

На правах рукопису

**ПАРХОМЕНКО
ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА**

***ІМУНОБІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
АВІРЕОВІРУСІВ КУРЕЙ ТА ІНДИКІВ***

16.00.03 - ветеринарна мікробіологія, вірусологія, спізоотологія, мікологія і імунологія

АВТОРЕФЕРАТ



дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Харків - 1997



00750918 (U)

Дисертацією є рукопис. Робота виконана у лабораторії вивчення хвороб птахів Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН.

Науковий керівник - доктор ветеринарних наук, професор, член - кореспондент УААН Герман В'ячеслав Валентинович

Офіційні опоненти Доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник Чечоткіна Наталія Павлівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент Руденко Анатолій Федорович

Провідна організація - Інститут птахівництва Української академії аграрних наук, с.м.т. Борки, Харківської області

Захист дисертації відбудеться 2 "жовтня" 1997 на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 02.32.01 при Інституті експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН, 310023, м.Харків, вул.Пушкінська, 83.

Із дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини - м. Харків, - 23, вул. Пушкінська ,83.

Автореферат розіслано " 30 " травня" 1997 р

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
доктор ветеринарних наук


Конаржевський К.Є.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ

Авіреовірусна інфекція (АРВІ) - висококонтагіозне захворювання молодняку усіх видів сільськогосподарської птиці, характерним для якого є латентно-персистентна форма перебігу.

Захворювання реєструється у більшості країн світу із розвинутим птахівництвом. (Olson H., 1954, Kawamura, 1966, Герман В.В., 1973).

Значні економічні збитки, зумовлені загибеллю птахомолодняка (від 5 до 20 %), затримкою у рості та розвитку (до 40 %), низьким вихідом продукції, збільшенням коштів на проведення загальних та специфічних ветеринарно - санітарних заходів.

Для боротьби та профілактики авіреовірусної інфекції широко застосовують комерційні живі та інактивовані вакцини: Таловак-106 Рео, провентрикулітна вакцина (із штаму СО-8), ТАД Реовак-1 та інші.

Сьогодні в Україні немає біопрепаратів для специфічної профілактики цього захворювання.

У 1972 році вперше на території України Германом В.В. зареєстроване та описане захворювання реовірусної етіології серед індиків.

При цьому статус референтного був наданий штаму СП - 73 АРВ, ізольованому від цього виду птиці із клінічними ознаками ентеро-нефриту.

Широке використання експрес-методу РНГА для діагностики авіреовірусної інфекції із застосуванням еритроцитарного антигену ІЕКВМ (Герман В.В., 1984 р.) показало, що ця інфекція має тенденцію до розповсюдження у птахогосподарствах України (Абдельазіз Ф.А., 1990)

Дані наукової літератури (Giambrone J.J., Solonov, 1988; Герман В.В., 1988; Nersessian B.N., Lucert P.D., 1989; Reikik M.K., Silim A., 1992; Smith J.A., Adair B.M., 1995) свідчать про те, що залишаються маловивченими імунологічні властивості штамів

ДНБ ім. В. Стефанива

АН України

авіреовірусу (АРВ), ізольованих від різних видів птиці. Потребують удосконалення методи підбору чутливих біосистем для адаптації та культивування авіреовірусу, контролю імуногенності штамів, розробки та застосування ефективних біопрепаратів для вакцинації проти АРВІ.

МЕТА ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Провести ізоляцію та порівняльне вивчення штамів, виділених від сільськогосподарської птиці із різних птахогосподарств України.
2. Визначити елементи технології виготовлення інактивованої вакцини проти реовірусної інфекції сільськогосподарської птиці.
3. Випробувати лабораторно-виробничі зразки інактивованої вакцини ІЕКВМ, визначити схеми та дози їх застосування.

ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Провести епізоотологічне дослідження ряду птахогосподарств України.
2. Вивчити біологічні властивості польових ізолятів авіреовірусів, в тій чисельності визначити ступінь антигенної спорідненості ізольованих штамів та референтного - СП-73.
3. Визначити чутливу біосистему, яка забезпечує оптимальну репродукцію АРВ із збереженням його імуногенних властивостей.
4. Провести біологічний контроль Реовакцини-1 та 2, розроблених у ІЕКВМ.
5. Порівняти імуногенні властивості Реовакцини-1 і Реовакцини-2.
6. Відпрацювати схеми вакцинопрофілактики авіреовірусної інфекції із застосуванням Реовакцини-1 та Реовакцини-2 ІЕКВМ.

НАУКОВА НОВИЗНА

Встановлена ідентичність біологічних властивостей чотирьох епізоотичних та референтного штамів авіреовірусу.

Про відсутність наявного антигенного дрейфу штамів авіреовірусу свідчить рівень антигенної спорідненості від 95 до 100 %.

Для репродукції авіреовірусу визначена чутлива біосистема - первинно-трипсинізовані фібробласти курячого ембріону із застосуванням живильного середовища геосгідролізин.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ

1. Використання п.т. ФКЕ у порівнянні із перещеплюваною культурою клітин (ниркою ембріона вівці та Vero) забезпечує репродукцію авіреовірусу шт. СП-73 у титрі не нижче $10^{6,5}$ ТЦД /см³.

2. Розроблена та затверджена нормативно - технічна документація на виготовлення живильного середовища геосгідролізин для культивування культур клітин, особливо п.т. ФКЕ (ТУ 46.15, від 14 березня 1996 року, термін дії 5 років).

3. Вперше рекомендована схема вакцинації курей - несучок вітчизняною інактивованою Реовакциною-2 ІЕКВМ, яка забезпечує 100 %-ний рівень сероконверсії щепленої птиці.

РІВЕНЬ РЕАЛІЗАЦІЇ ТА ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Підтверджено розповсюдження двох економічно значущих захворювань птиці у 7 областях України, рівень яких становить від 20 -30 до 100 % від кількості обстеженої птиці.

Запропоноване нове живильне середовище геосгідролізин ІЕКВМ для культивування п.т. ФКЕ, застосування якого скорочує термін формування моношару у порівнянні зі стандартними живильними середовищами на 10 годин.

Відпрацьовані елементи технологічного регламенту для культивування АРВ (шт. СП-73), які дозволяють отримувати вірусну масу у титрі $10^{6,5}$ ТЦД /см³ на протязі 24 - 30 годин.

Розроблена та затверджена нормативно - технічна документація на виготовлення і застосування живильного середовища геосгідролізин ІЕКВМ.

Розроблена схема вакцинації курей - несучок Реовакциною -2 ІЕКВМ, яка забезпечує 100 % рівень сероконверсії з накопиченням специфічних антитіл у сироватці крові та жовтку яєць у вакцинованої птиці (4,8-4,5 log відповідно).

АПРОБАЦІЯ ТА ПУБЛІКАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали дисертації доповідались та апробовані

- на засіданнях та звітних сесіях Вченої ради ІЕКВМ 1994 - 1996 рр

- 2 Українській конференції з птахівництва 14- 15 травня 1996 р

По темі дисертації опубліковано 9 наукових робіт.

ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА У РОЗРОБКУ НАУКОВИХ РЕЗУЛЬТАТІВ, ЯКІ ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

Особистий внесок дисертанта полягає у самостійному виконанні роботи та аналізі результатів експериментів.

На підставі матеріалів, які були отримані та співставлення їх із даними літератури, дисертантом сформульовані положення, що виносяться на захист.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЯКІ ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

1. Результати епізоотологічного обстеження птахогосподарств, неблагополучних по авіреовірусній інфекції та хворобі Гамборо.
2. Характеристика імунологічних властивостей ізольованих реовірусів та вивчення їх антигенної спорідненості.
3. Вибір чутливої біосистеми для культивування авіреовірусів та виготовлення вакцин для специфічної профілактики реовірусної інфекції птиці.
4. Порівняльна оцінка інактивованих Реовакцин ІЕКВМ проти реовірусної інфекції птиці (Реовакцина-1 та Реовакцина-2).

ОБСЯГ ТА СТРУКТУРА РОБОТИ

Дисертація викладена на 140 сторінках машинописного тексту та містить: загальну характеристику роботи, огляд літератури, особисті дослідження, обговорення результатів, висновки, практичні пропозиції, перелік літературних джерел, додатки.

Робота ілюстрована 35 таблицями, 17 рисунками, 5 фотографіями. Перелік використаної літератури вміщує 210 джерел, із яких 175 іноземних.

ОСОБИСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Робота виконана на протязі 1994- 1996 років у лабораторії вивчення хвороб птиці Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини.

ШТАМИ АРВ

Референтний - СП-73 АРВ (Герман В.В, 1983)

Епізоотичні штами, які були ізольовані при виконанні роботи:

Т-95, К-94, П-95, Р-1 АРВ.

СИРОВАТКИ КРОВІ

Специфічна імунна сироватка до референтного шт. СП-73, яка була одержана при гіперімунізації кіз (2 голови) за розробленою у лабораторії вивчення хвороб птиці методикою (Герман В.В., Абдельазіз Ф.А., 1990)

Сироватки крові від птиці із досліджуваних птахогосподарств та птиці, що знаходилася в експерименті.

БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ

Експериментальні роботи проводили із застосуванням 5000 ембріонів курей, 1000 голів птахомолодняка курей 1- 120-денного віку та 200 голів курей -несучок і півнів; фібробластів ембріонів курей (п.т.ФКЕ), перещеплюваних культур клітин нирки ембріону вівиці /НЕВ / та нирки зеленої макаки / VERO /.

ВІРУСОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ізоляцію АРВ проводили від клінічно- хворої та загиблої птиці, використовуючи середні проби тканин та органів, а також окремі органи. Матеріал до зараження готували загальновідомими у вірусології методами.

Суспензію патологічного матеріалу вводили на ХАО курячого ембріону 11 - денної інкубації. Ембріони після інфікування інкубували при + 37°С чотири доби з кожнодобовою овоскопією, вибирали загиблих, а залишившихся живими охолоджували на протязі 10-12 годин при +4°С, розтинали та досліджували. Кожна проба патологічного матеріалу проходила не менш 3 пасажів.

Титрування вірусу проводили на курячих зародках та п.т. ФКЕ. Титр вірусу обчислювали по Ріду і Менчу (1938) та визначали у ЕІД 50/см³, ТЦД 50/см³, БОО /см³.

Вивчення біологічних властивостей штамів АРВ проводили на курячих зародках 11-денної інкубації, які інфікували вірусним матеріалом у розведенні від 10 до 10⁻¹⁰ в кількості 0,2 см³ на ХАО.

При вивченні патогенності авіреовірусів для курчат 9-денного віку використовували інтраплантарне введення 0,2 см³ матеріалу у стопу. Нагляд за курчатами тривав 15 днів.

Серологічні дослідження проводили на 7 та 14 дні після інфікування за даними РНГА з еритроцитарним діагностиком ІЕКВМ.

Птицю, що знаходилася в досліді, декапітували на 15 день після інфікування, досліджували патологоанатомічно і відбирали проби органів для реізоляції збудників АРВІ.

АДАПТАЦІЯ АРВ ДО ПЕРВИННО - ТРИПСИНІЗОВАНОЇ КУЛЬТУРИ ФКЕ

Первинно-трипсинізовану культуру ФКЕ отримували за методом, який описаний Голубевим Д.Б. та Сомініним А.А. (1976) у " Руководстве по применению клеточных культур в вирусологии", а також Меіші (1988).

Для культивування п.т. ФКЕ вперше випробовували нове живильне

середовище ІЕКВМ - геосгидролізин. У ході досліджень проводили порівняння ростових властивостей цього препарату та стандартних середовищ: 199 та Ігла.

Критеріями порівняльної оцінки були:

- швидкість формування моношару;
- зміна рН живильного середовища;
- термін репродукції авіреовірусу в п.т.ФКЕ, культивованих у різних живильних середовищах
- тип цитопатичної дії вірусу;
- титр вірусу

Мікроскопію п.т. ФКЕ проводили у світловому мікроскопі типу БІ-1. Найбільш характерна ЦПД авіреовірусу в п.т. ФКЕ спостерігається по типу синцитію.

АДАПТУВАННЯ АРВ ДО ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ ЛІНІЙ КЛІТИН

Вивчення чутливості перещеплюваних ліній клітин до АРВ шт. СП-73 проводили із застосуванням культур клітин нирки ембріону вівці (НЕВ) та нирки зеленої макаки (VERO) за методикою Карішевої А.Ф. і Сюріна В.Н., ("Руководство по практической вирусологии", 1980 р.) Для дослідження використовували добову культуру НЕВ та 72 - годинну культуру клітин VERO. Після інфікування проводили контроль за описаною вище методикою на протязі 7 діб.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕПІЗООТИЧНИХ ШТАМІВ АРВ

Ідентифікацію АРВ і ступінь антигенної спорідненості епізootичних штамів АРВ та референтного шт. СП-73 проводили за даними реакції нейтралізації (РН). РН ставили із застосуванням послідовних десятикратних розведень вірусу (10^1 до 10^{10}) у розчині Хенкса.

Для цього готували розведення специфічної та нормальної сироваток 1:10. Вірус і сироватки з'єднували в рівних об'ємах ($0,5\text{см}^3$) та залишали на контакті при $+37^\circ\text{C}$ на 60 хвилин, після чого в пробірки додавали по 1,0 мл підтримуючого середовища (геосгидролізин ІЕКВМ).

За результатами реакції нейтралізації визначали титр вірусу у присутності як нормальної, так і імунної сироваток, який розраховували за методом Ріда та Менча. Позитивною вважали реакцію із індексом нейтралізації (ІН) $2 \log$ та вище.

Антигенну спорідненість штамів АРВ визначали за методом Горбунової А.С. (1953).

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ АРВ

Для проведення електрофорезу в ПААГ були виготовлені такі зразки культуральної вірусної рідини із штамів авіреовірусу:

1. СП-73 (референтний)
2. Т-95, К-94, П-95, Р-1 - епізоотичні

Електрофорез проводили у градієнтному 5-15 % ПААГ. Перед цим визначали у зразках кількість білка біуретовим методом (3-5 мг/мл). Застосовували буфер із меркаптоетанолом, гліцирином та бромфеноловим синім (рН 6,8) і електродний буфер з гліцином, ДСН, тріс, (рН 8,6). Зразки прогрівали 2 хвилини на водяній бані та наносили на пластини градієнтного ПААГ. (Мауер "Диск-електрофорез", 1971).

Для електрофорезу використовували постійний струм 20 - 30 мА на пластину, доки бромфеноловий синій доходив до нижньої межі гелю. Пластини фарбували 0,25 % кумасі 250.

ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ ВИВЧАЄМИХ ШТАМІВ АРВ

Електронну мікроскопію епізоотичних та референтного штамів проводили за методикою Корольова М.Б. (1980).

Використовували електронний мікроскоп типу EM-100L. Негативне контрастування авіреовірусів проводили за методом Sterner S. and Horse S.W. (1982) із застосуванням фосфорно-вольфрамової кислоти 4% концентрації (рН 6,3).

Плівки-підложки, на які наносили вірусну суспензію, готували із формваруглероду. Після висихання нанесених на плівки-підложки крапель препарат досліджували у електронному мікроскопі.

Форографування проводили на фотопластинах із збільшенням 26-34 тис. А*.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ

Рівень антитіл проти АРВ у пробах сироватки крові птиці із неблагополучних з АРВІ птахогосподарств визначали в РНГА із еритроцитарним діагностикумом за методом Германа В.В(1983) . Реакцію непрямої жовткової аглютинації ставили аналогічно РНГА із еритроцитарним антигеном ІЕКВМ. Проби жовтка розводили 1:1 із фізіологічним розчином NaCl, (рН 7,2).

Реакцію дифузійної преципітації ставили по Оухтерлоні (1984).

Антиген готували із вірусної культуральної рідини авіреовірусу шт.СП-73, очищеної 20% хлороформом (Rolson A., Selser D.1954) і концентрованої ПЕГ-6000 у 10 разів.

Статистичну обробку цифрових показників проводили за методами Чистякова І.А. (1966), Snedekor D. J. (1991).

БІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ТА ВИПРОБУВАННЯ

РЕОВАКЦИНИ-1 ТА РЕОВАКЦИНИ-2 ІЕКВМ

Порівняльне випробування ефективності двох інактивованих вакцин ІЕКВМ проти АРВІ (Реовакцина-1 та Реовакцина-2) проводили в умовах птахогосподарства Токарівка, Харківської області.

З цією метою по типу аналогів було відібрано 60 серонегативних курей і півнів, із яких було сформовано по 3 групи для дослідження кожної із вакцин та 2 контрольні.

У експерименті враховували:

- 1) Клінічний стан птиці;
- 2) Динаміку її загибелі та вибраковки;
- 3) Рівень специфічних антитіл через 14 та 30 діб після щеплення за результатами РНГА у пробах сироватки крові та жовтках яєць;
- 4) Місцеву реакцію на введення кожної із вакцин;
- 5) Рівень продуктивності курей-несучок усіх груп;

Схема експерименту подана в таблиці 1.

Таблиця 1. Схема експерименту

Біопрепарат	Група	Спосіб введення	Доза, см ³	Кількість голів	Строк досліду, дні
	1	підшкірно у се-	0,5	6	30
		редню третину			
		шиї			
Реовакцина	2	внутрішньом'язо	0,5	6	30
		во у стегно			
		внутрішньом'язо			
1	3	во у стегно	1,0	12	30
		внутрішньом'язо			
		Контроль			
	1	підшкірно у	0,5	6	30
		середню трети			
		ну шиї			
Реовакцина	2	внутрішньом'я	0,5	6	30
		зово у стегно			
		внутрішньом'я			
2	3	зово у стегно	1,0	12	30
		внутрішньом'я			
		Контроль			

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

З 1993 до 1995 року нами був використаний серологічний моніторинг авіреовірусної інфекції та хвороби Гамборо у 20 птахогосподарствах України із застосуванням експрес - методу РНГА з еритроцитарними діагностикумами ІЕКВМ.

У птиці 7 обстежених птахогосподарств були зареєстровані специфічні антитіла до авіреовірусу та збудника хвороби Гамборо: Полтавська п/ф, Полтавської області; Нестерянська п/ф, Запорізької області; Івашковська п/ф, Харківської області, які спеціалізуються з виробництва яєць курей - несучок;

ППЗ Рудня, Київської області; ППС Кіровське, Кіровоградської області, що спеціалізуються з виробництва інкубаційного яйця курей; Синельниківська п/ф, Дніпропетровської області; Снакієвська п/ф, Донецької області по вирощуванню курчат-бройлерів.

Дані аналізу протиепізootичних заходів свідчили про те, що у цих господарствах не проводилася програма вакцинопрофілактики авіреовірусної інфекції та хвороби Гамборо.

Специфічні антитіла до авіреовірусу та збудника хвороби Гамборо при епізootологічному обстеженні птахогосподарств Харківської та Кіровоградської областей виявлено у 60 і 20-30 % (від кількості дослідженої птиці) відповідно. У птиці птахогосподарств Львівської та Київської областей реєстрували антитіла до авіреовірусу в 30%, а до збудника хвороби Гамборо - у 100-60 % (відповідно обстеженому регіону).

Специфічні антитіла до авіреовірусу та збудника хвороби Гамборо зареєстровано у 80 і 90 % дослідженої птиці (відповідно) в господарствах Полтавської, Дніпропетровської, Запорізької та Донецької областей.

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНИХ

ШТАМІВ АВІРЕОВІРУСІВ

Від птиці неблагополучних з АРВІ птахогосподарств: Таганрозької п/ф, Ростовської обл., Полтавської п/ф, Полтавської обл.,

ППЗ Фрунзе Автономної Республіки Крим та індивідуального сектора ізольовано 4 штами авіреовірусу, які були позначені як: Т-95, П-95, К-94, Р-1. Зміни, типові для авіреовірусної інфекції: некротичні утворення на ХАО та крововиливи у печінку зародка, реестрували при їх культивуванні на курячих ембріонах 11-денної інкубації.

Нами була проведена порівняльна оцінка чутливості птахомолодняка курей до епізоотичних штамів авіреовірусу. Отримані результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. Порівняльна оцінка чутливості птахомолодняка курей до епізоотичних штамів АРВ

Епізоотичні штами	Інкубаційний період, дні	Тривалість клінічного прояву, дні	Типові симптоми захворювання	Кількість хворих	Кількість загинулих	Сероконтроль, %	Патологічні зміни
Т - 95	9	6	артрит метатарзального суглобу	40	0	0	фібрінозний випот у суглоб, холецистит
К - 94	12	3	---	20	0	0	---
П - 95	7	8	діарея	40	0	0	ентеронефрит
Р - 1	8	3	діарея	20	0	0	---

Із патологічного матеріалу, відібраного від інфікованих курчат були реізольовані досліджувані епізоотичні штами АРВ.

Інфекційність авіреовірусів у зародку курей 11-денної інкубації коливалася від 3,93 до 5,93 lg.

Титр епізоотичного штаму К-94 не мав статистично-достовірної різниці із референтним штамом СП -73 (6,0 - 6,1 lg).

Усі епізоотичні штами АРВ було адаптовано до первинно - трипсинізованої культури ФКЕ, в яких ЦПД вірусу характеризувалася змінами за типом синцитія.

Титр епізоотичних штамів коливався від 4,0 до 6,0 lg при розмноженні у даній біосистемі.

Референтний штам СП -73 у первинно - трипсинізованих ФКЕ дорівнював 6,5 lg. Епізоотичні штами Т-95, П-95 та К-94 мали титр на 0,5 lg нижче, ніж референтний шт. СП -73, а штам Р-1 на 2,5 lg.

У електрофоретичному профілі авіреовірусу як епізоотичних, так і референтного штамів зареєстровано 8 білкових фракцій.

Референтний штам СП -73 АРВ представлений чотирма із 8 інтенсивно забарвленими білковими фракціями, а епізоотичні штами: Т-95 та К-94 - трьома; П-95 і Р-1 - двома.

Спільною для епізоотичних та референтного штамів білковою фракцією із інтенсивним забарвленням є фракція 90 кД, яка співпадає із поліпептидом VP4. За даними Finner F., Mac-Olsen B., Mims C. (1977), Karikian A.Z., Sapoev K.M. (1985) саме поліпептид VP4 відіграє провідну роль у розвитку інфекційного процесу та формуванні імунітету.

За даними електронної мікроскопії встановлено, що як епізоотичні, так і референтні штами мають форму ікосаедра та розмір від 65 до 70 нм.

Результати, отримані у ході експерименту по вивченню антигенної спорідненості епізоотичних штамів авіреовірусу і референтного СП-73, подані в таблиці 3.

Таблиця 3. Порівняльна оцінка антигенної спорідненості епізоотичних штамів АРВ та референтного штаму СП-73.

Штами	Специфічна сироватка (шт. СП - 73)		
авіреовірусу	lg	Індекс нейтралізації	Антигенне споріднення
СП - 73	3,0	1000	1,0
Т - 95	3,0	1000	1,0
К - 94	3,0	1000	1,0
П - 95	3,0	1000	1,0
Р - 1	2,9	955,0	0,95

Одержані результати що до чутливості епізоотичних штамів АРВ до гомологічних біосистем (РЕК та п.т. С.ФКЕ), клінічного прояву захворювання при інфікуванні птиці 9-денного віку, наявності структурного вірусного поліпептиду VP4, морфологічній будові віріонів та ступеня антигенної спорідненості на рівні 95 - 100 % свідчать про відсутність наявного антигенного дрейфу штамів АРВ.

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БІОСИСТЕМИ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ СП-73 АРВ

Вивчення репродуктивних властивостей штаму СП-73 проводили із використанням гомологічних п.т. ФКЕ та гетерологічних культур: НЕВ та VERO.

Для отримання п.т.ФКЕ нами були випробувані ростові власти-

вості живильного середовища геосгідролізін (розробник- співробіт-
ники лабораторії вірусології ІЕКВМ) та стандартні живильні середо-
вища (199 і Ігла).

При однаковій засівній концентрації клітин (600 тис/см³) тер-
мін формування їх моношару при використанні живильного середовища
геосгідролізін дорівнював 16- 20 годин, що на 4- 10 годин швид-
ше, ніж на стандартних живильних середовищах.

Порівняльну оцінку репродуктивних властивостей референтного
штаму СП-73 АРВ вивчали при культивуванні у п.т. ФКЕ, отриманих на
середовищі геосгідролізін, та стандартних живильних середовищах
(199 та Ігла).

Вихід як клітинно- зв'язаного, так і заклітинного вірусу визна-
чали в динаміці за даними титрації. Отримані результати експери-
ментів наведені у табл.4

Таблиця 4. Динаміка репродукції шт. СП-73 у культурі п.т. ФКЕ.

Живильні середовища	Титр вірусу шт. СП-73, 1g													
	клітинно-зв'язаний							заклітинний						
годин	12	18	24	30	36	40	48	12	18	24	30	36	40	48
Геосгідро- лізін	4,0	4,5	6,5	6,5	6,0	-	-	2,5	3,2	5,0	5,0	4,2	-	-
Стандартні середовища	1,5	3,0	4,5	4,5	5,0	5,2	5	1,0	2,0	2,5	4,7	5,0	5,0	5

Примітка : - не вивчали

Репродукція штаму СП-73 у культурі п.т. ФКЕ, одержаних на се-
редовищі геосгідролізін, в перші 12 годин, проходить більш інтен-
сивно, ніж у п.т. ФКЕ із використанням стандартних живильних середо-

вищ.

Так, клітинно-зв'язаний вірус (шт. СП-73) у п.т. ФКЕ на середовищі геосгідролізин накопичується на 2,5 lg, а заклітинний - на 1,5 lg вище (відповідно), ніж при використанні стандартних середовищ.

Максимальне накопичення вірусу (шт. СП-73) у п.т.ФКЕ на середовищі геосгідролізин у наших дослідах реєстрували через 24 години. При цьому рівень клітинно-зв'язаного вірусу на цей час вищий на 2 lg, ніж у п.т.ФКЕ при роботі зі стандартними середовищами.

Зареєстровано титр клітинно-зв'язаного вірусу (5,2 lg), а заклітинного (5,0 lg) через 36 - 42 години у п.т.ФКЕ, культивованих на стандартних живильних середовищах. При культивуванні у п.т. ФКЕ із застосуванням живильного середовища геосгідролізин ці показники були на 1,3lg та 0,8 lg вищі (відповідно).

При ролерному культивуванні зафіксовано прискорення процесу адаптації авіреовірусу до цих культур клітин.

Так у культурі нирки ембріону вівці, інфікованої штамом СП-73 авіреовірусу, цитопатична дія вірусу настає на 24 години пізніше, ніж в культурі Vero. Титр вірусу при застосуванні культури Vero дорівнював 5,0 lg, що на 0,5 lg вище ніж в культурі нирки ембріону вівці.

Таким чином, для культивування авіреовірусу можуть бути використовані як гомологічні (п.т. ФКЕ), так і гетерологічні (нирка ембріону вівці та Vero) - біосистеми.

Для отримування біомаси авіреовірусу у титрі $10^{6,5}$ ТЦД /см³ за короткий термін доцільно використовувати п.т. ФКЕ та живильне середовище геосгідролізин ІЕКВМ.

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕОВАКЦИНИ-1
ТА РЕОВАКЦИНИ-2 ІЕКВМ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ДОЗИ ТА СПОСОБУ
ІМУНІЗАЦІЇ ПТИЦІ

В лабораторії вивчення хвороб птиці ІЕКВМ сконструйовані куль-

туральні інактивовані вакцини проти реовірусної інфекції птиці:
Реовакцина -1 та Реовакцина -2.

До складу їх входять : референтний штам СП-73 АРВ, атенуйований на п.т. ФКЕ, мінеральні масла вітчизняного виробництва та інактиватор.

Лабораторно-виробниче випробування Реовакцини -1 та Реовакцини-2 ІЕКВМ в умовах п/ф Токарівська, Харківської області показало, що обидва біопрепарати нешкідливі, ареактогенні та імуногенні.

Результати досліджень подані у табл. 5 та 6.

Таблиця 5. Ефективність вакцинації курей - несучок

Реовакциною -1 та Реовакциною-2

Спосіб вакци- нації	Доза, см	Термін нагля- ду, дні	Реовакцина-1		Реовакцина-2	
			Рівень серо конверсії,% M ± m	log2 * M ± m	Рівень серо конверсії,% M ± m	log 2 * M ± m
Підшкірно, у середню третину шиї	14	70	3,6 ± 0,4	100	4,3±0,07	
	0,5	70	3,66±0,45	100	4,8±0,05	
Внутрішньо- м'язово у стегно	14	66	4,0±0,06	26	3,0	
	0,5	88	4,0±0,04	45	3,0	
Внутрішньо- м'язово у стегно	14	41	3,2± 0,04	99	3,63±0,02	
	1,0	68	3,41±0,02	100	3,58±0,02	

Примітка: * - захисний титр антитіл 1:8 та вище

Із даних табл. 5 видно, що ефективність вакцинації птиці Реовакциною 1 та Реовакциною 2 залежить від дози і способу введення вакцини. Більш ефективною при використанні Реовакцини-1 є доза 0,5

вакцинованої птиці зареєстровано тільки на 30-й день експерименту.

Призначення Реовакцини-2 курам-несучкам підшкірно, у дозі 0,5 мл, а також внутрішньом'язово у дозі 1,0 мл сприяло 100 % рівню сероконверсії птиці.

У птиці, вакцинованої як Реовакциною 1, так і Реовакциною 2 віруснейтралізуючі антитіла реєструвалися як у сировотці крові, так і в жовтках яєць.

Результати випробування наведені в табл. 6.

Таблиця 6. Порівняльна оцінка результатів досліджень жовтка яєць та сироватки крові птиці за даними РНГА

Група	Спосіб введення	Доза, см	Реовакцина - 1		Реовакцина - 2	
			у жовтку яєць	в сироватці крові	у жовтку яєць	в сироватці крові
			Середньгеометричний титр антитіл через 14 /30 днів після вакцинації птиці, log			
1	Підшкірно у шию	0,5	3,0	3,6	4,1	4,3
			3,6	3,66	4,5	4,8
2	Внутрішньом'язово у стегно	0,5	3,6	4,0	3,0	3,0
			3,6	4,0	3,4	3,0
3	Внутрішньом'язово у стегно	1,0	3,0	3,2	3,6	3,63
			3,2	3,14	3,4	3,58

Дані таблиці свідчать про те, що на введення курам-несучкам Реовакцини 2 підшкірно, у середню третину шиї, у дозі 0,5 мл на 30 днів досліду зафіксовано найбільший рівень віруснейтралізуючих антитіл : у сироватці крові - 4,8 log, а у жовтках яєць - 4,5 log.

Таким чином, для профілактики авіреовірусної інфекції птиці може бути запропонована імунізація курей-несучок Реовакциною-2 ІЕКВМ у дозі 0,5 см підшкірно в середню третину шиї.

ВИСНОВКИ

1. За методом серологічного моніторингу розповсюдження авіреовірусної інфекції та хвороби Гамборо на рівні 30-90 і 20-100 % (відповідно) реєструється у 7 областях України.

2. Найбільш ефективна ізоляція епізоотичних штамів авіреовірусів спостерігається при виявленні у птиці специфічних антитіл від 0 до 40 % (за даними РНГА із еритроцитарними діагностикумами ІЕКВМ).

3. Від клінічно хворої птиці різних технологічних груп птахогосподарств ізольовані та типовані 4 епізоотичні штами, зазначені: Т-95, П-95, К-94, Р-1.

4. Підтверджена діагностична ефективність використання біосистеми- курячий ембріон для ізоляції та типізації авіреовірусу.

5. Встановлено, що при інфікуванні курчат епізоотичними штамами Т-95 та К-94 виникає артрит-теносиновіт, а штамами П-95 та Р-1 - ентеронефрит.

6. Виявлена ідентичність епізоотичних та референтного штамів авіреовірусу за морфологічною структурою вірусних частин у формі ікосаедра, за розміром від 65 до 70 нм, а також наявністю у складі віріона фракцій білка, які відповідають поліпептидам VP4, VP6, VP7. Встановлена відсутність наявного антигенного дрейфу авіреовірусу за ступенем антигенної спорідненості між епізоотичними штамами (95-100%).

7. Первинно-трипсинізовані фібробласти курячих ембріонів є більш чутливою біосистемою для культивування авіреовірусу у порівнянні з курячими ембріонами та перещеплюваними культурами

клітин: ниркою ембріона вівці та Vero.

8. Культивування шт. СП-73 реовірусу на первинно-трипсинізованих фібробластах із застосуванням живильного середовища геосгідролізин ІЕКВМ сприяє виходу вірусної маси у титрі $10^{6,5}$ ТЦД $50/см^3$.

9. Біопрепарати: Реовакцина-1 та Реовакцина-2 ІЕКВМ, сконструйовані на основі референтного штаму СП-73 авіреовірусу, активні, специфічні, арактогенні. Використання компонентів вітчизняного виробництва робить ці вакцини доступними та конкурентноспроможними.

10. Для профілактики авіреовірусної інфекції в умовах виробництва може бути рекомендована Реовакцина -2 ІЕКВМ у дозі 0,5 см при підшкірному введенні препарату, яка забезпечує рівень імунного відгуку до 100 % від кількості вакцинованої птиці та трансваріальну передачу специфічних антитіл.

ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

Запропоновано технологічний регламент культивування первинно-трипсинізованих фібробластів курячих ембріонів із застосуванням вітчизняного живильного середовища геосгідролізин ІЕКВМ, яка скорочує термін формування моношару клітин на 4-10 годин у порівнянні із стандартними живильними середовищами.

Використання первинно-трипсинізованих фібробластів курячих ембріонів та середовища геосгідролізин для репродукції авіреовірусу (шт. СП-73) дозволяє одержувати біомасу у титрі $10^{6,5}$ ТЦД $50/см^3$.

Розроблена і затверджена нормативно-технічна документація на виготовлення та застосування живильного середовища геосгідролізин ІЕКВМ для культур клітин, у тій чисельності і п. т. ФКЕ.

Запропонована схема вакцинопрофілактики авіреовірусної інфекції курей із використанням Реовакцини-2 ІЕКВМ : підшкірно у середню третину шиї, у дозі 0,5 см³.

Імунізація птиці Реовакциною -2 ІЕКВМ у дозі 0,5 см підшкірно забезпечує 100 % рівень сероконверсії у вакцинованої птиці, сприяє накопиченню специфічних антитіл у сироватці крові ($4,8 \log$), а також у жовтку яєць на рівні $4,5 \log$, що дає можливість прогнозува-

ти передачу материнських антитіл курчатам перших днів життя.

ПЕРЕЛІК НАДРУКОВАНИХ РОБІТ

1. Герман В.В., Пархоменко Л.И. Прогнозирование эпизоотического статуса птицеводческих хозяйств по авириовирусной инфекции и инфекционной бурсальной болезни по данным сероконтроля// Общая эпизоотология: иммунол., экол. и методол. пробл.: Материалы междунар. науч. конф., 20, 21, 22 сент. 1995 г./ ИЭКВМ.- Харьков, 1995.- С.48-50.

2. Пархоменко Л.И. Испытание экспериментально-промышленных образцов инактивированных вакцин ИЭКВМ// Вет. медицина: Міжвід. тематич. наук. зб.- Харків, 1996.- Вип.72.- С.50-53.

3. Пархоменко Л.И. Реовирусная инфекция: проблемы борьбы и профилактики// 2nd Ukrainian poultry conference, Borky, Ukraine, 14-16 May 1996.- Борки, 1996.- С.94.

4. Пархоменко Л.И. Сравнительная оценка питательных сред для репродукции авириовирусов в культуре фибробластов куриного эмбриона// 2nd Ukrainian poultry conference, Borky, Ukraine, 14-16 May 1996.- Борки, 1996.- С.95.

5. Пархоменко Л.И. Эпизоотологический мониторинг авириовирусной инфекции в птицеводческих хозяйствах// Вет. медицина: Міжвід. тематич. наук. зб.- Харків, 1996.- Вип.72.- С.54-55.

6. Пархоменко Л.И., Герман И.В., Белявцева Е.А. Геосидролизин - эффективная питательная среда для культивирования первично-трипсинизированных культур клеток куриного эмбриона// 2nd Ukrainian poultry conference, Borky, Ukraine, 14-16 May 1996.- Борки, 1996.- С.96.

7. Мельникова В.А., Пархоменко Л.И. Изучение действия вакцин против авириовирусной инфекции гистологическими методами// Наук. досягнення в галузі вет. медицини: Матеріали/ Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених, 1-2 квіт. 1997 р.- Харків, 1997.- С.37.

8. Пархоменко Л.И. Сравнительное изучение биологических свойств

тв возбудителей авиареовирусной инфекции птиц// Наук. досягнення в галузі вет. медицини: Матеріали/ Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених, 1-2 квіт. 1997 р.- Харків, 1997.- С.45-48.

Пархоменко Л.И. Изучение иммунобиологических свойств авиареовирусов кур и индеек.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16,00,03. Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН.

Защищается рукопись кандидатской диссертации о результатах исследований по изучению иммунобиологических свойств авиареовирусов кур и индеек.

Установлена идентичность штаммов авиареовируса: эпизоотических (Т-95,К-94,П-95,Р-1) и референтного (СП-73) по морфологии вирусных частиц (от 65 до 76 нм) и форме икосаэдра, белковым фракциям, соответствующим полипептидам VP4,VP6,VP7; по чувствительности к различным биосистемам.

Отработан технологический регламент по накоплению массы вируса (шт. СП-73) в титре $10^{6,5}$ ТЦД 50/см³ с использованием новой питательной среды геосгидролизин ИЭКВМ в биосистеме первично-трипсинизированные фибробласты куриных эмбрионов.

Предложена Реовакцина -2 ИЭКВМ для профилактики авиареовирусной инфекции птицы.

Вакцинация кур Реовакциной -2 подкожно, в среднюю треть шеи в дозе 0,5 см³ обеспечивает 100 % уровень сероконверсии и накопление специфических антител в защитном титре как в сыворотке крови (4,8 log), так и в желтке яиц (4,5 log).

Parhomenko L.I.

Immunobiological properties of avian reoviruses of hens and turkeys.

Ph.D. thesis, in vet. medicine by the subject N 16.00.03

Veterinary microbiology, virology, epizootology and immunology.

Institute of Experimental and Clinical Vet. Med., Kharkov, Ukraine.

Manuscript of a thesis for Master of Science degree with results of a study of immunological properties of avian reoviruses of hens and turkeys is to be maintained.

Identity of avian reoviral epizootic (T-95, П-95, K-94, P-1) and reference (SP-73) strains as to the morphology of virus particles (~~65-70~~ nm), icosahedral form, protein compositions. That correspond to respective polypeptides VP4, VP5, VP6, sensitivity to different biological systems has been determined.

Technological regulations of viral (strain SP-73) mass accumulation with the titer of $10^{6.5}$ TCID₅₀/cm³ and application of new nutrient medium (IECVM's gheohydrolysine) in the biological system of trypsinized fibroblast of hen embryos have been developed.

IECVM's Reovaccine -2 for prophylaxis of avian reoviral infection has been proposed.

Vaccination of hens with Reovaccine -2 (subcutaneously, 0.5 cm³ dose, middle third of a neck) ensures 100 % seroconversion and accumulation of specific antibodies with protective titer both in blood serum (4.8 log) and egg yolk (4.5 log).



AB 38.113