуючих частин), у результаті чого може проходити скорочення часу інкубації, а також репродукція вірусу в низьких титрах (1).

Найбільш оптимальною дозою зараження культури клітин НС при культивуванні в стаціонарних умовах була  $0,1-0,01 \text{ МЛД}_{50}/\text{кл}$ . При цій дозі штаму вірусу сказу Сайраб репродукувався в максимальній кількості на 4-5-ту добу в титрі  $6,5-6,8 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ .

Вивчення динаміки репродукції вірусу показало, що наростання титру вірусу проходило в перші 120 годин культивування. Максимальне накопичення вірусу встановлено через 96-120 годин і ста-

новило  $6,2-6,6 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$  (див. рис.).

Проведене порівняння репродукції вірусу сказу в культурі клітин НС при зараженні в суспензії та при зараженні в моношар. Встановлено, що зараження культури клітин НС штамом вірусу сказу Сайраб у суспензії дає можливість отримати вірусмістимий клітинно-культуральний матеріал у дещо вищому титрі, ніж при зараженні в моношар. Так, титр вірусу при зараженні в суспензії склав  $6,8 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ , а при зараженні в моношар –  $6,6 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ . Окрім вищенаведеного, зараження культури клітин у суспензії є більш технологічним способом отримання вірусмістимого матеріалу.

В іншій серії дослідів, використовуючи класичну модель – білі миші, встановлена тривалість інкубаційного періоду і тривалість титрування штаму вірусу сказу Сайраб (табл. 3).

Дані таблиці 3 показують, що миші зберегли 100% чутливість при інтрацеребральному зараженні. Внутрішньом'язове й підшкірне введення

**3. Патогенність штаму вірусу сказу Сайраб для безпородних білих мишей за різних способів введення**

Вірус	Спосіб введення	Інфікуюча доза, lg МЛД <sub>50</sub> /гол	Час прояву клінічних ознак (діб)	Летальність, %
Сайраб	і/ц	2,3	5-6	100
	в/м	3,3	8-18	80
	п/ш	3,3	10-21	60

**4. Патогенність штаму вірусу сказу Сайраб для кролів за різних способів введення**

Вірус	Метод введення	Інфікуюча доза, lg МЛД <sub>50</sub> /гол.	Інкубаційний період (діб)	Летальність, %
Сайраб	і/ц	5,0	4-5	50
	в/м	6,0	-	0
	п/ш	6,0	-	0

**5. Напруженість імунітету у вакцинованих кролів при зараженні тест-штамом вірусу сказу CVS**

Група	Кількість тварин	Доза, lg МЛД <sub>50</sub> /гол	Загибель тварин	
			гол.	%
Тварини, імунізовані штамом Сайраб	8	4,0	0	0
Контрольна	3	4,0	3	100

вірусвмістимого матеріалу штаму Сайраб показало деяке зниження патогенності (на 20-40%). Інкубаційний період становив у середньому 5 діб, а тривалість титрування – до 14 діб.

Нейропатогенні властивості штаму вірусу сказу Сайраб вивчали на кролях. Були сформовані три групи тварин по 4 кролі в кожній. Тваринам інтрацеребрально вводили культуральний вірусвмістимий матеріал у дозі 5,0 lg МЛД<sub>50</sub>/гол; внутрішньом'язово та підшкірно вводили вірус в інфікуючій дозі 6,0 lg МЛД<sub>50</sub>/гол (табл. 4).

Заражаючи кролів внутрішньом'язово та підшкірно, специфічних клінічних проявів захворювання не виявлено, – тварини залишалися клінічно здоровими протягом усього терміну спостереження (60 днів). Із чотирьох кролів, заражених інтрацеребрально, два захворіли на 4-ту і 5-ту добу спостереження. Тривалість захворювання становила 3-4 доби, з характерними ознаками паралітичної форми перебігу сказу.

Важливою імунобіологічною властивістю фіксованих штамів вірусу сказу є імуногенність.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Лантева О.Г. Усовершенствование технологии изготовления инактивированной вакцины против бешенства // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Покров., 2003. – 26 с.
2. Недосеков В.В. Современные вакцины против бешенства животных. // Ветеринария. – 2003. – № 8. – С. 23-25.
3. Expert Committee on Biological Standardization.

Цей показник штаму Сайраб вивчали в гострому досліді на кролях (табл. 5).

На 60-ту добу після вакцинації штамом Сайраб (внутрішньом'язово в дозі 5,0 lg МЛД<sub>50</sub>/гол.) 100% тварин у дослідній групі були стійкими проти інтрацеребрального зараження тест-штамом вірусу сказу CVS у дозі 4,0 lg МЛД<sub>50</sub>/гол. У контрольній групі, за аналогічної інфікуючої дози, всі тварини (3 голови) загинули, маючи характерні клінічні ознаки паралітичної форми сказу, що підтверджено прямою люмінесцентною мікроскопією мазків-відбитків, отриманих від загиблих тварин.

**Висновки.** 1. Внаслідок адаптації вакцинного штаму вірусу сказу "Щолково-51 К" до технологічно-ліквідної та пермісивно-продуктивної культури клітин нирки сайги отримано новий штам вірусу сказу Сайраб.

2. Показана стабільність імунобіологічних властивостей штаму вірусу сказу Сайраб у досліді in vitro та in vivo.

4. Technical Report Series 924 // WHO. – 2005. – 143 p.
4. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 5<sup>th</sup> ed. – OIE. – 2004.
5. Webster W.A., Casey G.A.. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. Laboratory techniques in Rabies Fourth edition. Ed. Meslin, M. Kaplan, A. Koprowski. – WHO. – 1996. – P. 96-103.

УДК 619:616-022.912:616-08:579.864:636.8

© 2008

*Руденко П.А., кандидат ветеринарних наук,  
Луганський національний аграрний університет*

## ПОШУК ПЕРСПЕКТИВНИХ ШТАМІВ ПРОБІОТИКІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГНІЙНИХ РАН У КОТІВ

### Постановка проблеми.

Однією з важливіших проблем сучасної ветеринарної хірургії є ранова інфекція, що виникає при різноманітних відкритих ушкодженнях внаслідок проникнення в тканини умовно патогенної мікрофлори. Слід зауважити, що гнійні ранові ускладнення у тварин викликаються не одним якимось збудником, а природно створеною симбіотичною асоціацією умовно патогенних мікроорганізмів (2, 5-6).

Не зважаючи на створення все нових поколінь антибактерійних засобів і постійного вдосконалення асептики й антисептики, кількість ускладнених гнійною інфекцією ран не лише не зменшується, а навпаки, збільшується. Це пов'язано – особливо в останній час – із труднощами вибору антибактерійного засобу, який би діяв на всіх співчленів паразитоценозу гнійної рани.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми.** Все актуальнішою є проблема бактеріального забруднення ран, яке виникає внаслідок зниження терапевтичної ефективності традиційних лікарських засобів. Пов'язано це, передусім, із неконтрольним та безсистемним використанням ветеринарними спеціалістами при різноманітних патологіях у тварин антибактеріальних препаратів. Це, в свою чергу, призвело до підвищення стійкості збудників хірургічної інфекції до них, зростання патогенності і вірулентності у мікроорганізмів, виникненню нових мутаційних форм бактерій, а також колонізації окремими представниками умовно патогенних агентів екологічних ніш організму не характерних для їх існування (3-4).

Саме це спонукає до більш ефективної боротьби з ініціаторами септичних ранових ускладнень у тварин і організації пошуку нових, більш ефективних методів і засобів.

Антагоністична активність представників мажорної мікрофлори (лактобактерії, біфідобактерії) – один із факторів, який визначає їх захисну для макроорганізму функцію. Поняття «антагоністична активність» – дуже містке, воно включає в себе високу швидкість розмноження, більш

*Наводяться дані стосовно пошуку перспективних штамів молочнокислих бактерій, які мають певну антагоністичну активність щодо збудників хірургічної інфекції у котів.*

широкий набір ферментів, продукцію бактерицидних і бактериостатичних субстанцій.

Загальновідомо, що представники мажорної мікрофлори можуть пригнічувати ріст інших видів мікроорганізмів за рахунок вищого біологічного потенціалу, конкуренції за місця існування шляхом зміни рН середовища і довершеністю адгезивних властивостей, а також завдяки продукції токсичних для бактерій інших видів метаболітів.

В останній час чимало вчених стали надавати увагу створенню біологічних препаратів, виготовлених на основі лакто-, біфідобактерій, які є природними антагоністами більшості умовно патогенної й патогенної мікрофлори. Тому розробка пробіотичних препаратів для лікування гнійних ран у тварин є новим і актуальним напрямом наукових досліджень у ветеринарній хірургії.

**Мета досліджень та методика їх проведення.** Метою для наших досліджень стало вивчення паразитоценозу гнійних ран у котів; визначення чутливості ізолюваної мікрофлори до антибактерійних засобів, а також пошук перспективних штамів мажорної мікрофлори, що мають певні антагоністичні властивості стосовно представників септичних ранових ускладнень.

Дослідження клінічно здорових котів і тварин із випадковими гнійними ранами проводили в умовах клініки кафедри хірургії та хвороб дрібних тварин ЛНАУ. Ізоляцію мікроорганізмів із гнійного ексудату септичних ран, а також із вмісту прямої кишки і біоптату здорової шкіри проводили в лабораторії вивчення факторних інфекцій ЛНАУ.

Для цього з серійних розведень проб вмісту прямої кишки, біоптату здорової шкіри, а також з ексудату гнійних ран проводили висіви у пробірки з МПБ, селенітовим бульйоном, глюкозосироваточним бульйоном, глюкозо-кров'яним агаром, жовтково-сольовим агаром, а також на середовища Ендо, Плоскірева, Сабуро, Блаурока і МРС.

Подальшу ідентифікацію ізолюваних мікро-

організмів за біохімічними властивостями проводили згідно з «Определителем бактерий Берджи».

Після індикації та ідентифікації в ізольованих культур мікроорганізмів визначали чутливість до антибактеріальних препаратів за допомогою паперових дисків: нами було використано 16 антибактерійних препаратів, які широко використовуються нині при лікуванні дрібних тварин.

Для визначення патогенності в ізольованих культур, трьом білим мишам на кожен штам мікроорганізму, вводили внутрішньочеревинно по 1 млрд. мікробних клітин. За лабораторними тваринами спостерігали протягом п'яти діб, після чого проводили евтоназію під ефірним наркозом із подальшим бактеріологічним дослідженням внутрішніх органів.

Антагоністичні властивості мікроорганізмів вивчали на щільних поживних середовищах методом агарових блочків за Єгоровим (1).

Отримані результати досліджень обробляли статистично й подавали у вигляді рисунка і таблиці.

**Результати досліджень.** Для з'ясування мікробного пейзажу гнійних ран у котів нами були проведені бактеріологічні дослідження патологічного ексудату, відібраного з 14 випадкових гнійних ран; у ході чого було ізольовано 51 культуру умовно патогенних бактерій дев'яти видів. Результати бактеріологічних досліджень подані на рисунку.

Із наведених на рисунку даних видно, що гнійні рани у котів викликають асоціації умовно патогенних бактерій. Так, частіше всього з ексудату гнійних ран у котів ми ізолювали *S. aureus* 11 (21,6 %), *E. coli* 10 (19,6 %), *P. aeruginosa* 8 (15,7 %) і *S. uberis* 6 (11,8 %).

Необхідно вказати, що з гнійних ран у котів

нами в жодному випадку не було ізольовано представників нормальної мікрофлори (біфідобактерій та лактобактерій).

За результатами біологічної проби ми з'ясували, що окремі збудники хірургічної інфекції (*E. coli* O8, O18, O26; *S. aureus*; *S. uberis*; *P. aeruginosa*; *P. vulgaris*; *P. mirabilis*) викликали загибель білих мишей.

Визначаючи чутливість ізольованих культур бактерій до антибактерійних препаратів, нами встановлено, що ізольовані патогени були чутливі лише до байтрилу та енрофлоксацину. Це свідчить про те, що найбільшою проблемою в лікуванні септичних ран є вибір лікувального засобу, який би діяв на всіх співчленів паразитоценозу гнійної рани. Саме тому септичні рани у тварин і до сьогодні залишаються актуальною проблемою з-поміж хірургічних патологій, і для більш ефективної боротьби з ними необхідно вести пошук нових методів і засобів.

Одною з найцінніших властивостей пробіотичної мікрофлори є їх антагоністична активність щодо патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів.

У процесі проведення бактеріологічних досліджень біоптату здорової шкіри котів нами були виділені *L. plantarum* №27 і *L. rhamnosus* №26, а з проб вмісту прямої кишки – *L. plantarum* «V» №22, *L. acidophilus* №24, *B. adolescentis* №23 і *B. bifidum* №25.

Після цього ми провели дослідження із визначенням антагоністичної активності, ізольованих із біоптату здорової шкіри і вмісту прямої кишки штамів молочнокислих бактерій стосовно відношення до збудників гнійних ранових ускладнень у котів. Результати проведених досліджень наведені в таблиці.

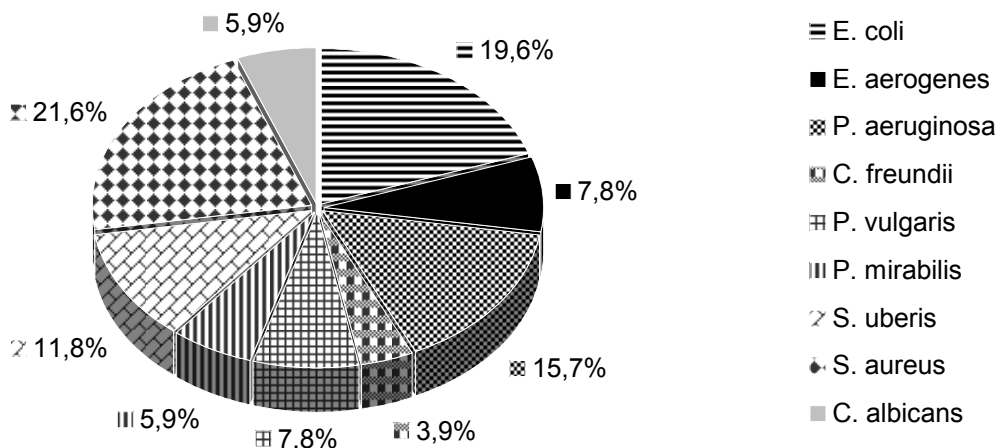


Рис. Результати бактеріологічного дослідження екструдату гнійних ран у котів (n=10)

*Антагоністична активність представників мажорної мікрофлори  
щодо збудників хірургічної інфекції у котів*

Тест-культури	Штами лакто- і біфідо-бактерій	Зона затримки росту, мм					
		L. plantarum №27	L. plantarum «V» №22	L. rhamnosus №26	L. acidophilus №24	B. adolescentis №23	B. bifidum №25
E. coli O1		0	0	0	0	0	0
E. coli O2		0	0	0	0	0	0
E. coli O4		0	0	0	0	0	0
E. coli O8		22	25	32	40	35	25
E. coli O9		0	0	0	0	0	0
E. coli O18		16	20	25	22	18	15
E. coli O22		7	0	5	0	0	0
E. coli O26		15	20	30	35	15	22
E. aerogenes		10	15	30	32	20	25
P. aeruginosa		40	35	35	42	25	30
C. freundii		20	15	18	22	22	18
P. vulgaris		15	12	10	22	25	8
P. mirabilis		5	15	20	25	28	18
S. uberis		7	22	25	20	25	20
S. aureus		15	20	30	20	18	20
C. albicans		12	15	25	20	15	10

*Примітка: до 10 мм – низька; 10-15 мм – середня; понад 15 мм – висока антагоністична активність.*

Дані таблиці свідчать про те, що найбільшою антагоністичною активністю стосовно збудників хірургічної інфекції володіють *L. acidophilus* №24, *L. rhamnosus* №26 і *B. adolescentis* №23.

З часом при вдалому сполученні цих представників мажорної мікрофлори можлива розробка пробіотичного препарату, здатного підвищити ефективність лікування гнійних ран у тварин.

**Висновки.**

1. Гнійні рани у котів виникають внаслідок їх

ускладнення асоціаціями умовно патогенних бактерій. Так, частіше всього з ексудату гнійних ран у котів ми ізолювали *S.aureus* – 11 (21,6%), *E.coli* – 10 (19,6%), *P.aeruginosa* – 8 (15,7%) і *S.uberis* – 6 (11,8%).

2. Встановлено, що найбільшою антагоністичною активністю стосовно збудників хірургічної інфекції у котів мають *L.acidophilus* №24, *L.ramnosus* №26 і *B.adolescentis* №23.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1979. – 455с.  
 2. *Ермолаев В.А., Васильева И.П., Большакова О.Г.* и др. Микробный пейзаж гнойных ран у крупного рогатого скота и чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам // Актуальные проблемы ветеринарной хирургии. – Воронеж. – 1997. – С.68-69.  
 3. *Косенко М., Музыка В., Косенко Ю.* та ін. Рациональне використання антимікробних препаратів як фактор стримування розвитку антибіотикорезистентності // Ветеринарна медицина України. – 2007. - №8. – С.40-41.

4. *Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия. – М.: Медицина, 1982. – 496с.  
 5. *Руденко П.А., Стужук Д.А.* Паразитоценози гнійних ран у котів // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. – Львів. – 2007. – Ч. 1. – Т. 9. - № 2 (33). – С.112-115.  
 6. *Eugster S., Schawalder P., Gaschen F.* A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats // Vet. Surg. – 2004. - №33 (5). – P.42-50.