

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЗДОРОВ'Я ТВАРИН
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина»

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Зав. кафедри фізіології та біохімії с.-г. тварин
к. біол. н., проф.
_____ Л.М. Степченко
« » _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ СПЕЦИФІЧНОЇ
ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ СВИНЕЙ ПРОТИ ХВОРОБИ АУЄСКІ В
УМОВАХ НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ ТА
ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО
КОМПЛЕКСУ ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-
ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
26.06 – ДР. 0873 20 05 08. 046. ПЗ

Студентка-дипломниця _____ К.О. Голда

Керівник дипломної роботи
к. вет. н., проф. _____ Д. М. Масюк

Консультанти:
з охорони праці
к. с.-г. н., доц. _____ В.О. Сапронова

з економічних питань
к. вет. н., доц. _____ В.В. Зажарський

Дніпро – 2020

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
АНОТАЦІЯ.....	4
ВСТУП.....	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Характеристика хвороби Ауескі.....	8
1.2. Лабораторна діагностика хвороби Ауескі.....	13
1.3. Профілактика хвороби Ауескі.....	19
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1. Матеріал і методи дослідження.....	24
2.2. Характеристика Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК.....	28
2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз.....	32
2.3.1. Визначення колостральних IgG до антигенів gV та gE вірусу хвороби Ауескі.....	32
2.3.2. Рівень специфічних антитіл IgG до антигенів gV вірусу хвороби Ауескі за специфічної імунопрофілактики.....	35
2.3.3. Рівень специфічних антитіл IgG до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі за специфічної імунопрофілактики.....	42
2.4. Розрахунок економічної ефективності.....	47
3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ.....	53
4. ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	58
5. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	60
6. ДОДАТКИ.....	66

РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на 76 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень та їх аналіз, розрахунок економічної ефективності, охорону праці, висновки та пропозиції виробництву, список використаної літератури. Робота містить 6 рисунків та 5 таблиць. Список використаної літератури налічує 42 джерела, переважно зарубіжних авторів.

Метою роботи було визначити особливості лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі.

Об'єктом дослідження було застосування методу імуноферментного аналізу для контролю ефективності проведених лікувально профілактичних заходів щодо хвороби Ауескі.

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо визначення тривалості циркуляції у крові поросят колостральних IgG специфічних до антигенів вірусу хвороби Ауескі, рівню IgG специфічних до антигенів gB та gE вірусу хвороби Ауескі у крові поросят різного віку за специфічної імунопрофілактики

За результатами досліджень було запропоновано, господарствам неблагополучним або умовно благополучним щодо хвороби Ауескі проводити специфічну імунопрофілактику шляхом інтраназальної та парентеральної вакцинації з урахуванням особливостей тривалості колострального імунітету.

Для виявлення інфікованих тварин рекомендовано проводити одночасне дослідження з використанням дискримінуючих тестів для визначення антитіл до антигенів gB та gE збуднику хвороби Ауескі.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота Голди К.О. на тему «Лабораторний контроль специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету». У роботі представлено визначення особливостей лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі. Встановлено, що новонароджені поросята до ссання молозива не містять специфічних IgG до вірусу хвороб Ауескі. З 7 доби життя у крові 100 % поросят містяться колостральні антитіла специфічні до антигенів gB та gE вірусу хвороби Ауескі, які зберігаються до 70 добового віку. На 77 добу від народження виявлено 29 % серонегативних свиней, що пов'язано з природнім катаболізмом колостральних імуноглобулінів. За парентеральної імунізації у свиней контрольної групи виявлено зменшення показнику S/N на 84 доби життя у 5,7 рази, порівняно до значень отриманих від тварин 77 добового віку, що вказує на збільшення рівня антитіл до gB вірусу хвороби Ауескі. Імунізація поросят у більш ранньому віці сприяє формуванню 100 % групового імунітету серед досліджених тварин у продовж усього періоду. Серед свиней контрольної групи виявлено 84 % тварин, які містять антитіла до антигенів gE збудника хвороби Ауескі, що вказує на їх контакт з епізоотичним штамом вірусу. У першій та другій дослідних групах кількість інфікованих свиней зменшилась на 10 % та 64 % відповідно, порівняно до значень тварин контрольної групи. Економічна ефективність застосування методу ІФА для виявлення імуноглобулінів IgG специфічних до антигенів gB та gE збудника хвороби Ауескі складає відповідно 25,24 грн та 37,24 грн на одну пробу.

Ключові слова: хвороба Ауескі, колостральні антитіла, специфічні антитіла, імуноферментний аналіз.

ANNOTATION

Graduate work Holda K.O. on the topic "Laboratory control of specific prevention of pigs against Aujeszky's disease in the Scientific Research Centre of Biosafety and Environmental Control Agro-industrial Complex of Dnipro State Agrarian and Economic University". The paper presents the solution of problems to determine the features of laboratory control of specific prevention of pigs against Aujeszky disease. It was found that newborn piglets before colostrum sucking do not contain specific IgG antibodies to the virus Aujeszky disease. From 7 days of age, the blood of 100% of piglets contains colostral antibodies specific for gB and gE Aujeszky's disease virus antigens, which are stored up to 70 days of age. At 77 days of age, 29% of seronegative pigs were detected due to the natural catabolism of colostral immunoglobulins. For parenteral immunization of pigs in the control group revealed the reduction of S/N at 84 days of life in 5.7-fold, compared to values obtained from animals 77 days old, indicating increased levels of antibodies to the gB Aujeszky's disease virus antigens. Immunization of piglets at an earlier age promotes the formation of 100% group immunity among the studied animals throughout the period. Among the studied pigs of the control group found 84% of animals that contain antibodies to gE antigens of the pathogen Aujeszky disease, indicating their contact with an epizootic strain of the virus. In the first and second experimental groups, the number of infected pigs decreased by 10% and 64%, respectively, compared to the values of animals in the control group. Cost-effectiveness of ELISA for the detection of IgG specific for gB and gE pathogen antigens of Aujeszky disease virus is UAH 25.24 and UAH 37.24 per trial, respectively.

Key words: Aujeszky disease, colostral antibodies, specific antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay.

ВСТУП

Хвороба Ауескі це висококонтагіозне вірусне захворювання, що характеризується раптовою смертю з ознаками нервових розладів серед новонароджених тварин, ураженням дихальної системи старших вікових груп та репродуктивними дисфункціями у свиноматок, у деяких видів тварин проявляється сильним свербінням та розчісуваннями. Летальність досягає 100% серед поросят підсисного періоду та знижуються з віком [3].

Контроль за поширенням хвороби Ауескі проводять за допомогою специфічної імунопрофілактики з одночасним виявленням та видаленням інфікованих тварин з обов'язковим дотриманням заходів біобезпеки [30].

Для проведення імунопрофілактики хвороби Ауескі з успіхом застосовують, як живі (атенуйовані), так і вбиті (інактивовані) вакцини. Однак, є безліч факторів, що впливають на якість та ефективність проведення специфічної імунопрофілактики, серед них виділяють, стреси, зниження резистентності організму, неналежні умови утримання та годівлі, неправильне зберігання та застосування біопрепаратів, інтерференцію материнських антитіл з вакцинним антигеном, тощо [10].

На сьогоднішній день з метою контролю ефективності проведеної специфічної імунопрофілактики застосовують метод ІФА, що дозволяє встановити наявність специфічних антитіл до антигенів вірусу хвороби Ауескі, оцінити рівень групового імунітету та тривалість колострального або поствакцинального імунітету тварин [6].

Однак вакцинація тварин сприяє лише «стримуванню» проявів типових клінічних ознак [20]. Необхідною умовою повної ерадикації збудника хвороби Ауескі є виявлення та видалення інфікованих тварин. Згідно ветеринарного законодавства України, імунопрофілактика хвороби Ауескі базується на використанні маркованих gE-негативних вакцин проти хвороби Ауескі.

Вакцини такого типу індукують синтез антитіл до всіх глікопротеїнів вірусу хвороби Ауескі, окрім gE, що дозволяє застосовувати дискримінуючі лабораторні тести. Свині, що містять антитіла до gB та gE антигенів вірусу хвороби Ауескі є інфікованими. Свині, які містять антитіла до антигенів лише gB, а за gE є серонегативними, вважаються імунними та вільними від епізоотичного вірусу хвороби Ауескі [42].

В зв'язку з вище наведеним важливо встановити особливості лабораторного контролю формування та тривалості специфічного імунітету до збуднику хвороби Ауескі та визначення ефективності специфічної імунопрофілактики.

Об'єкт дослідження: специфічна імунопрофілактика свиней.

Предмет дослідження: лабораторний контроль специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі.

Мета роботи: визначити особливості лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі.

Завдання роботи:

1. З'ясувати тривалість циркуляції у крові поросят колостральних IgG специфічних до антигенів вірусу хвороби Ауескі
2. Визначити рівень IgG специфічних до антигенів gB вірусу хвороби Ауескі у крові поросят різного віку за специфічної імунопрофілактики
3. Встановити рівень IgG специфічних до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі у крові поросят різного віку за специфічної імунопрофілактики
4. Розрахувати економічну ефективність застосування методу імуноферментного аналізу для лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика хвороби Ауескі

Хвороба Ауескі - гостре інфекційне захворювання, що вражає всі види домашніх тварин, м'ясоїдних, хутрових звірів і гризунів та зумовлює значні економічні збитки у свинарстві. Захворювання характеризується ураженням центральної нервової системи у молодих поросят, респіраторною патологією у старших свиней і репродуктивною дисфункцією у свиноматок. Смертність підсисних поросят може сягати 100%, дорослі тварини зазвичай одужують, але можуть бути латентними вірусоносіями та виділяти вірус у навколишнє середовище [3].

Етіологічним фактором захворювання є ДНК-геномний, дволанцюговий вірус роду *Varicellovirus*, підродини *Alphaherpesvirinae*, родини *Herpesviridae* також відомий як *suid herpesvirus-1 (SuHV-1)* [3]. Вірус сферичної форми, розміром 180-200 нм, вкритий ліпоротеїновою оболонкою, має ікосаедральний капсид. Вірусна оболонка складається з одинадцяти глікопротеїнів, що виконують різні функції. Так gB, gD, gH та gL мають важливе значення для реплікації вірусу; gE, gI, білок тегументу US9 та неструктурний білок тимідинкіназа (ТК) пов'язані з вірулентністю вірусу. Також ці білки відповідають за рух вірусу всередині нервової тканини [9].

Вірус культивується на первинних культурах клітин курячих фібробластів, нирок ембріонів поросят чи телят, щитоподібної залози та перещеплюваних лініях клітин РК-15 і ВНК-21. Реплікація вірусу в клітині викликає характерні зміни, цитопатогенний вплив збудника обумовлює округлення клітини, утворення в ядрі еозинофільних тілець-включень. Вірус досить стійкий до факторів зовнішнього середовища. Місяцями зберігається у гноївці, сіні, соломі та дереві. Низькі температури лише подовжують термін його життєздатності. За

температури +25°C вірус зберігається до 6 тижнів, при +15°C - 9 тижнів, +4°C - до 20 тижнів, -40°C - роками. Висока температура згубно діє на вірус. За +60°C з експозицією у 60 хвилин чи за +100°C упродовж 1 хвилини вірус повністю знешкоджується [5]. За повідомленням Durham P. J. [9] зразки шкіри, що відібрали від свиней з гострим проявом хвороби зберігали за температури -20°C та до 40 дня виявляли збудника хвороби Ауескі. За результатами інших дослідників встановлено, що після 35-денного зберігання свинячих напівтуш за температури -18°C вірус не виявляли в зразках м'язів, лімфатичних вузлів та кісткового мозку [7].

До вірусу хвороби Ауескі сприйнятливі більшість ссавців але лише свиней визнано природним резервуаром збудника. У 1880 році було вперше описано вірус хвороби Ауескі, як збудник захворювання «псевдосказу» [9, 5]. Згодом вчений Aladar Aujeszky ізолював збудника від ВРХ, собак і котів та диференціював його від збудника сказу, що обумовило теперішню назву захворювання «хвороба Ауескі». Повідомлень про виділення збудника від свиней не відмічалось до 30-х років минулого століття [5]. За повідомленням Ruiz-Fons F. встановлено, що широкого розповсюдження вірус досяг завдяки диким кабанам [27]. У своїх роботах Stegeman A., [30], Yoon H.-A., et al. [37], Parageorgiou K., et al. [19] та Wernike K., et al. [36] вказують на можливість інфікування збудником хвороби Ауескі мисливських собак.

Джерелом збудника є хворі тварини та вірусососії, що виділяють вірус у навколишнє середовище з слиною, сльозою, носовими витіканнями, молоком, виділенням з піхви, спермою, сечею, калом, тощо. Зараження сприйнятливих тварин відбувається при потрапляння вірусу через слизові оболонки. Також, є повідомлення про вертикальний шлях передачі збудника - від матері до плода або новонародженого, що відбувається у пізній період вагітності та з молозивом [5]. До факторів передачі вірусу хвороби Ауескі відносять воду, корма,

інвентар, спецодяг персоналу, тощо [5]. Серед популяції диких кабанів статевий шлях передачі вважається найбільш розповсюдженим [25].

Після потрапляння збудника на слизову оболонку носа чи рота відбувається реплікація вірусу у клітинах верхніх дихальних шляхів, завдяки чому він проникає у сенсорні нервові закінчення нюхових, трійчастих та глософарингіальних нервів. За допомогою ретроградного транспорту вірус потрапляє до тіла нейрону [23]. Збудник має здатність проникати крізь синапси, що обумовлює перезараження здорових нейронів. Вірус хвороби Ауескі здатний до персистенції в трійчастих та крижових гангліях і мигдаликах перехворілих свиней, що обумовлює латентне вірусоносійство [23]. Одночасно з цим вірус потрапляє до кровоносної системи. Віремія призводить до розповсюдження вірусу по всьому організмі, де відбувається подальша реплікація збудника в епітелії порожнинних органів, ендотелії судин, лімфоцитах крові та макрофагах [5].

Клінічні ознаки хвороби відрізняються у залежності від віку свиней. Чим молодші тварини тим гостріше перебіг захворювання та вища смертність. Інкубаційний період триває від 1 до 11 діб. Летальність у новонароджених поросят може сягати 100%, у поросят 3-4 тижневого віку близько 50%, у поросят відлучного періоду 5-10% та знижується до 1-2% серед свиней груп дорощення та відгодівлі. Зрілі свині зазвичай одужують та залишаються латентними вірусоносійцями. Серед новонароджених поросят відмічається раптова смертність. Нервові явища найчастіше спостерігаються у підсисних поросят. Тремор м'язів, атаксія, конвульсії, параліч, лихоманка, поросята втрачають апетит, слабшають та гинуть через 24-36 годин після початку клінічних ознак [5, 9]. Серед поросят на дорощенні відмічаються респіраторні явища, диспное, риніти, виділення з носа та кашель, лихоманка з подальшим зниженням апетиту, млявість, афонія, блювота. Часто захворювання ускладнюється вторинними вірусними та бактеріальними інфекціями такими як, репродуктивно-

респіраторний синдром, цирковіроз, грип, актинобацилярна плевропневмонія, пастерельоз, тощо, що також впливає на клінічний прояв хвороби та може призвести до розвитку некротизуючої проліферативної пневмонії та смерті. Тварини, що одужують відстають у рості та розвитку в порівнянні з тваринами, які не хворіли. Зараження свиноматок у перші 35 діб поросності призводить до смерті та розсмоктування плодів. Інфікування свиноматок у середині поросності спричиняє аборти або муміфікації плодів, тоді як зараження на пізніх термінах - призводить до переривання вагітності, народження мертвих або слабких, нежиттєздатних порослят, які гинуть упродовж декількох діб. Ремонтні свинки та свиноматки часто потребують повторного осіменіння [5].

Патологічні зміни за хв. Ауески характеризуються мультифокальними некрозами органів лімфатичної, дихальної, травної та репродуктивної систем. У підсисних порослят та порослят після відлучення на тлі раптової смерті виявляють некрози печінки, селезінки та надниркових залоз. У свиноматок відмічаються некротичні ураження репродуктивних органів, зокрема некроз плаценти та ендометрит. Абортвані плоди зазвичай мацеровані або муміфіковані. У кнурів реєструється набряк мошонки. Інші ураження включають ексудативний кератокон'юнктивіт, серозний, а іноді фібринонекротичний риніт, ларингіт, трахеїт та некротизуючий тонзиліт [5]. Мікроскопічно виявляють негнійний менінгоенцефаломієліт з дегенерацією нейронів та некрозом, нейронофагією, дифузним та вогнищевим гліозом і периваскулярною манжетою мононуклеарними клітинами [1, 11]. В ядрах нейронів, астроцитів, олігодендроглії, клітинах Пуркіньє, дихальному епітелії, легневих макрофагах та макрофагах лімфатичних вузлів виявляють еозинофільні тільця-включення, що вказують на присутність вірусу хвороби Ауескі [1, 8, 11]

Діагностика хвороби Ауескі має бути комплексною з урахуванням епізоотичної ситуації, клінічних ознак, патологічних змін та лабораторних досліджень. Клінічна діагностика ускладнюється не характерним проявом

клінічних ознак, що обумовлюється багатьма супутніми інфекційними захворюваннями. На тлі збільшення відсотку смертності серед підсисних поросят реєструється прояв нервових явищ, тремор, атаксія, конвульсії та паралічі. У поросят після відлучення і старших виявляють респіраторні патології, збільшення відсотку абортів, мертвонароджених та «перегулів». Характерною ознакою хвороби Ауескі є те, що захворюваність та смертність зменшуються зі збільшенням віку свиней. Крім того, є повідомлення, що при наявності синантропних м'ясоїдних на фермі, їх раптова загибель передуює епізоотії на фермі [5]. При проведенні диференційної діагностики варто зважати на подібність клінічних ознак з ентеротоксемією у новонароджених поросят при наявності діареї. Ознаки респіраторної патології можуть бути спричинені іншими інфекціями, наприклад пастерельозом чи вірусом грипу, але при цьому тварини хворіють з низьким відсотком летальних випадків. Нервові ознаки іноді реєструються за класичної чуми свиней, особливо при атиповому перебігу, що ускладнює диференційну діагностику хвороби Ауескі. Нервові розлади, викликані хворобою Тешена, не супроводжуються інфекцією дихальних шляхів. Отруєння NaCl викликає збудження, а отруєння арсаніловою кислотою та ртуттю спричиняє млявість тварин, але це виявляється раптово та без гарячки. Парвовірусна інфекція може бути причиною репродуктивної дисфункції, саме тому, для підтвердження діагнозу на хворобу Ауескі необхідно обов'язково проводити лабораторні дослідження [19].

Отже, хвороба Ауескі характеризується ураженням центральної нервової системи у молодняка свиней, респіраторною патологією у старших тварин і репродуктивною дисфункцією у свиноматок, що значно ускладнює диференційну діагностику. З огляду на це, необхідною умовою успішної діагностики хвороби Ауескі є проведення комплексу заходів з урахуванням епізоотичної ситуації, порівнянням клінічних ознак і патологічних змін та проведенням лабораторних досліджень.

1.2. Лабораторна діагностика хвороби Ауескі

Лабораторну діагностику хвороби Ауескі проводять прямим та непрямим методами. До прямих методів відносять ізоляцію вірусу на культурі клітин та ідентифікацію вірусу з використанням полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Непрямі методи включають серологічні тести які направлені на виявлення специфічних до антигенів збуднику антитіл: реакція нейтралізації (РН) та імуноферментний аналіз (ІФА), тощо [38].

1.2.1. Ізоляція вірусу на культурі клітин

Зажиттєво вірус можна виділити зі слини, носових витікань та мазків з мигдалин у свиней. За посмертної діагностики кращими зразками є головний мозок, трійчастий нерв, мигдалини та легені. Зразки тканин гомогенізують у звичайному сольовому або клітинному культуральному середовищі з антибіотиками. Отриману суспензію центрифугують з низькою швидкістю, при 900 g упродовж 10 хвилин. Надосадову рідину використовують для зараження будь-якої чутливої культури клітин [38].

Існує велика кількість чутливих до збуднику хвороби Ауескі культур клітин, але зазвичай використовують клітинні лінії свинячої нирки (PK-15 або SK6). Середовище для культур має містити антибіотики такі як: пеніцилін, стрептоміцин, поліміксин, фунгізону, тощо, що дозволяє стабілізувати бактеріальний мікробіоз [27].

Слід відзначити, що вірус хвороби Ауескі викликає цитопатичний ефект, який зазвичай проявляється упродовж 24–72 годин, але може проявитись і пізніше, протягом 5–7 діб. У моношарі спостерігається скупчення двоосередкових клітин з подальшим повним відшаруванням клітинного листа. Також розвиваються синцитії, зовнішній вигляд і розмір яких є мінливими. За

відсутності очевидного цитопатичного ефекту зазвичай роблять один сліпий пасаж до подальших культур. За фарбування інфікованих клітинних культур гематоксиліном та еозином виявляють характерні герпесвірусні ацидофільні внутрішньоядерні включення із маргінацією хроматину. Ідентичність вірусу повинна бути підтверджена імунофлуоресцентним чи імуноферментним методами, реакцією нейтралізації або за допомогою ПЛР [38].

Таким чином, ізоляція вірусу на культурі клітин є ефективним але трудомістким методом лабораторної діагностики. Вірус хвороби Ауескі володіє цитопатичними властивостями, а також утворює специфічні ацидофільні внутрішньоядерні включення із маргінацією хроматину, що є діагностичними критеріями реплікації вірусу культурі клітин. Недоліками цього методу є те, що він потребує наявності чутливої системи клітин, специфічного обладнання та живильного середовища для її вирощування, а також ідентифікації вірусу.

1.2.2. Ідентифікація вірусу за допомогою полімеразно ланцюгової реакції

Метод полімеразної ланцюгової реакції заснований на селективній ампліфікації частини геному, який є унікальним для вірусу хвороби Ауескі, з використанням двох праймерів, розташованих на кожному кінці вибраної послідовності. Проведення діагностики методом ПЛР складається з 3-х основних етапів: екстракція нуклеїнових кислот, безпосередньо полімеразно-ланцюгова реакція та ідентифікація продуктів ампліфікації [38].

На першому етапі екстракцію ДНК проводять за допомогою стандартних процедур, що направлені на руйнування клітин протеїназою К та екстракцію нуклеїнових кислот за допомогою селікагелю чи магнітних кульок [15].

Полімеразно-ланцюгова реакція зазвичай проводиться в 30-50 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій: денатурація, відпал та елонгація. За першої стадії відбувається розпадання дволанцюгової ДНК на одноланцюгову

при дії високої температури (+94 - 96°C). Далі температура дещо знижується, що дозволяє праймерам зв'язатися з матричною ДНК, це стадія відпалу. Третя стадія ПЛР – елонгація, за якої відбувається реплікація матричної ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Постійно повторюючи етапи денатурації ДНК для отримання одноланцюгових шаблонів ДНК, гібридизації праймерів та синтезу комплементарних послідовностей з використанням термостабільної ДНК-полімерази, кількість цільової послідовності може бути збільшена до 10^6 разів [14]. Праймери повинні бути направлені на ампліфікацію послідовності, що ідентична серед штамів вірусу хвороби Ауескі, наприклад, використовують частини генів gB або gD, які кодують необхідні глікопротеїни [17, 33, 37].

Ампліфікований продукт може бути ідентифікований за його молекулярною масою, визначеною міграцією в агарозному гелі, з подальшим підтвердженням, шляхом секвенування ампліфікованого продукту. Більш новітні методи включають використання флуоресцентних зондів, пов'язаних із дією екзонуклеази та моніторингом збільшення продукту ампліфікації у в реальному часі, що дозволяє одночасно об'єднати два етапи: ампліфікацію та виявлення ДНК. Це збільшує швидкість та специфічність ПЛР-аналізу [36].

На сьогодні розроблені ПЛР у реальному часі, які можуть диференціювати вакцинні gE-негативні віруси, від вірусу епізоотичного типу на основі специфічного виявлення генів, що кодують gB та gE [14, 36].

Основною перевагою ПЛР у порівнянні із звичайними методами виділення вірусу - це його швидкість, оскільки результати дослідження можна отримати впродовж доби. Однак через високу чутливість тесту (до 10 геном еквівалентів) необхідно враховувати багато факторів, щоб уникнути контамінації зразків сторонніми ДНК від попередніх тестів та, як наслідок, отримання хибно-позитивного результату. З метою уникнення хибно-негативних результатів, необхідно використовувати внутрішні контрольні зразки, які забезпечують

контроль проведення ефективної екстракції ДНК та підтверджують відсутність інгібіторів ПЛР у кожному тесті [38].

Отже, ПЛР є високоспецифічним та високочутливим методом індикації збудників інфекційних захворювань. На сьогоднішній день для диференціації вакцинного вірусу від епізоотичного розроблені системи для ПЛР у реальному часі на основі виявлення специфічних генів, що кодують gB та gE збуднику хвороби Ауескі.

1.2.3. Реакція нейтралізації

Реакція нейтралізації (РН) ґрунтується на блокуванні антитілами інфекційної активності вірусу, тобто його здатності до реплікації в клітинах макроорганізму. При проведенні РН на культурі клітин результати зчитують за відсутності цитопатичної дії, бляшок та гемадсорбції [38].

РН в культурі клітин можна проводити декількома способами, які змінюються залежно від тривалості інкубації (наприклад, 1 година при +37°C або 24 години при +4°C) та наявності або відсутності комплементу. Більшість лабораторій використовують період інкубації в 1 годину при +37°C за відсутності комплементу, оскільки це сприяє більш швидкому отриманні результатів [28]. Однак чутливість можна підвищити шляхом збільшення інкубації до 24 годин при +4°C, що полегшує виявлення титру антитіл у 10–15 разів нижче, ніж за 1-годинного методу. РН не можна використовувати для диференціювання антитіл поствакцинального походження від постінфекційного [27].

Для тесту використовуються клітини, чутливі до зараження вірусом хвороби Ауескі. Це можуть бути клітинні лінії РК-15, SK6, MDBK, первинні та вторинні клітинні культури свинячої нирки. Середовище для культури клітин залежить від типу клітин. Так, середовище для клітин РК-15 - це мінімальне

есенціальне середовище Ігла з додаванням 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби та антибіотиків, пеніцилін і стрептоміцин, або гентаміцин [38].

Відповідний штам вірусу хвороби Ауескі зберігають за температури нижче -65°C або у ліофілізованому вигляді при $+4^{\circ}\text{C}$ [27].

Для приготування суспензії вірусної сировини, ростове середовище видаляють з моношару клітин. Додають близько 1 мл вихідної суспензії вірусу відомого титру (приблизно 10^7 TCID₅₀/мл) та інкубують при температурі $+37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ упродовж 1 години. Після інкубації додають 30 мл середовища для культур і знову інкубують при $+37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Матрац з суспензією оглядають якомога часто, до тих пір поки 75% клітин не зруйнуються. Цей процес може тривати близько 36–48 годин. Потім середовище заморожують за температури -65°C або нижче, щоб зруйнувати клітини. Надалі матрац з культурою клітин розморожують та струшують. Середовище збирають і центрифугують при 1500 g упродовж 15 хвилин. Надосадову рідину розділяють по 0,5 мл у невеликі пробірки типу «Eppendorf», які маркують та зберігають за температури -65°C і нижче [38].

Титрування вихідної суспензії проводять за методом Reed & Muench [24] або Kärber [12], а титр виражається на 50 мкл або на 1000 мкл.

Тест на РН вимагає використання внутрішньої референтної сироватки для контролю якості з відомим титром нейтралізуючих антитіл і негативної контрольної сироватки [27].

Перед проведенням дослідження сироватки нагрівають до температури $+56^{\circ}\text{C}$ упродовж 30 хвилин, що сприяє інактивації термолабільних неспецифічних інгібіторів [38].

РН має два варіанти виконання. У першому методі встановлюють титр віруснейтралізуючих антитіл у досліджуваній сироватці, показником якого є те розведення сироватки, що блокує 50% вірусу в зараженій культурі клітин. За другого методу постановки РН використовують також негативну сироватку, що

дозволяє визначити індекс нейтралізації, який показує у скільки разів досліджувана сироватка знижує титр вірусу у порівнянні з нормальною. [40].

Отже, перевагами РН є універсальність тесту та висока специфічність, а недоліками – трудомісткість процесу, висока вартість живих біологічних систем, необхідність суворого дотримання стерильності матеріалів, посуду та інструментів, неможливість використання тесту для диференціації інфікованих від вакцинованих тварин [39].

1.2.3. Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ІФА / ELISA) ґрунтується на імунологічній реакції антигену зі специфічним антитілом з утворенням комплексу антиген-антитіло. Антиген адсорбований в лунках мікропланшету, зв'язується зі специфічними антитілами, які присутні в сироватці крові. Отриманий імунний комплекс ідентифікується кон'югатом, фермент якого, після додавання субстрату, викликає розпад останнього з утворенням забарвленого продукту. За допомогою імуноферментного аналізатора спектрофотометрично зчитується результат реакції [10].

Метод ІФА має ряд переваг, таких як, специфічність, високу чутливість, точність, швидкість проведення, автоматизована оцінка реакції, не вимагає спеціальних умов у лабораторії. До недоліків цього методу відносять виникнення неспецифічних крос-реакцій, виявляє лише вторинні ознаки інфекційного процесу, а не самого збудника, для синтезу специфічних імуноглобулінів необхідно від 3 до 14 діб [6].

У залежності від антигену, що нанесений на лунках планшету, деякі з цих тест-наборів можна використовувати при диференціації інфікованих від вакцинованих тварин. Така диференціація можлива лише за використання маркованої вакцини проти хвороби Ауескі. Згідно Українського законодавства

на території України для профілактики хвороби Ауескі можна використовувати лише зареєстровані gE-негативні вакцини. Вакцини такого типу індують синтез антитіл до всіх глікопротеїнів вірусу хвороби Ауескі, окрім gE, що дозволяє застосовувати дискримінаційні тести за боротьби з хворобою. Тварини, що містять антитіла до gB та gE антигенів вірусу хвороби Ауескі є інфікованими. Свиней, які містять антитіла до антигенів gB, а за gE серонегативні, вважають імунними та вільними від епізоотичного вірусу хвороби Ауескі [6, 10].

Отже, ІФА є високотехнологічним методом, який дозволяє диференціювати інфікованих свиней від вакцинованих шляхом виявлення специфічних антитіл до gB та gE вірусу хвороби Ауескі у сироватці крові тварин.

Підсумовуючи вищенаведене, можна зробити висновок, що лабораторна діагностика хвороби Ауескі базується на індикації збудника та виявленні специфічних до його антигенів імуноглобулінів. Ізоляція вірусу на культурі клітин та реакція нейтралізації є трудомісткими методами, які не дозволяють диференціювати вакцинний штам вірусу від епізоотичного. Методи полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментний аналіз мають ряд переваг, таких як, специфічність, чутливість, технологічність, швидкість виконання, а також дозволяють диференціювати інфікованих свиней від вакцинованих за специфічними маркерами - gB та gE антигенами вірусу хвороби Ауескі., що є головним критерієм у діагностиці та оздоровленні стада від хвороби Ауескі.

1.3 Профілактика хвороби Ауескі.

Стратегія профілактики хвороби Ауескі базується на заходах, що включають у себе проведення стемпінг-ауту серед тварин у інфікованих стадах (видалення інфікованих тварин зі стада), специфічну імунопрофілактику або комбінацію вищенаведених заходів з обов'язковим дотриманням заходів

біобезпеки [30]. Обмежуються перегрупування свиней, посилюється контроль за проведенням знезараження та дезінфекції обладнання та матеріалів, дотримання норм санітарної-гігієни та біологічної безпеки серед обслуговуючого персоналу, проведення дезінсекції та дератизації. Не допускається наявність на території господарства собак та котів, оскільки вони можуть бути інфіковані вірусом, відповідно бути джерелом розповсюдження [19].

Основні заходи контролю хвороби Ауескі залежать від епізоотологічної ситуації, виявленої в кожній країні чи районі:

1. У країнах, благополучних щодо хвороби Ауескі, депопуляція інфікованого стада є єдиним вибором та супроводжується дотриманням суворих заходів щодо безпеки та профілактики [21].

2. У країнах чи районах, які неблагополучні щодо хвороби Ауескі, необхідно систематично проводити імунопрофілактику проти збудника з застосуванням маркованих вакцин в рамках диференціації інфікованих від вакцинованих тварин щонайменше 3 роки. Всім племінним тваринам, а також основним свиноматкам та кнурам на фермах необхідно регулярно проводити вакцинацію, до зменшення кількості інфікованих тварин за 10% серед тварин основного стада та жодної серопозитивної свині у товарному стаді. Проведення інтенсивного скринінгу свиней на виявлення епізоотичного штаму вірусу хвороби Ауескі за допомогою дискримінаційних тестів та вчасне видалення інфікованих свиней сприяє формуванню благополучного щодо хвороби Ауескі стада [21].

3. У країнах, в яких вакцинація не супроводжується видаленням позитивних тварин, програма специфічної імунопрофілактики має вирішальне значення для боротьби з хворобою. Вакцинація проти вірусу хвороби Ауескі сприяє «стримуванню» проявів типових клінічних ознак без ерадикації збудника [20].

Загалом, проведення вакцинопрофілактики зменшує кількість клінічних проявів хвороби Ауескі, але не зупиняє поширення збудника та розвиток латентної форми захворювання індукованої епізоотичним штамом вірусу. Метою проведення вакцинації в рамках стратегії ерадикації хвороби Ауескі є не лише забезпечення захисту від прояву клінічних ознак, а й насамперед переривання епізоотичного ланцюгу шляхом блокування розповсюдження збуднику всередині стада та між стадами, що досягається шляхом створення групового імунітету [17].

У господарствах, які є неблагополучними за хвороби Ауескі рекомендовано вакцинувати всіх новозавезених тварин перед зняттям з карантину, щоб попередити спалах хвороби, наряду з тваринами основного стада, які повинні підлягати систематичній імунізації [20, 21].

Відомо, що після народження поросята з молоком матері отримують необхідні речовини, які забезпечують захист поросят. Основним фактором колострального імунного захисту є – глобуліни [13, 31]. Зосереджуючись на слизових оболонках, у поверхневих шарах шкіри та лімфатичних вузлах антитіла обумовлюють неспецифічний імунітет, основними функціями якого є перешкоджання потрапляння та розмноження збудника в організмі тварин.

Механізм власного специфічного імунного захисту активується під дією антигенної стимуляції та обумовлюється взаємодією імунних клітин з антигенами збуднику [27].

За повідомленнями Pensaert M. B. та ін., [22] і Van Oirschot J. T. та ін. [33] материнські антитіла до вірусу хвороби Ауескі циркулюють в організмі поросят упродовж 8 - 14 тижнів життя, що сприяє імунному захисту поросят у перші тижні від народження. Слід зауважити, що імунізація свиней з високим рівнем специфічних антитіл сприяє зниженню ефективності імунопрофілактики. Цей феномен пояснюється здатністю антитіл блокувати вакцинний вірус та елімінувати його з організму. На тлі цього, тварини з часом, стають

неімунними, що сприяє їх інфікуванню епізоотичним штамом вірусу. За повідомленням Rejsak Z. K. and Truszczyński M. J. [21] поросят народжених від імунізованих свиноматок необхідно вакцинувати у віці 10-14 тижнів життя, а тих, що народились від невакцинованих свиноматок – у 6-10 тижнів. З огляду на це, актуальним є встановлення оптимального часу для вакцинації молодняку свиней шляхом визначення тривалості колострального імунітету.

Для проведення імунопрофілактики хвороби Ауескі з успіхом застосовують, як живі (атенуйовані), так і вбиті (інактивовані) вакцини. Згідно ветеринарного законодавства України, імунопрофілактика хвороби Ауескі базується на використанні маркованих gE-негативних вакцин проти хвороби Ауескі та одночасним застосуванням дискримінуючих діагностичних тестів для виявлення інфікованих епізоотичним вірусом свиней [10]. Такі вакцини складаються з вірусного матеріалу в якому штучно видалили специфічний ген, що кодує глікопротеїн gE, який визначає вірулентність вірусу. При цьому цей білок не відповідає за індукцію протективної імунологічної відповіді [5].

Існує декілька схем імунопрофілактики хвороби Ауескі, які різняться між собою за засобом, методом та часом імунізації. За однією з таких схем використання живої маркованої вакцини для поросят рекомендовано, одноразово у 14 діб життя, а за високої загрози інфікування - ревакцинувати через 2 тижні. За іншої схеми, використовують інактивовану gE-негативну вакцину методом масової вакцинації тричі на рік. Поросят рекомендовано щеплювати дворазово у віці 6-8 тижнів з інтервалом у 3-4 тижні. За наявності високої загрози раннього інфікування перше щеплення проводять у віці 15 діб з ревакцинацією через 3-4 тижні. Ремонтний молодняк щеплюють за два місяці до опоросу та ревакцинують через 3-4 тижні. Деякі схеми вакцинопрофілактики хвороби Ауескі передбачають використання інтраназальної імунізації тварин. При загрозі раннього інфікування (до 10 тижнів життя), на тлі з парентеральної вакцинації у віці 6-8 і 9-12 тижнів, поросят на 2-3-й тиждень життя

інтраназально вводять по 1 мл вакцини. Інтраназальний метод введення вакцинного антигену сприяє індукції місцевого імунітету, що захищає організм від потрапляння та розмноження збудника [17].

Отже, стратегія профілактики хвороби Ауескі полягає у проведенні стемпінг-ауту інфікованих стад із одночасним застосуванням програм специфічної імунопрофілактики та обов'язковим дотриманням заходів біобезпеки.

Підсумовуючи вищенаведене можна зробити висновок, що вірус хвороби Ауескі є висококонтагіозним, що обумовлено інфікуванням до 100% стада. Летальність досягає 100% серед поросят підсисного періоду та знижуються з віком. Серед клінічних ознак виділяють нервові розлади, респіраторну та репродуктивну патології, що призводять зниження показнику збереження поросят, недоотримання приростів та приплоду. Діагностика захворювання має бути комплексною з урахуванням епізоотичної ситуації, клінічних ознак, патологічних змін та лабораторних досліджень. При проведенні діагностики хвороби Ауескі слід враховувати мінливість клінічних ознак, що обумовлено наявністю вторинних вірусних та бактеріальних інфекцій. З огляду на це необхідною умовою успішної діагностики хвороби Ауескі є проведення лабораторного дослідження. На сьогодні лабораторні методи ПЛР та ІФА вважаються найбільш ефективними та обґрунтованими методами лабораторної діагностики, які дозволяють ефективно сформувати та контролювати схему профілактичних заходів, що ґрунтуються на ідентифікації та видаленні інфікованих тварин зі стада, проведенні специфічної імунопрофілактики із застосуванням gE-негативної вакцини та дотриманням правил біобезпеки.

2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали і методи дослідження

Лабораторні дослідження проводили на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету лабораторії імунохімії та молекулярно-генетичного аналізу. Експериментальні дослідження проводили на базі свинокомплесу, що налічував близько 11000 голів свиней.

Для проведення досліду було сформовано 3 аналогічні групи свиней – контрольна та дві дослідні, по 220 поросят у кожній (рис.1).

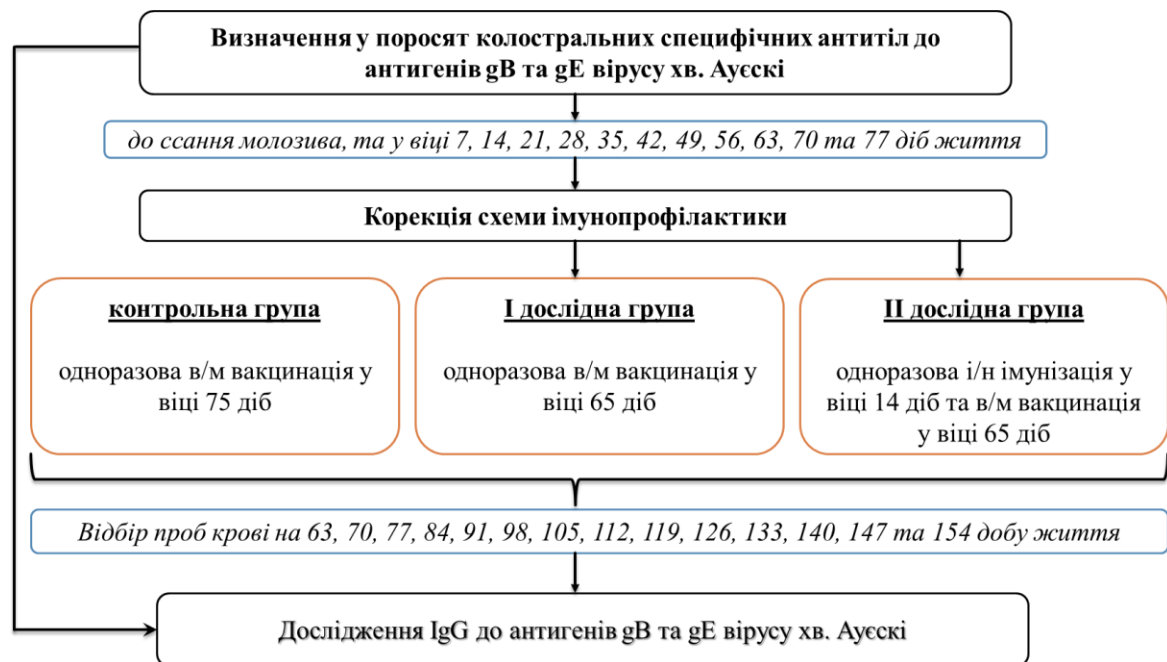


Рис. 1. Загальна схема проведення досліджень.

Свиноматки, від яких отримано поросят, парентерально імунізовані проти хвороби Ауєскі вакциною «Адівак» у дозі 2 мл, методом масової вакцинації 3 рази на рік. Поросят контрольної групи парентерально щеплювали вакциною «Адівак» у віці 75 днів життя, згідно з планом лікувально-профілактичних заходів на підприємстві. Поросят першої дослідної групи парентерально

щеплювали у віці 65 діб життя. А тварин другої дослідної групи на 14 добу життя імунізували інтраназально вакциною «Адівак +» у дозі 1 мл в кожному ніздрю та внутрішньом'язово у віці 65 діб життя.

Вакцина «Адівак» - інактивована маркована gE- негативна вакцина проти хвороби Ауєскі. В своєму складі містить штам „77/3В" (клон штаму Barta K61) ≥ 8 Іг ТЦД50 в мл до інактивації. Вакцина «Адівак +» - атенуйована маркована gE- негативна вакцина проти хвороби Ауєскі. У своєму складі містить штам "КБ" (штам Барта K61) ≥ 105 ТЦД50.

Для дослідження колострального імунітету поросят відбирали сироватку крові: одразу після народження – до ссання свиноматки, та у віці 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 та 77 діб життя, по 7 проб з кожної вікової групи. Для визначення формування поствакцинального імунітету поросят контрольної, першої та другої дослідних груп відбирали сироватку крові на 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112, 119, 126, 133, 140, 147 та 154 добу життя, по 7 проб від кожної вікової групи.

Всі зразки сироваток крові від поросят відбирали рандомно.

Наявність антитіл до антигенів gB та gE вірусу хвороби Ауєскі визначали за допомогою конкурентного імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізатор-фотометрі BioTek ELx800 (США) із використанням тест-систем «ID Screen Ayjeszky gB Antibody Competition» та «ID Screen Ayjeszky gE Antibody Competition» («ID vet» Франція) (додатки 1-5).

Для первинної обробку матеріалу та готування зразків механічним дозатором зі змінним об'ємом, зразок крові поміщали у центрифужні пробірки та центрифугували 10 хвилин при 1200 об/хв. Для кожного зразку використовувати окремий одноразовий накінцівник. Надалі відібрали 0,1 мл сироватки крові у мікропробірку об'ємом 0,5 мл та маркірували зразки.

Перед початком роботи реактиви, розчини, полістеролові стрипи та зразки витримували за кімнатної температури 20-30 хв. Надалі готували необхідну для

дослідження кількість робочого розчину для промивання та необхідну кількість стрипів, як поміщали одразу в окрему плашку.

Специфічні імуноглобуліни до антигену gB вірусу хвороби Ауескі виявляли у діагностичному титрі 1:4. У лунки, що відведені для контрольних та досліджуваних зразків вносили по 75 мкл буферного розчину та по 25 мкл позитивного, негативного контролів і досліджуваних зразків сироваток крові.

Специфічні імуноглобуліни до антигену gE вірусу хвороби Ауескі виявляли у діагностичному титрі 1:5. Для цього у лунки, що відведені для контрольних та досліджуваних зразків вносили по 80 мкл буферного розчину та по 20 мкл позитивного, негативного контролів і досліджуваних зразків сироваток крові.

Надалі всі етапи були спільними за виявлення специфічних антитіл до антигену gB та gE вірусу Ауескі.

Заповнений мікропланшет поміщали до термошейкеру за температури 21°C на 16-18 годин для інкубації. За 10 хв. до кінця інкубації готували робочий розчин кон'югату.

Після закінчення інкубації мікропланшет поміщали до автоматичної мийки для мікропланшетів BioTek ELx50 з метою проведення. Промиті лунки обережно вибивали на бавовняному рушнику чи серветці для максимального вилучення рідини з лунок. Готовий робочий розчин кон'югату вносили по 100 мкл у кожен лунку мікропланшету. Стрипи з кон'югатом поміщали у термошейкер для інкубації за температури 37°C протягом 30 хв. Після закінчення інкубації лунки знову відмивали розчином для промивання в автоматичній мийці для мікропланшетів BioTek ELx50 і потім до кожної лунки вносили по 100 мкл субстратного розчину та поміщали у термошейкер для інкубації при температурі 18-26°C протягом 15 хв. Після закінчення інкубації у лунки з субстратним розчином додати по 100 мкл стоп-реактиву і залишали на 3-5 хв при кімнатній температурі для повного зупинення реакції.

Мікропланшет поміщали у каретку імуноферментного аналізатора-фотометра ELx800 та зчитували оптичні щільності кожної з лунок за допомогою комп'ютерної програми при довжині хвилі 450нм.

Розрахунок показнику S/N проводили за формулою:

$$S/N = \text{Ощ зразку} : \text{Ощ К-} * 100\%$$

де:

Ощ. К- – середнє значення оптичної щільності негативного контрольного зразку;

Ощ. зразку – середнє значення оптичної щільності досліджуваного зразку.

Згідно інструкції до набору gB, зразок вважали позитивним при значенні показнику S/N менше або дорівнює 30%.

Згідно інструкції до набору gE, зразок вважали позитивним при значенні показнику S/N менше або дорівнює 60%.

Рівень антитіл до антигену gB та gE вірусу хвороби Ауескі у сироватці крові свиней, згідно постанови до тест-систем є обернено пропорційним значенню S/N.

Дослідження з використанням тварин проведені в рамках «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що були схвалені Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2001 р.) та узгоджені з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин», які використовуються наукових цілей (м. Страсбург, 1985 р.).

Отримані результати статистично обробляли з використанням пакету аналізу даних Microsoft Excel. Проводили розрахунок середнього арифметичного (M) та похибку (m). Вірогідність різниці між групами визначали зі критерієм Стьюдента: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

2.2. Характеристика Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету (далі НДЦ) був створений за наказом ректора університету №1484 від 14 липня 2008 року у відповідності з рішенням Вченої ради (протокол №8) та відкритий на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин факультету ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ. Директором центру є кандидат ветеринарних наук, професор ДДАЕУ Масюк Д. М.

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету сертифікований Українським біологічним центром сертифікації на відповідність технічної компетентності щодо вимірювальних процесів (№ LB 13/2019 від 26.12.2019 р.) і акредитований Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок (№ 027/вир. лаб. від 11 серпня 2017 року) на проведення аналітичних і випробувальних досліджень морфологічних і біохімічних досліджень крові, фізико-хімічних показників сечі, хіміко-токсикологічних показників кормів, кормових добавок, патоморфологічних і бактеріологічних досліджень та визначення ГМО методом ПЛР.

НДЦ складається з наступних відділів:

- науково-методичний;
- фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу;
- бактеріології та біотехнології;
- морфологічних досліджень;

- імунохімічного та молекулярно-генетичного аналізу.

Кожен з відділів НДЦ обладнаний сучасними приладами та реактивами, які необхідні для вирішення завдань, що стоять перед науково-дослідним центром.

Інформаційно-аналітичний відділ проводить прийом та реєстрацію зразків матеріалу, що надійшов до НДЦ, оформлення всіх супутніх документів, видачу результатів замовнику.

Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу складається з лабораторії клінічної біохімії, де проводяться морфологічні та біохімічні дослідження крові і сечі та лабораторії хіміко-токсикологічних досліджень в якій у біологічних субстратах визначається вміст мікотоксинів, пестрицидів, мінеральних речовин, амінокислот, вітамінів, сирого протеїну, жиру, клітковини, тощо.

Основним завданням відділу бактеріології та біотехнології є діагностика інфекційних хвороб тварин за допомогою класичних бактеріологічних методів. Наукові працівники відділу проводять культивування, індикацію та ідентифікацію мікроорганізмів з подальшим встановленням їх чутливості до різних антибіотиків, а також здійснюють контроль за ефективністю дезінфекції, проводять ветеринарно-санітарні дослідження кормів, води та харчових продуктів.

У відділі морфологічних досліджень за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів проводять діагностику хвороб тварин і визначають їх імунний статус, також проводять мікроструктурний аналіз кормів, м'яса та м'ясних продуктів для встановлення їх якості та відповідності вимогам нормативних документів.

Відділ імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень у своєму складі містить лабораторію імунохімії та лабораторію ПЛР-діагностики. В останній проводять дослідження біологічних субстратів на виявлення генетичного матеріалу збудників інфекційних хвороб та дослідження генно-

модифікованих організмів, що можуть входити до складу різних продуктів і кормів.

У лабораторії імунохімії проводять дослідження методом імуноферментного аналізу на визначення специфічних імуноглобулінів у сироватці чи плазмі крові, молозиві та молоці різних видів тварин, антигенів збудників інфекційних захворювань у біологічних рідинах організму та тканинах органів-мішеней. Для виконання поставлених завдань лабораторія оснащена сучасним обладнанням та реактивами: для зберігання зразків досліджуваного матеріалу – морозильною камерою з температурним режимом від -18°C до -20°C ; для зберігання реактивів – холодильною камерою з температурним режимом від $+8^{\circ}\text{C}$ до $+2^{\circ}\text{C}$; двома термо-шейкерами з твердотільним термоблоком для перемішування та витримування при певних температурах полістеролових планшетів для ELISA; для проведення промивання полістеролових лунок при проведенні ІФА - автоматичною мийкою БіоТек ELx50; для зчитування оптичної щільності забарвлених розчинів у лунках полістиролових планшетів - імуноферментним аналізатором-фотометром БіоТек ELx800, що обладнаний фільтрами з довжиною хвилі 405, 450, 490, та 630 нм; для дозування дослідного матеріалу та реактивів - набором одно- та восьмиканальних дозаторів з перемінним об'ємом і штативами для них та витратними матеріалами: наконечники для дозаторів різного об'єму, пробірки типу Eppendorf об'ємом 1,5 та 0,5 мл, титр-трубки, гумові рукавички, робочі штативи для мікропробірок, ванни для приготування та використання робочих розчинів та інше.

Всі прилади, що використовуються в НДЦ технічно справні, мають паспорт і робочу інструкцію з експлуатації, до роботи з ними допускають лише спеціально навчений персонал.

Стіни та підлога кожного відділу вкриті вологостійким матеріалом для забезпечення проведення ретельної дезінфекції кожного приміщення НДЦ.

Для утилізації залишків дослідного матеріалу та використаного витратного матеріалу у НДЦ обладнана автоклавною кімнатою з автоклавом об'ємом 65 л.

Отже, можна зробити висновок, що Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету обладнаний необхідними сучасними приладами і реактивами та сертифікований на проведення відповідних лабораторних досліджень.

2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз

2.3.1. Визначення колостральних IgG до антигенів gB та gE вірусу хвороби Ауескі

У результаті проведеного дослідження встановлено, що поросят до ссання молозива не містять специфічних антитіл до антигенів вірусу хвороби Ауескі. Це вказує на відсутність трансплацентарного інфікування поросят збудником. Надалі 100% поросят до 10-тижневого віку мають високий рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику хвороби Ауескі, рівень який починає знижуватись з 49 доби життя (таблиця 1).

Таблиця 1

Рівень специфічних антитіл до антигенів gB збуднику хвороби Ауескі у крові свиней перших 77 діб життя (M±m, %, n=7)

Доба життя	Серопозитивних тварин	S/N	CV
0	0	74,14±5,17	18
7	100	7,00±0,62	23
14	100	7,43±0,75	27
21	100	6,14±0,51	22
28	100	8,29±0,87	28
35	100	11,43±1,39	32
42	100	7,71±0,87	30
49	100	6,43±0,65	27
56	100	12,57±1,19**	25
63	100	18,57±1,07***	15
70	100	17,14±1,01***	16
77	71	36,43 ±6,77***	49

Примітка: *-p≤0,05, **-p≤0,01, ***-p≤0,001 порівняно до значень поросят 7 доби життя

Порівнюючи результати дослідження сироваток крові від поросят вікових груп від 7 до 49 діб життя встановлено, що вміст специфічних антитіл до глікопротеїну В збудника хвороби Ауескі у крові цих вікових груп суттєво не відрізняється і знаходиться на достатньо високому рівні.

У цей час середнє значення показнику S/N знаходиться в діапазоні від 6% до 11%, а показник CV коливається у межах 22-32%, що вказує на високий і гомогенний рівень специфічних до gB антигену антитіл та сформований груповий імунітет, який, більш за все, має колостральне походження.

Досліджуючи зразки крові від старших вікових груп свиней встановлено, що на 56 добу життя тварини мають на 49% ($p \leq 0,01$) більше значення показнику S/N в порівнянні з поросятами 49 доби життя. У тварин віком 63 та 70 діб життя цей показник збільшився у середньому на 30% порівняно до значень тварин 56 доби життя.

Слід зауважити, що згідно інструкції до тест-системи рівень антитіл є обернено пропорційним показнику S/N. Зважаючи на це можна зробити висновок, що збільшення показнику S/N свідчить про зниження рівню специфічних імуноглобулінів у крові тварин починаючи з 56 доби життя.

Середній показник S/N тварин вікової групи 77 діб життя збільшився на 53% порівняно зі значеннями тварин на 70 добу життя та на 81% - зі значеннями у свиней на 7 добу життя. Слід відзначити, що серед поросят 77-добового віку 29% тварин не містять специфічних імуноглобулінів до gB вірусу хвороби Ауескі в діагностичному титрі 1:4, що більш за все обумовлено природним катаболізмом колостральних антитіл. Такі зміни показнику S/N вказують на формування «серологічного вікна», що може обумовлювати інфікування поросят епізоотичним штамом збудника хвороби Ауескі.

Отже, колостральний імунітет до антигенів gB вірусу хвороби Ауескі у діагностичному титрі 1:4 зберігається до 70 доби життя у 100% поросят. З 56

доби життя рівень специфічних антитіл поступово знижується і вже на 77 добу від народження з'являються серонегативні тварини.

Дослідження сироваткових антитіл IgG до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі у поросят перших 77 діб життя вказують на те, що поросят до ссання молозива не містять специфічних антитіл до антигенів вірусу хвороби Ауескі. Це свідчить про відсутність трансплацентарного інфікування поросят збудником. Надалі виявлено, що 100% поросят до 10 тижневого віку містять специфічні антитіла (таблиця 2).

Таблиця 2

Рівень специфічних антитіл до антигенів gE збуднику хвороби Ауескі у крові свиней перших 77 діб життя (M±m, %, n=7)

Доба життя	Серопозитивних тварин	S/N	CV
0	0	87,29±2,36	7
7	100	6,43±1,81	27
14	100	6,29±1,08	41
21	100	7,43±0,81	28
28	100	11,14±1,55	38
35	100	6,86±1,34	48
42	100	9,29±1,11	35
49	100	22,43±2,77***	31
56	100	27,57±7,22*	63
63	100	22,29±10,68	104
70	100	31,14±9,37*	68
77	71	32,43±10,25*	97

Примітка: *-p≤0,05, **-p≤0,01, ***-p≤0,001 порівняно до значень поросят 7 доби життя

Порівнюючи показник S/N встановлено, що його значення достовірно не відрізняється між віковими групами тварин з 7 до 42 доби життя і коливається у межах 6-11%. Середнє значення показнику CV складає близько 36%, що вказує на високий і гомогенний рівень антитіл та сформований груповий імунітет.

Починаючи з 49 доби життя середній показник S/N збільшується на 59% в порівнянні з показником тварин 42 доби життя та на 71% ($p \leq 0,001$) порівняно з показниками поросят 7 доби життя. Серед тварин віком 77 діб життя виявлено збільшення середнього показнику S/N на 30% порівняно з тваринами 49-доби життя, що обумовлено наявністю у цій віковій групі двох серонегативних тварин.

Слід зауважити, що свиноматки, від яких отримано поросят, імунізовані gE-негативною вакциною проти хвороби Ауескі. З огляду на те, що виявлені антитіла більш за все мають колостральне походження, можна зробити припущення, що свиноматки інфіковані епізоотичним штамом вірусу хвороби Ауескі. Останнє вказує на його циркуляцію серед тварин основного стада.

Отже, дослідні поросята мають високий рівень колостральних антитіл до антигенів gE збудника хвороби Ауескі, що поступово знижується з 49 доби життя але зберігається у 100% тварин до 70-добового віку, а вже на 77 добу життя виявлено 29% серонегативних свиней. За хвороби Ауескі у поросят формується специфічний лактогенний імунітет який зберігається у 100% тварин до 10-тижневого віку. З 11 тижня життя виявлено серонегативних тварин, які утворюють «серологічне вікно», що обумовлює сприйнятливність цих тварин до дії епізоотичного штаму вірусу.

2.3.2 Рівень специфічних антитіл IgG до антигенів gB вірусу хвороби Ауескі за специфічної імунопрофілактики

У результаті проведеного дослідження визначено вікову динаміку специфічних антитіл до антигенів gB збудника хвороби Ауескі на тлі застосування різних схем імунопрофілактики (таблиця 3).

Таблиця 3

Рівень специфічних антитіл до антигенів gB вірусу хвороби Ауескі у крові свиней різних вікових груп за активної імунопрофілактики ($M \pm m$, %, $n=7$)

Доба життя	Група тварин								
	Контрольна			I дослідна			II дослідна		
	пози- тивних тварин	S/N	CV	пози- тивних тварин	S/N	CV	пози- тивних тварин	S/N	CV
63	100	15,57±1,36	23	100	13,86±1,72	33	100	16,86±0,94	15
70	100	17,57±1,89	28	100	15,29±1,51	26	100	16,71±2,49	39
77	71	37,57±8,00	56	100	13,29±1,52*	30	100	14,57±2,72*	49
84	100	6,57±0,84	34	100	12,71±1,58**	33	100	12,14±1,22**	27
91	100	5,43±1,21	59	100	12,43±1,09**	23	100	10,71±1,30*	32
98	100	11,29±2,69	63	100	10,14±1,06	27	100	9,14±1,22	35
105	100	8,71±1,29	39	100	8,00±2,06	68	100	8,57±1,07	33
112	100	9,86±2,03	54	100	7,29±0,68	25	100	7,57±1,31	46
119	100	13,14±2,66	54	100	6,43±0,43	18	100	7,29±0,68	25
126	100	10,86±2,44	60	100	8,57±1,19	37	100	9,57±1,13	31
133	100	10,43±2,11	54	100	8,29±1,08	35	100	7,71±1,46	50
140	100	5,86±1,45	66	100	8,43±1,21	38	100	8,14±1,58	51
147	100	9,00±1,72	51	100	7,57±0,65	23	100	8,00±1,69	56
154	87	12,29±2,25	91	100	7,43±2,75*	27	100	7,29±0,84*	30

Примітка: *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$, ***- $p \leq 0,001$ порівняно до значень тварин контрольної групи

Встановлено, що 100 % тварини контрольної групи з 63 по 77 доби життя мають специфічні антитіла рівень яких поступово знижується на кінець 11 тижня від народження, що вказує на їх колостральне походження. Надалі у тварин контрольної групи віком 84 доби життя відмічається зниження показнику S/N більше ніж у 5,5 разів порівняно з показниками отриманими у 77-добовому віці, що більш за все обумовлено парентеральною імунізацією цих тварин проти хвороби Ауескі на 80 добу життя.

У подальшому рівень антитіл до gB вірусу хвороби Ауескі у крові 100% поросят зберігається на високому рівні до 147 доби життя, на що вказує низьке значення показнику S/N, який коливався у тварин контрольної групи в межах 5-15%. Починаючи з 154 доби життя у поросят виявлено високі значення показнику S/N, що обумовлено появою у групі серонегативних тварин.

Отже, після парентеральної імунізації у свиней контрольної групи рівень антитіл до gB вірусу хвороби Ауескі збільшився на 84 добу життя і залишився на цьому рівні до 147 доби. Починаючи з 154 доби життя виявлено серонегативних тварин, що вказує на зниження групового імунного захисту серед тварин цієї групи.

Порівнюючи різні схеми імунізації тварин проти хвороби Ауескі встановлено, що 100% тварин першої та другої дослідної груп у віці 63 та 70 діб життя мають високий рівень показнику S/N за виявлення специфічних антитіл до gB вірусу хвороби Ауескі, який достовірно не відрізняється від показників тварин контрольної групи. На 77 добу життя рівень показнику S/N поросят першої та другої дослідних груп достовірно ($p \leq 0,05$) відрізняється від показників контрольної групи. Це може бути обумовлено проведенням парентеральної імунізації тварин дослідних груп у більш ранньому віці. Надалі, серед тварин дослідних груп відмічається поступове зниження показнику S/N з досягненням мінімальних значень на 98 добу життя, що вказує на збільшення рівню специфічних антитіл. Слід відзначити, що показники S/N у тварин першої

та другої дослідних груп віком 84 доби життя на 48% ($p \leq 0,01$) та 56% ($p \leq 0,01$) відповідно і на 91 добу життя на 46% ($p \leq 0,01$) та 49% ($p \leq 0,05$) відповідно вищі порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Порівнюючи результати отримані за дослідження проб сироватки крові від поросят дослідних груп віком від 98 до 147 доби життя на виявлення специфічних антитіл до антигенів gB збуднику хвороби Ауескі не встановлено значних змін у рівні показнику S/N, що вказує на наявність високих гомогенних рівнів антитіл та сформований груповий імунітет, також, не виявлено достовірної відмінності порівняно з показниками тварин контрольної групи у цьому віці. Значення показнику S/N у тварин першої та другої дослідних груп віком 154 доби життя нижче відповідно на 60% та 59% ($p \leq 0,05$) порівняно зі значенням показнику тварин контрольної групи, що обумовлено наявністю у контрольній групі 13% серонегативних тварин.

Таким чином, свині першої та другої дослідних груп після проведення імунопрофілактики мають специфічні антитіла до антигенів gB вірусу хвороби Ауескі, рівень яких поступово збільшується та досягає максимальних значень на 98 добу життя і тримається на цьому рівні до 154 доби від народження. За другої та третьої схеми імунопрофілактики хвороби Ауескі показники S/N достовірно відрізняються в критичних вікових періодах з 77 по 91 добу життя та на 154 добу життя порівняно з показниками контрольної групи за першої схеми імунопрофілактики.

Порівнюючи данні ступеню дисперсії показнику S/N, що отримано за дослідження сироваток крові від тварин контрольної та дослідних груп на тлі проведення імунопрофілактики за різними схемами не виявлено достовірної різниці між групами (рис. 2).

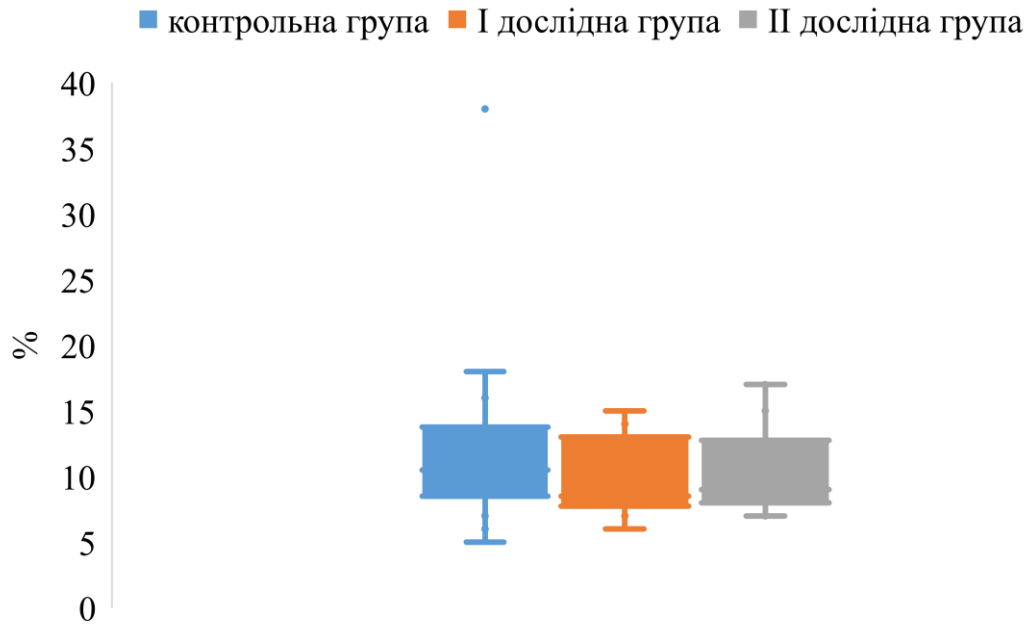


Рис. 2. Дисперсія показнику S/N контрольної та дослідних груп при визначення специфічних антитіл до gB збуднику хвороби Ауескі у крові свиней різного віку за активної імунопрофілактики

Встановлено, що верхній кватиль діаграми контрольної групи свиней знаходиться у межах 14%, а нижній – 8%. Максимальне значення показнику контрольної групи сягає 19%, тоді як мінімальний показник складає 5%. Вищенаведені данні вказують на низький рівень розмаху значень показнику S/N у тварин контрольної групи. Однак, слід відзначити, що серед тварин контрольної групи містяться викиди на рівні 40%, що обумовлено гетерогенним рівнем антитіл, на тлі наявності серонегативних тварин у контрольній групі.

Порівнюючи ступінь дисперсії показнику S/N між тваринами першої, другої дослідної та контрольної груп встановлено, що вірогідних відмінностей не виявлено.

Таким чином, рівень дисперсії показнику S/N першої та другої дослідних груп суттєво не відрізняється від значень тварин контрольної групи. У той же

час, контрольна група має викиди, що вказує на наявність серонегативних тварин.

Аналізуючи рівень дисперсії показнику CV встановлено, що за використання дослідних схем імунопрофілактика хвороби Ауескі ступінь розмаху даних отриманих за дослідження тварин першої та другої дослідних груп значно нижчий порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3).

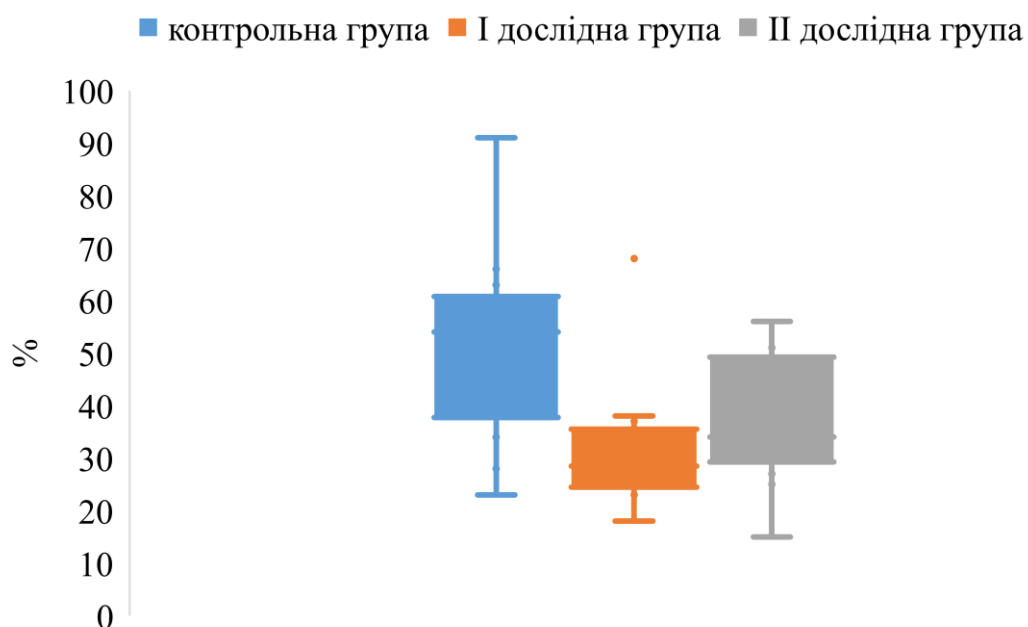


Рис. 3. Дисперсія показнику CV контрольної та дослідних груп при визначення специфічних антитіл до gB збуднику хвороби Ауескі у крові свиней різного віку за активної імунопрофілактики

Встановлено, що верхній квартиль показнику CV свиней контрольної групи становить близько 62%, нижній квартиль – 38%. Максимальне значення контрольної групи складає близько 92 %, що обумовлено наявністю тварин з гетерогенними значенням показнику S/N. Мінімальний рівень CV сягає 22%. Вищенаведені данні вказують на високу ступінь дисперсії значень показнику CV тварин контрольної групи.

Порівнюючи ступінь розмаху даних показнику CV за різних схем імунопрофілактики хвороби Ауескі встановлено, що верхній квартиль першої та другої дослідних груп нижчий порівняно зі значенням контрольної групи на 36% і 50% відповідно. Нижні квартилі масиву даних першої та другої дослідної групи не мають істотних відмінностей між собою, їх значення коливається у межах 25% - 30%, однак суттєво відрізняється від значень контрольної групи. Максимальний показник першої та другої дослідних груп є наближеним до значення їх верхнього квартиля та становить відповідно 38% та 57%, що відповідно на 59% та 38% нижче порівняно з показником тварин контрольної групи. Мінімальні показники першої та другої дослідних груп становлять близько 22% та 26% відповідно та достовірно не відрізняються від показників контрольної групи. Слід відмітити, що перша дослідна група має викиди, що вказує на наявність серед свиней тварин з найбільшою гетерогенністю досліджуваного показнику.

Таким чином, тварини першої та другої дослідних груп мають менший на 77% і 56% ступінь дисперсії показнику CV порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Отже, рівень специфічних антитіл у тварин першої та другої дослідних груп достовірно відрізняється у свиней на період з 77 по 91 добу життя та на 154 добу життя порівняно з показниками контрольної групи. Така різниця, більш за все, пов'язана з відмінностями у формуванні гуморальної відповіді імунної системи свиней у відповідь на дію вакцинного антигену за активної імунопрофілактики хвороби Ауескі. Ступінь дисперсії показнику S/N тварин першої і другої дослідних груп істотно не відрізняється порівняно з показником контрольної групи, що вказує на гомогенний рівень антитіл та формування групового імунітету. У той же час виявлено викиди серед показників S/N та CV контрольної та першої дослідної груп, що вказує на гетерогенний рівень антитіл у цих тварин.

2.3.3. Рівень специфічних антитіл IgG до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі за специфічної імунопрофілактики

У результаті проведеного дослідження специфічних антитіл до антигенів gE збудника хвороби Ауескі за активної імунопрофілактики gE-негативною вакциною встановлено, що 84% поросят контрольної групи, 74% тварин першої та 19% другої дослідної групи мають специфічні імуноглобуліни до антигенів gE збудника хвороби Ауескі (таблиця 4).

Слід відзначити, що тварини контрольної групи віком 63, 70 та 77 днів життя, а також поросята першої та другої дослідних груп віком 63 доби життя містять специфічні антитіла до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі, які, більш за все, мають колостральне походження [22, 33].

Встановлено, що кількість серопозитивних тварин на тлі проведеної вакцинації серед контрольної та першої дослідної групи істотно не відрізняються та становлять 87% і 73% відповідно. У той же час, серед досліджених тварин другої дослідної групи виявлено 14% поросят, які містять антитіла до антигенів gE збудника хвороби Ауескі, що суттєво відрізняється від показників тварин контрольної групи.

Слід зауважити, що на тлі проведення імунопрофілактики gE-негативною вакциною, наявність специфічних імуноглобулінів до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі свідчить про циркуляцію епізоотичного штаму збудника серед досліджених тварин.

Таким чином, проведення імунізації свиней інтраназально на 14 добу життя та парентерально на 65 добу життя забезпечує ефективний захист тварин від збудника хвороби Ауескі.

Таблиця 4

Рівень специфічних антитіл до антигенів gE вірусу хвороби Ауескі у крові свиней різних вікових груп за активної імунопрофілактики ($M \pm m$, %, $n=7$)

Доба життя	Група тварин								
	Контрольна			I дослідна			II дослідна		
	пози- тивних тварин	S/N	CV	пози- тивних тварин	S/N	CV	пози- тивних тварин	S/N	CV
63	71	33,71±10,14	80	86	32,29±10,41	85	86	31,14±7,28	62
70	71	35,57±12,15	90	71	43,86±8,77	53	71	58,43±5,22	24
77	71	39,14±14,14	96	71	32,43±10,25	84	57	53,57±6,52	32
84	86	37,29±7,50	53	57	45,57±12,21	71	29	65,71±12,1	49
91	100	28,57±5,52	51	71	42,57±9,78	61	0	82,71±4,3***	14
98	86	23,71±8,09	90	71	33,29±11,31	90	14	68,86±9,04**	35
105	71	31,43±13,16	111	57	42,71±12,24	76	0	85,14±3,18**	10
112	100	20,43±6,24	81	71	40,71±10,46	68	0	83,86±3,58***	11
119	86	22,14±10,97	131	71	45,14±11,55	68	0	80,14±4,11***	14
126	86	22,71±10,98	128	86	23,29±9,05	103	14	71,86±6,84**	25
133	86	20,71±11,12	142	100	18,57±7,23	103	0	83,86±1,96***	6
140	100	13,86±3,43	66	100	27,71±6,87	66	0	75,14±1,98***	7
147	86	18,29±10,97	159	71	36,14±9,81	72	0	72,71±2,78***	10
154	71	33,71±13,49	106	57	44,86±12,51	74	0	79,29±2,49**	8

Примітка: *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$, ***- $p \leq 0,001$ порівняно до значень тварин контрольної групи; «-» - не виявлено серопозитивних тварин

Порівнюючи ступінь дисперсії даних показнику S/N тварин другої дослідної групи встановлено значну відмінність від масиву даних контрольної та першої дослідної груп (рис. 4).

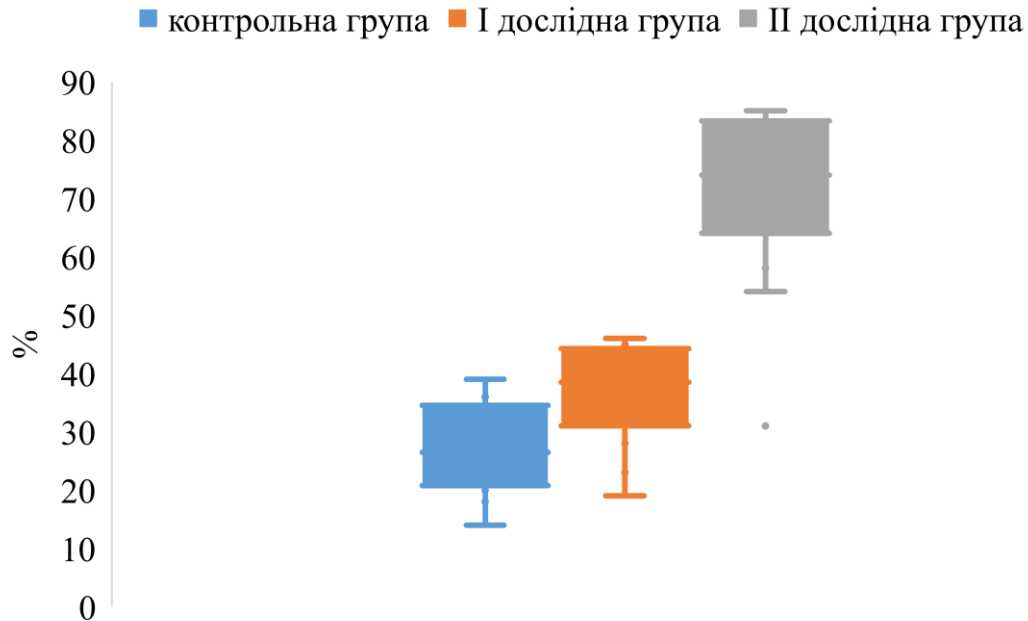


Рис. 4. Дисперсія показнику S/N контрольної та дослідних груп при визначення специфічних антитіл до gE збуднику хвороби Ауескі у крові свиней різного віку за активної імунопрофілактики

Масив даних другої дослідної групи знаходиться в межах негативного значення показнику S/N, на відміну від контрольної та першої дослідної групи, що обумовлено високим значенням S/N у серонегативних тварин за специфічної імунопрофілактики gE-негативною вакциною.

Аналізуючи ступінь дисперсії показнику CV у тварин контрольної та дослідних груп на тлі проведення специфічної імунопрофілактики встановлено, що ступінь розмаху показнику CV тварин першої та другої дослідних груп значно менший порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 5).

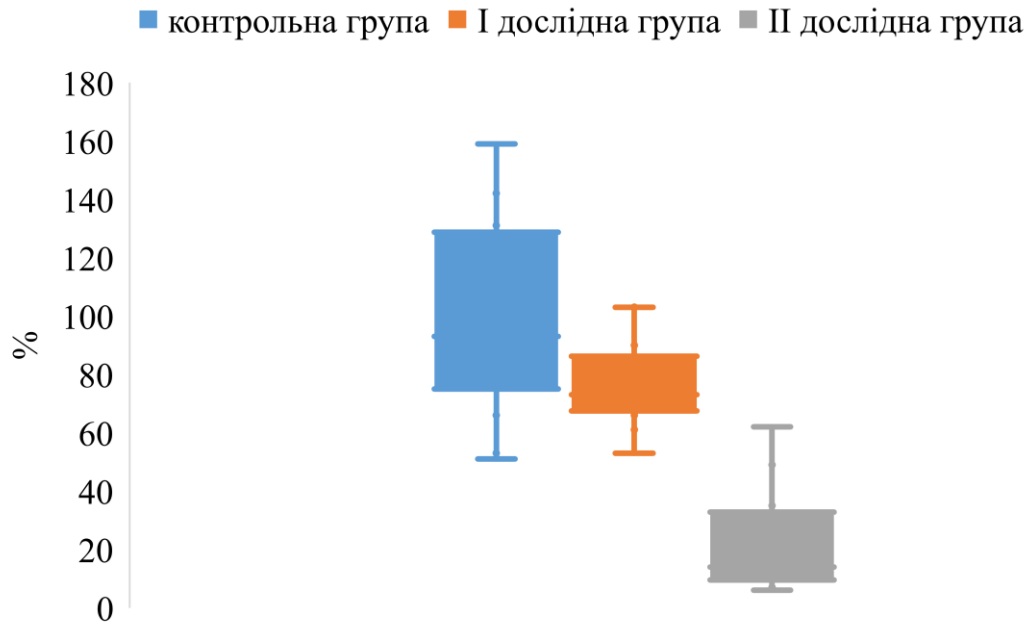


Рис. 5. Дисперсія показнику CV контрольної та дослідних груп при визначення специфічних антитіл до gE збуднику хвороби Ауескі у крові свиней різного віку за активної імунопрофілактики

Встановлено, що верхній кватиль показнику CV другої дослідної групи становить близько 35%, що значно нижче порівняно зі значенням контрольної та першої дослідної груп. Нижній кватиль другої дослідної групи майже на 86% нижчий за показники контрольної та першої дослідної груп. Це вказує на гетерогенний рівень специфічних антитіл тварин контрольної та першої дослідних груп, що зумовлено наявністю серопозитивних свиней за глікопротеїдом E, що характерний для епізоотичного штаму збуднику хвороби Ауескі.

Досліджуючи тварин контрольної та дослідних груп встановлено, що схема імунізації тварин проти хвороби Ауескі за інтраназального використання живої вакцини разом з парентеральним введенням інактивованої вакцини ефективно формує протективний імунітет та забезпечує захист тварин від інфікування

епізоотичним штамом збудника, на що вказує наявність 86% серонегативних тварин другої дослідної групи до gE вірусу хвороби Ауескі (рис. 6)

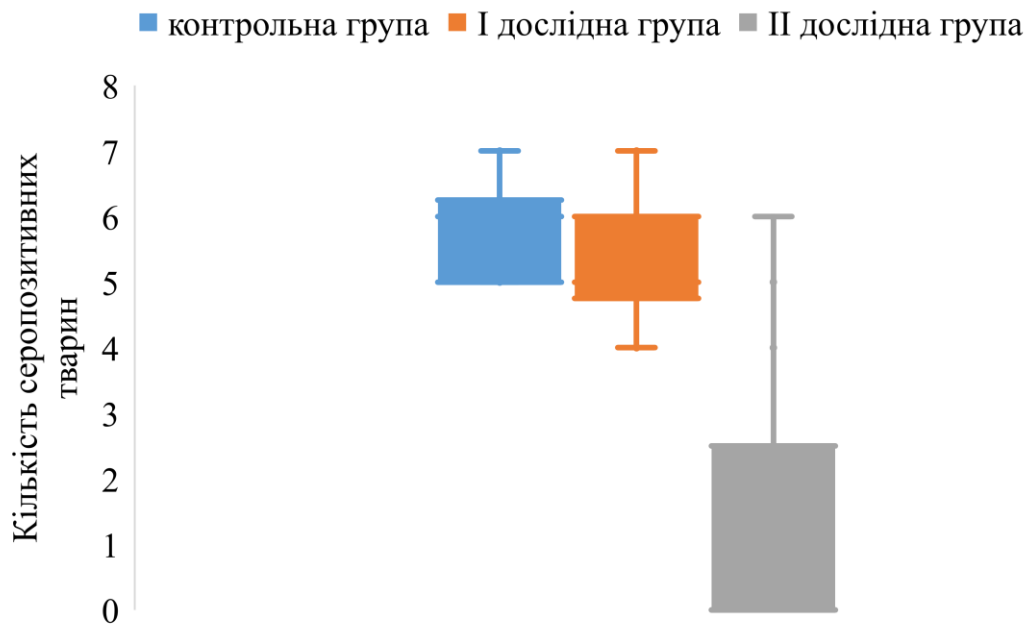


Рис. 6. Дисперсія серопозитивних тварин до gE збудника хвороби Ауескі контрольної та дослідних груп за активної імунопрофілактики

Таким чином, 87% тварин контрольної групи мають специфічні антитіла до gE вірусу хвороби Ауескі на тлі проведення імунізації gE-негативною вакциною, що вказує на циркуляцію епізоотичного штаму збудника та низьку ефективність застосування схеми імунопрофілактики. Вакцинація поросят на 65 добу життя, зменшує кількість інфікованих свиней на 10% порівняно до тварин контрольної групи, але не звільняє від збудника. Свині другої дослідної групи мають найменшу кількість gE серопозитивних тварин, що більш за все обумовлено додатковим використанням у схемі імунізації інтраназальної живої вакцини проти хвороби Ауескі.

З огляду на це можна зробити висновок, що одноразова вакцинація свиней як у 80-добовому, так і у 65-добовому віці є малоефективною, оскільки

більшість тварин з цих груп є серопозитивними за gE антигеном, а відповідно, і інфікованими епізоотичним штамом вірусу хвороби Ауескі.

Імунізація свиней з інтраназальним введенням антигену у 14-добовому віці є найбільш ефективною, на що вказує мінімальна кількість серопозитивних за gE антигеном тварин на тлі достатньо високого у сироватці крові рівня IgG за gB антигеном вірусу хвороби Ауескі.

2.4. Розрахунок економічної ефективності

Згідно поставлених завдань проведено розрахунок економічної ефективності застосування методу імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі.

Формування тарифу за ветеринарну послугу (дослідження) в науково-дослідному центрі включає наступні показники:

1. Вартість одиниці часу лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії), виходячи із середньомісячного рівня оплати праці, що складає 4723 грн.

2. Вартість реактивів та розхідних матеріалів, які необхідні для проведення дослідження, за цінами придбання.

3. Амортизація обладнання, що необхідне для проведення дослідження.

Виходячи з вище перелічених пунктів можна провести розрахунок витрат на одне дослідження.

Ветеринарні витрати на оплату праці лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії) визначаємо за формулою:

$$Вв1 = T * ВР_{год};$$

де:

T – час на проведення дослідження;

$ВР_{год}$ – вартість однієї робочої години лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії).

Вартість однієї робочої години лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії) визначаємо за формулою:

$$ВР_{год} = ВР_{день} : 8;$$

де:

$ВР_{день}$ - вартість одного робочого дня лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії);

8 – тривалість робочої зміни.

Вартість одного робочого дня лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії) визначаємо за формулою

$$ВР_{день} = O : 21;$$

де:

O - середньомісячний рівень оплати праці лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії);

21 – кількість робочих днів у місяці.

Всього досліджено 742 зразки сироваток крові від свиней та 26 контрольних зразки в двох повтореннях. Дослідження проводились протягом 40 години.

Виходячи з вищенаведеного проводимо розрахунки.

$$ВР_{день} = O : 21 = 4723 : 21 = 224,90 \text{ (1 людина\день);}$$

$$ВР_{год} = ВР_{день} : 8 = 224,90 : 8 = 28,11 \text{ (1 людина\година);}$$

$$Вв1 = T * ВР_{год} = Вв1 = 40 * 28,11 = 1\,124,40 \text{ (грн)}$$

Як видно з представлених розрахунків ветеринарні витрати на роботу лікаря ветеринарної медицини при проведенні імуноферментного аналізу склали 1 124,40 грн.

Вартість реактивів та розхідних матеріалів для проведення ІФА на виявлення специфічних антитіл до антигенів gB та gE збуднику хвороби Ауескі розраховуємо за формулою:

$$B_{в2} = (C_{y} : K) * B_{a}$$

де:

C_y – ціна, грн / за упаковку, штук;

K – кількість штук / тестів в упаковці;

B_a – витрата для аналізу зразків / штук.

Розрахунки представлені у таблиці (таблиця 5).

Таблиця 5

Вартість реактивів та розхідних матеріалів для проведення дослідження методом ІФА

Найменування реактиву	Ціна, грн / за упаковку, шт	Витрата для аналізу	Ціна за аналіз, грн.
Тест система ELISA gB на 480 тестів	17 717,40	768 зразків	28 347,84
Тест система ELISA gE на 480 тестів	17 717,40	768 зразків	28 347,84
Наконечники на 1000мкл	84,11 грн. / 1000 шт	6 144 шт.	516,77
Наконечники на 200 мкл	117,00 грн. / 1000 шт	12 288 шт.	14 437,70
Наконечники на 10 мкл	142,99 грн. / 1000 шт	3 072 шт.	439,26
Пробірки 1,5 мл	284,00 грн. / 500 шт	1 536 шт.	872,45
Пробірки 0,5 мл	142,00 грн. / 500 шт	1 536 шт.	436,22
		Всього:	73 398,08

Як видно з даних представлених, ветеринарні затрати на реактиви та розхідні матеріали для проведення ІФА становлять:

$$\mathbf{Bv2 = 73\ 398,08 \text{ грн.}}$$

Розрахунок вартості амортизації обладнання за дослідження 742 зразки сироваток крові від свиней та 26 контрольних зразки в двох повтореннях на виявлення специфічних антитіл до антигенів gВ та gЕ збуднику хвороби Ауескі методом ІФА проводимо за формулою:

$$\mathbf{Bv3 = BA * T}$$

де:

BA - вартість амортизації обладнання за 1 робочу годину;

T – час на проведення дослідження.

$$\mathbf{BA = BA_{\text{день}} : 8}$$

де:

BA_{день} - вартість амортизації обладнання за 1 робочу добу;

8 – тривалість робочої зміни.

$$\mathbf{BA_{\text{день}} = BA_{\text{міс}} : 21}$$

де:

BA_{міс} = вартість амортизації обладнання за 1 місяць;

21 – кількість робочих днів у місяці.

$$\mathbf{BA_{\text{міс}} = BA_{\text{рік}} : 12}$$

де:

BA_{рік} = вартість амортизації обладнання за 1 рік;

12 = кількість місяців в 1 році.

$$VA_{\text{рік}} = BO : 5$$

де:

BO = вартість обладнання;

5 = термін амортизації обладнання

Вартість комплексу для проведення ІФА досліджень, що складається з термошейкера, автоматичної мийки для мікропланшет та імуноферментного аналізаторфотометру, складає – 434 250,00 грн.

Виходячи з вищенаведеного проводимо розрахунки.

$$VA_{\text{рік}} = BO : 5 = 434\,250,00 : 5 = 86\,850,00 \text{ грн на 1 рік};$$

$$VA_{\text{міс}} = VA_{\text{рік}} : 12 = 86\,850,00 : 12 = 7\,237,50 \text{ грн на 1 місяць};$$

$$VA_{\text{день}} = VA_{\text{міс}} : 21 = 7\,237,50 : 21 = 344,64 \text{ грн на 1 робочий день};$$

$$VA = VA_{\text{день}} : 8 = 21\,377,64 : 8 = 43,08 \text{ грн на 1 годину.}$$

$$V_{\text{в3}} = VA * T = 43,08 * 40 = 1\,723,20$$

Отже, вартість амортизації обладнання за дослідження на виявлення специфічних антитіл до антигенів gB та gE збуднику хвороби Ауескі методом ІФА становить 1 723 грн.

Загальні ветеринарні витрати на проведення досліджень методом ІФА розраховуємо за формулою:

$$V_{\text{взаг}} = (V_{\text{в1}} + V_{\text{в2}} + V_{\text{в3}}) : K_3$$

де:

V_{в1} - ветеринарні витрати на оплату праці лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії);

V_{в2} - ветеринарні витрати на реактиви та розхідні матеріали для проведення ІФА;

V_{в3} - вартість амортизації обладнання за дослідження на виявлення специфічних антитіл до антигенів gB та gE збуднику хвороби Ауескі методом ІФА;

K_3 – кількість дослідних зразків сироватки крові від свиней.

Згідно формули підраховуємо загальні ветеринарні витрати:

$$\mathbf{Вв_{заг} = (1\ 124,40 + 73\ 398,08 + 1\ 723,20) / 742 = 102,76\ \text{грн}}$$

Згідно проведених розрахунків ветеринарні витрати на проведення аналізу методом ІФА одного зразку від дослідної тварини складають 102,76 грн.

У науково-дослідному центрі дослідження специфічних антитіл до антигенів gB збуднику хвороби Ауескі в одному зразку сироватки крові від дослідної тварини коштує 128 грн, а специфічних антитіл до антигенів gB – 140 грн.

Економічну ефективність розраховуємо за формулою:

$$\mathbf{Ее = Вд - Вв_{заг}}$$

де:

Вд – вартість дослідження одного зразку сироватки крові від дослідної тварини;

Вв_{заг} - загальні ветеринарні витрати на проведення аналізу методом ІФА одного зразку від дослідної тварини.

Виходячи з вищенаведеного проводимо розрахунки для:

1. виявлення специфічних антитіл до антигенів gB збуднику хвороби Ауескі:

$$\mathbf{Ее = 128 - 102,76 = 25,24\ \text{грн.}}$$

2. виявлення специфічних антитіл до антигенів gE збуднику хвороби Ауескі:

$$\mathbf{Ее = 140 - 102,76 = 37,24\ \text{грн.}}$$

Таким чином, економічна ефективність застосування методу імуноферментного дослідження за виявлення специфічних антитіл до антигенів gB збуднику хвороби Ауескі становить 25,24 грн на одну пробу від досліджуваної тварини, а за виявлення специфічних антитіл до антигенів gE збуднику хвороби Ауескі – 37,24 грн.

3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИ

3.1. Аналіз стану охорони праці у Науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю АПК

Законодавство України про охорону праці включає в себе Закони України «Про охорону праці», «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання, які спричинили втрату працездатності», «Про ветеринарну медицину», «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення», Кодекс законів про працю України та прийнятих відповідно до них нормативно-правових актів.

Охорона праці у науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК забезпечується відповідно до наказу Держнагляддохоронпраці 20.04.99 №67, що затверджено та зареєстровано Міністерством юстиції України 11 жовтня 1999 р. за №695/3988 [38].

Всі працівники лабораторії допускаються до роботи при наявності відповідної підготовки, володіння необхідними знаннями стосовно методики безпечного проведення випробувань та використання обладнання. При проведенні інструктажу розкриваються основні правила безпеки під час виконання роботи та після її закінчення. Факт проведення інструктажу реєструють в журналі реєстрації інструктажу на робочому місці.

Співробітники науково-дослідного центру при прийнятті на роботу уклали колективний договір, в якому визначено, здійснення комплексних заходів щодо організації безпечних умов праці та профілактики виробничого травматизму та професійних захворювань, встановлено обов'язки сторін, а також реалізація працівниками своїх прав та соціальних гарантій на охорону праці.

Організацією навчання та плануванням заходів з охорони праці у НДЦ займається відділ з охорони праці підприємства. Метою проведення вищезазначених заходів є ознайомлення та навчання працівників правилам безпечної роботи для себе та навколишнього середовища, заходам з попередження професійних захворювань та виробничого травматизму. Завдяки проведенню планування організаційно-технічних заходів з охорони праці на підприємстві покращуються умови праці та санітарно-оздоровчі заходи, створюються кращі побутові та соціальні умови праці.

Відповідальність за дотримання правил техніки безпеки по підрозділу НДЦ приймають на себе завідувачі відділами лабораторії.

Фінансування заходів з охорони праці у підприємстві здійснюється керівником науково-дослідного центру та забезпечує виконання державних, галузевих та регіональних програм покращення стану безпеки та гігієни праці і виробничого середовища. Фінансування профілактичних заходів з охорони праці спрямоване на запобігання нещасних випадків та професійних захворювань.

Проведення аналізу виробничого травматизму в НДЦ спрямовано на запобігання виникненню виробничих небезпек та професійних захворювань, які в основному виникають внаслідок хвороб, які переносяться тваринами чи роботою з хімічними речовинами. Причини виробничого травматизму поділяють на організаційні, технічні та психофізіологічні. До організаційних причин належать: не виконання нормативно-правових актів та інструкцій, не належне проведення навчань та інструктажів з охорони праці, невідповідність виробничого середовища санітарно-гігієнічним нормам, експлуатація несправного чи застарілого обладнання. Технічними причинами виробничого травматизму є невідповідність вимогам безпеки або несправність устаткування, інструменту та засобів індивідуального захисту працівників, відсутність технічних засобів захисту. До психофізіологічних причина відносять: втому,

надмірну важкість та напруженість праці, її монотонність, хворобливий стан працівника, його необережність, високий рівень шуму та вібрації, підвищений вміст у повітрі робочої зони шкідливих речовин, недостатній рівень освітлення.

При прийнятті на роботу та упродовж трудової діяльності працівники НДЦ зобов'язані мати санітарні книжки та систематично проходити медичний огляд. У разі нанесення шкоди здоров'ю, відповідно до наказу ДНАОП 0.05-1.02-93 працівник отримує відшкодування.

3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів

Науково-дослідний центр розташований у будівлі факультету ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ на першому поверсі. Територія навколо факультету викладена тротуарною плиткою, огорожена парканом та автоматичними воротами, що зачиняються ввечері та у вихідні дні. Вхід до науково-дослідного центру контролюється відеокамерою та домофоном. Стороннім особам вхід заборонено.

В приміщеннях НДЦ підтримують сталий мікроклімат, що відповідає таким показникам: температура в приміщеннях від 20°C до 25°C, відносна вологість 60-75%, швидкість руху повітря 0,1 м/с. Вентиляційні шафи, встановлені в приміщеннях, забезпечують постійну циркуляцію повітря в робочих зонах.

Освітлення приміщень та робочих зон встановлено у відповідності до норм ДБН В.2.5-28-2006 «Природне і штучне освітлення».

Перед тим, як увійти до відділу лабораторії, працівник повинен одягнути спецодяг (медичний білий халат, медичну шапочку або білу хустинку та спеціальне змінне взуття. До початку та після закінчення роботи виробничі приміщення лабораторії потрібно прибираються вологим способом. У

приміщеннях, де працюють з інфікованим матеріалом, прибирання проводять з використанням дезінфекційних розчинів.

У кожному приміщенні науково-дослідного центру розміщені бактерицидні лампи робота яких регламентується згідно до ПІ 1.9.10.-019-1999. «Помірна інструкція з охорони праці при виконанні робіт з санітарної обробки за допомогою бактерицидних опромінювачів».

Працюючи з патологічним матеріалом необхідно суворо дотримуватись правил безпеки. Працювати лише в гумових рукавичках, забороняється торкатись досліджуваного матеріалу руками, під час роботи забороняється приймати їжу, пити, палити, торкатись руками обличчя, волосся, не захищених частин тіла. Відпрацьований одноразовий матеріал поміщають в бак для подальшого автоклавування. Скляний, порцеляновий чи металевий лабораторний посуд, а також інструменти та штативи поміщаються в дезінфекційний розчин.

По закінченню роботи з досліджуваним матеріалом поверхні робочого місця та приладів піддають обробці відповідним дезінфекційним розчином. Залишки дослідного матеріалу заморожують на передають до архіву.

Відпрацьований матеріал з архіву знезаражується автоклавуванням. До роботи з автоклавом допускаються працівники, що мають відповідний рівень підготовки, пройшли медичну перевірку та атестацію і мають посвідчення, яке надає право на обслуговування автоклавів.

3.3. Пожежна безпека

Відповідальність за організацію пожежної служби у лабораторії покладено на директора Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського ДАЕУ.

Пожежна безпека забезпечується проведенням організаційно-технічних та інших заходів відповідно до «Правил пожежної безпеки в Україні». До цих заходів відносять: проведення регулярної перевірки електрообладнання та ізоляції електропроводів, недопущення перегріву приладів та загороджування проходів до щитків і евакуаційних виходів з НДЦ, заборона паління у приміщеннях лабораторії, наявність вогнегасників у кожному відділі НДЦ, ящик з піском, пожежний гідрант, протипожежний інвентар та вогнегасники знаходяться у коридорі НДЦ, кожний відділ НДЦ забезпечений схемою евакуації людей на випадок пожежі.

Факультет ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ, де розміщений Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК забезпечений блискавковідводом, який встановлений на даху.

4. ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо визначення особливостей лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики свиней проти хвороби Ауескі, що підтверджується наступними висновками:

1. Новонароджені поросята до ссання молозива не містять специфічних антитіл IgG до вірусу хвороби Ауескі. Починаючи з 7 доби життя у крові 100 % поросят містяться колостральні антитіла специфічні до антигенів gV та gE вірусу хвороби Ауескі, які зберігаються до 70 добового віку. На 77 добу від народження виявлено 29 % серонегативних свиней, що пов'язано з природнім катаболізмом колостральних імуноглобулінів.

2. За парентеральної імунізації у свиней контрольної групи виявлено зменшення показнику S/N на 84 доби життя у 5,7 рази, порівняно до значень отриманих від тварин 77 добового віку, що вказує на збільшення рівня антитіл до gV вірусу хвороби Ауескі. 100 % груповий імунітет серед досліджуваних свиней контрольної групи зберігається у продовж 72 діб після вакцинації, а вже на 79 добу виявлено 13 % серонегативних тварин. Імунізація поросят у більш ранньому віці сприяє формуванню 100 % групового імунітету серед досліджених тварин у продовж усього періоду.

3. Серед досліджених свиней контрольної групи виявлено 84 % тварин, які містять антитіла до антигенів gE збудника хвороби Ауескі, що вказує на їх контакт з епізоотичним штамом вірусу. У першій та другій дослідних групах кількість інфікованих свиней зменшилась на 10 % та 64 % відповідно, порівняно до значень тварин контрольної групи.

4. Економічна ефективність застосування методу ІФА для виявлення імуноглобулінів IgG специфічних до антигенів gV та gE збудника хвороби Ауескі складає відповідно 25,24 грн та 37,24 грн на одну пробу.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики хвороби Ауескі необхідно визначати наявність специфічних антитіл до gB антигенів вірусу.

З метою виявлення інфікованих тварин рекомендовано проводити дискримінуючі дослідження по визначенню антитіл до антигенів gE збуднику хвороби Ауескі.

У господарствах неблагополучних або умовно благополучних за хвороби Ауескі рекомендовано проводити специфічну імунопрофілактику шляхом дворазової вакцинації - інтраназально у віці 2 тижнів та парентерально після відлучення з урахуванням особливостей тривалості циркуляції колостральних антитіл специфічних до антигенів вірусу.

5. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Baskervilie A. Aujeszky's disease in pigs / A. Baskervilie, J. B. McFerran, C. Dow // *Vet. Bull.* – 1973. - № 43. – P. 465-480.
2. Nauwynck H. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract / H. Nauwynck, S. Glorieux, H. Favoreel, M. Pensaert // *Vet Res.* – 2007. <https://doi.org/38:229-241>.
3. Tong W. Emergence of a pseudorabies virus variant with increased virulence to piglets / W. Tong, F. Liu, H. Zheng, C. Liang, Y.J. Zhou, Y.F. Jiang, T.L. Shan, F. Gao, G.X. Li, G.Z. Tong // *Vet Microbiol.* - 2015. - V181. - №3-4. - P236-40.
4. Cramer S. D. Pseudorabies virus infection in Oklahoma hunting dogs / S. D. Cramer, G. A. Campbell, B. L. Njaa, S. E. Morgan, S. K. 2nd Smith, W. R. 4th McLin, B. W. Brodersen, A. G. Wise, G. Scherba, I. M. Langohr, R. K. Maes // *J Vet Diagn Invest.* – 2011. – V23. - №5. – P 915-923.
5. Diseases of Swine / [J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson]; - [10th ed. Ames]. - Wiley-Blackwell, 2012.
6. Dobrovolskaia E. Competition enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture / E. Dobrovolskaia, A. Gam, J. E. Slater // *Clin Exp Allergy.* – 2006. - №36. - P25–30.
7. Donaldson A. I. Experimental Aujeszky's disease in pigs: Excretion, survival and transmission of the virus / A. I. Donaldson, R. C. Wardley, S. Martin, N. P. Ferris // *Vet Rec.* – 1983. V113. - № 21.- P 490-494.
8. Yu X. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012 / X. Yu, Z. Zhou, D. Hu, Q. Zhang, T. Han, X. Li, X. Gu, L. Yuan, S. Zhang, B. Wang, P. Qu, J. Liu, X. Zhai, K. Tian // *Emerg Infect Dis.* – 2014. - V20. - №1. - P102-104

9. Durham P. J. Survival of Aujeszky's disease virus in frozen pig meat / P. J. Durham, A. Gow, W. S. Poole // *Res Vet Sci.* – 1980. – V 28. - № 2. – P. 256-258.
10. Foley P.L. Regulatory considerations for marker vaccines and diagnostic tests in the U.S. / P.L. Foley, R.E. Hill // *Biologicals.* – 2005. - №33. - P253-256.
11. Masot A.J. Pseudorabies virus infection (Aujeszky's disease) in an Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain: a case report / A.J. Masot, M. Gil, D. Risco, O.M. Jimenez, J.I. Nunez E. Redondo // *BMC Veterinary Research.* – 2017. - V13. - №6.
12. Karber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung Pharmakogischer Reihenversuche / G. Karber // *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* -1931. - №162. - P480–487.
13. Kielland C. The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma / C. Kielland, V. Rootwelt, O. Reksen, T. Framstad // *Journal of Animal Science.* – 2015. - №93. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8713>.
14. Ma W. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses / W. Ma, K.M. Lager, J.A. Richt, W.C. Stoffregen, F. Zhou, K.J. Yoon // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2008. - №20. - P440–447.
15. Masiuk D. Evaluation of commercial methods to separate nucleic acids from intestinal tissues of pigs for diagnosis of porcine epidemic diarrhea / D. Masiuk, V. Nedzvetsky, A. Kokariiev, O. Danchuk, T. Vasilenko, O. Yefimova // *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* - №10. - P477-483. <https://doi.org/10.15421/021970>.
16. Moreno A. Detection and molecular analysis of pseudorabies virus strains isolated from dogs and a wild boar in Italy / A. Moreno, E. Sozzi, G. Grilli, L. R. Gibelli, D. Gelmetti, D. Lelli, M. Chiari, P. Prati, G. L. Alborali, M. B. Boniotti, A. Lavazza, P. Cordioli // *Vet Microbiol.* – 2015. – V 177. - № 3-4. P. - 359-365.
17. Wang J. An inactivated gE-deleted pseudorabies vaccine provides complete clinical protection and reduces virus shedding against challenge by a

Chinese pseudorabies variant / J. Wang, R. Guo, Y. Qiao, M. Xu, Z. Wang, Y. Liu, Y. Gu, C. Liu, J. Hou // *BMC Vet Res.* – 2016. - V12. - №1. - P277.

18. Maresch C. Oral immunization of wild boar and domestic pigs with attenuated live vaccine protects against pseudorabies virus infection / C. Maresch, E. Lange, J.P. Teifke, W. Fuchs, B. Klupp, T. Müller, T.C. Mettenleiter, T.W. Vahlenkamp // *Vet Microbiol.* – 2012 V161. - №1 -2. - P20-5.

19. Papageorgiou K. Aujeszky's Disease (Pseudorabies). An old threat in current pig industry? Part II. Epidemiology, Immunity, Prevention and the current situation in Greece / K. Papageorgiou, A. Burriel, G. Filioussis, G. Christodoulopoulos, H. Nauwynck, S. Kritas // *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.* – 2011. - №62.

20. Pol F. Porcine Herpesvirus: Aujeszky's disease / F. Pol, M.F. Le Potier // *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France.* – 2011. - №164. - P323–326.

21. Pejsak Z. K. Aujeszky's Disease (Pseudo rabies) / Z. K. Pejsak M. J.Truszczynski // *Diseases of Swine.* 9th ed, Blackwell Publishing. – 2006. - P419-433.

22. Pensaert M. B. Oronasal challenge of fattening pigs after vaccination with an inactivated Aujeszky's disease vaccine / M. B. Pensaert, J. Vandeputte, K. Andries // *Res Vet Sci.* - №32. - P12-16.

23. Pomeranz L. E. Molecular biology of pseudorabies virus: Impact on neurovirology and veterinary medicine / L. E. Pomeranz, A. E. Reynolds, C. J. Hengartner // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2005. - V69. - №3. - P462-500.

24. Reed L. J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // *American Journal of Hygiene.* - №27. - P493–497.

25. Romero C. H. Venereal transmission of pseudorabies viruses indigenous to feral swine / C. H. Romero, P. N. Meade, J. E. Shultz, H. Y. Chung, E. P. Gibbs, E. C. Hahn, G. Lollis // *J Wildl Dis.* – 2001. - V37. - №2. - P289-296.

26. Ruiz-Fons F. A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role / F. Ruiz-Fons, J. Segales, C. Gortazar // *Vet J.* – 2008. – V 176. - № 2. -P. 158-159.
27. Scherba G. Sensitivity of the Standardized Pseudorabies Virus Neutralization Test Varies with the Test Strain Used / G. Scherba, R. M. Weigel, L. Jin, W. Hall, F. A. Zuckermann // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* - V3. - №4. - P306–312. <https://doi.org/10.1177/104063879100300406>
28. Schoroeder H.W. Jr. The evolution and development of antibody repertoire / H.W. Jr. Schoroeder, W. Harry // *Front. Immunol.* – 2015. - V6. – 33/ - P3-4/ doi: 10.3389/fimmu.2015.00033
29. Sozzi E. Genomic characterization of pseudorabies virus strains isolated in Italy / E. Sozzi, A. Moreno, D. Lelli, S. Cinotti, G. L. Alborali, A. Nigrelli, A. Luppi, M. Bresaola, A. Catella, P. Cordioli // *Transbound Emerg Dis.* – 2014. - V61. - №4. - P334-340.
30. Zhang L. Pathogenesis of natural and experimental pseudorabies virus infections in dogs / L. Zhang, C. Zhong, J. Wang, Z. Lu, L. Liu (5), W. Yang, Y. Lyu // *Virology* – 2015. - №12. - P44.
31. Steinrigl A. Detection and molecular characterization of Suid herpesvirus type 1 in Austrian wild boar and hunting dogs / A. Steinrigl, S. Revilla-Fernandez, J. Kolodziejek, E. Wodak, Z. Bagó, N. Nowotny, F. Schmoll, J. Köfer // *Vet Microbiol.* – 2012. - V157. - №3-4. - P276-284.
32. Theil P.K. The Protein Component of Sow Colostrum and Milk / P.K. Theil and W.L. Hurley // *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*, Isabel Gigli, IntechOpen. – 2016. <https://doi.org/10.5772/62841>.
33. Van Oirschot J.T. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. 4. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titers / J.T. Van Oirschot, P.W. De Leeuw // *Vet Microbiol.* – 1985. - №10. - P401-408.

34. Van Rijn P.A. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative Real Time PCR technology / P.A. Van Rijn, G.J. Wellenberg, R. Hakze-Van Der Honing, L. Jacobs, P.L. Moonen, H. Feitsma // J Virol. Methods. – 2004. - №120. - P151 –1 60.

35. Wang J. An inactivated gE-deleted pseudorabies vaccine provides complete clinical protection and reduces virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant / J. Wang, R. Guo, Y. Qiao, M. Xu, Z. Wang, Y. Liu, Y. Gu, C. Liu, J. Hou // BMC Vet Res. – 2016. – V. - №121. - P277.

36. Wernike K. Molecular double-check strategy for the identification and characterization of Suid herpesvirus 1 / K. Wernike, M. Beer, C.M. Freuling, B. Klupp, T.C. Mettenleiter, T. Müller, B. Hoffmann // J. Virol. Methods. – 2014. - №209. - P110–115.

37. Yoon H.-A. Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain / H.-A. Yoon, S.-K. Eo, A.G. Aleyas, S.-Y. Cha, J.-H. Lee, J.-S. Chae, H.-K. Jang, J.-G. Cho, H.-J. Song // J. Vet Med. Sci. – 2006. - №68. - P143–148.

38. World Organization for Animal Health [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Paris: OIE; 2015. Aujeszky's disease (Infection with Aujeszky's disease virus). Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.02_AUJESZKYS_DIS.pdf. Accessed 27 Dec 2016.

39. Krutiy K.O. Serological control of the effectiveness of immunological prevention of Aujeszky's disease / K.O. Krutiy, D. M. Masiuk, A.V. Kokariev, T.O. Vasylenko, V.V. Chernova, V.M. Bezkomorna // Korma i fakty. – 2018. – V10. - №110), 32-33

40. Наказ Держнаглядохоронпраці «Про правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини» (офіційне видання) № 67 від 20.04.1999 р.

// Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988.

41. Ширококов В. П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В. П. Ширококов – К. : учебник для студ. высш. мед. учеб. заведений, 2006. – 262 с. – (Винница Нова Книга)

42. Організація профілактичних та оздоровчих заходів при інфекційних хворобах тварин:[методичний посібник]; - Житомир: Рута, 2013. – 65-75с.

6. ДОДАТКИ

Додаток 1.



Додаток 2.



ID.Vet

OCTOBER, 2019 / Octobre, 2019

QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ

ID Screen® Aujeszky gB Competition

Code Produit / Product code : AUJESZKYGB

N° de lot / Batch: F72

Date de fabrication / Manufacture date: 10/2019

Date d'expiration / Expiry date: 10/2021

KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

Components / Composants / Componentes	Lot / Lote
Coated microplate / Microplaque sensibilisée / Microplaca sensibilizada	629-014
Positive Control / Contrôle positif / Control positivo	329-014
Negative Control / Contrôle négatif / Control negativo	30-010
Dilution buffer 4 / Tampon de dilution 4 / Diluyente 4	4-202
Conjugate 10 X / Conjugué 10 X / Conjugado 10X	429-014
Dilution buffer 3 / Tampon de dilution 3 / Diluyente 3	3-103
Wash concentrate 20X / Solution de lavage 20X / Solución de lavado 20X	15-101
Substrate solution / Solution de révélation / Solución de revelación	7-017
Stop solution / Solution d'arrêt / Solución de parada	10-102
Product Code / Code Produit	AUJESZKYGB
Batch / lot	F72
Insert / Mode d'emploi	0215
Exp.	10/2021

ACTIVITE / ACTIVITY

Mean OD of Negative Control / DO moyenne du Contrôle Négatif 1.282*
 Mean OD of Positive Control / DO moyenne du Contrôle Positif 0.090*

* These values were obtained in our Quality Control laboratory in our conditions. Laboratories may obtain slightly different values under their own conditions. Factors which affect the OD values of the controls include temperature, operator, and small variations in pipetted volumes and incubation times. As results are expressed as ratios, these variations in OD values will not affect the status of the sample as determined by the test.

The criteria to be used for test validation are described in the instructions for use of each kit.

* Valeurs obtenues dans notre laboratoire de Contrôle Qualité, données à titre indicatif.

Remarque : les paramètres pouvant affectés ces valeurs sont la température, l'opérateur, et les légères variations de volumes pipetés et de temps d'incubation.

Comme les résultats sont exprimés en ratios, ces variations de valeurs de DO n'affecteront pas le statut de l'échantillon déterminé par le test. Les critères de validation du test sont décrits dans les modes d'emploi de chaque kit.

ANALYTICAL SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE ANALYTIQUE

The analytical sensitivity is verified by testing the ADV1 sub- standard (short incubation)/ La sensibilité analytique est vérifiée en testant le sous-étalon ADV1 (incubation courte).

Expected results are : / Les résultats attendus sont :

Dilution	Status
ADV1 : 1:16	POS (11%)
ADV1 : 1:32	POS (30%)
ADV1 : 1:64	NEG (51%)

SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE

33 positive samples were tested (origin: Italy): these 33 samples were found positive.

33 échantillons positifs testés (origine : Italie) : les 33 échantillons ont été trouvés positifs.

SPECIFICITY CONTROL / CONTROLE DE LA SPECIFICITE

300 negative samples were tested (origin: France): all samples were found negative.

300 sérums négatifs ont été testés (origine : France) : tous les échantillons ont été trouvés négatifs.

ID.Vet

REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY CONTROLS / CONTROLE DES REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

Intra-plate repeatability was evaluated by measuring the coefficient of variation (CV %) of 96 repetitions of the negative control and a weak positive serum. The measured CV% was 3 and 5%, respectively. Reproducibility (inter-plate repeatability) was evaluated by performing the intra-plate repeatability assay on two separate runs. The CV obtained was 4% for the negative control and 6% for the weak positive serum.

La répétabilité a été évaluée par la mesure du coefficient de variation (CV%) sur 96 répétitions du contrôle négatif et d'un sérum faiblement positif : ce CV est respectivement de 3 et 5%. La reproductibilité a été évaluée en effectuant une répétabilité inter-plaque en deux cycles de manipulations. Le CV% obtenu est de 4% pour le contrôle négatif et 6% pour le sérum faiblement positif.



Quality Control Manager : Anaïs Agnel
Responsable Contrôle Qualité
anaïs.agnel@id-vet.com



Director : Philippe Pourquier
Directeur
philippe.pourquier@id-vet.com

QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTROLE QUALITE ID Screen® Aujeszky gE Competition

Product code / Code Produit : AUJESZKYGE
Batch / N° de lot: E41
Manufacture date / Date de fabrication: 01/2019
Expiry date / Date d'expiration: 01/2021

KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

Components / Composants / Componentes	Lot / Lote	Exp. / Cad.
Coated microplate / Microplaque sensibilisée / Microplaca sensibilizada	646-024	01/2021
Positive Control / Contrôle positif / Control positivo	346-024	01/2021
Negative Control / Contrôle négatif / Control negativo	30-009	07/2021
Dilution buffer 13 / Tampon de dilution 13 / Diluyente 13	13-400	02/2021
Concentrated conjugate 10X / Conjugué concentré 10X / Conjugado concentrado 10X	446-008	01/2021
Dilution buffer 12 / Tampon de dilution 12 / Diluyente 12	12-102	10/2021
Wash concentrate 20X / Solution de lavage 20X / Solución de lavado 20X	15-100	06/2021
Substrate solution / Solution de révélation / Solución de revelación	7-101	10/2021
Stop solution / Solution d'arrêt / Solución de parada	10-102	06/2023
Product Code / Code Produit	AUJESZKYGE	Batch / lot
Insert / Mode d'emploi	0117	Exp.
		E41
		01/2021

ACTIVITY / ACTIVITE

Mean OD of Positive Control / *DO moyenne du Contrôle Positif* 0.074*
Mean OD of Negative Control / *DO moyenne du Contrôle Négatif* 1.056*

* These values were obtained in our Quality Control laboratory in our conditions. Laboratories may obtain slightly different values under their own conditions. Factors which affect the OD values of the controls include temperature, operator, and small variations in pipetted volumes and incubation times. As results are expressed as ratios, these variations in OD values will not affect the status of the sample as determined by the test.

The criteria to be used for test validation are described in the instructions for use of each kit.

* Valeurs obtenues dans notre laboratoire de Contrôle Qualité, données à titre indicatif.

Remarque : les paramètres pouvant affecter ces valeurs sont la température, l'opérateur, et les légères variations de volumes pipetés et de temps d'incubation.

Comme les résultats sont exprimés en ratios, ces variations de valeurs de DO n'affecteront pas le statut de l'échantillon déterminé par le test. Les critères de validation du test sont décrits dans les modes d'emploi de chaque kit.

ANALYTICAL SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE ANALYTIQUE

The analytical sensitivity is verified by testing the OIE reference standard serum ADV-1. The standard serum ADV-1 was found positive diluted 1/16 using the short and overnight protocols.

La sensibilité analytique est vérifiée par l'analyse du sérum standard OIE ADV-1. Ce standard ADV-1 a été trouvé positif dilué au 1/16 aussi bien en incubation courte que de nuit.

SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE

15 positive samples were tested (origin: Italy): these 15 samples were found positive.

15 échantillons positifs testés (origine : Italie) : les 15 échantillons ont été trouvés positifs.



SPECIFICITY CONTROL / CONTROLE DE LA SPECIFICITE

92 negative samples were tested (origin: France): all samples were found negative. 10 negative samples from animals vaccinated with gE-deleted vaccines were found negative.

92 sérums négatifs testés (origine : France) : tous les échantillons ont été trouvés négatifs. 10 échantillons négatifs issus d'animaux vaccinés avec des vaccins délévés-gE ont été trouvés négatifs.

REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY CONTROLS / CONTROLE DES REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

Intra-plate repeatability was evaluated by measuring the coefficient of variation (CV%) of 96 repetitions of the negative control and a weak positive serum. The measured CV% was 4 and 4%, respectively. Reproducibility (inter-plate repeatability) was evaluated by performing the intra-plate repeatability assay on two separate runs. The CV obtained was 6% for the negative control and 7% for the weak positive serum.

La répétabilité a été évaluée par la mesure du coefficient de variation (CV%) sur 96 répétitions du contrôle négatif et d'un sérum faiblement positif : ce CV est respectivement de 4 et 4%. La reproductibilité a été évaluée en effectuant une répétabilité inter-plaque en deux cycles de manipulations. Le CV% obtenu est de 6% pour le contrôle négatif et 7% pour le sérum faiblement positif.

Quality Control Manager : Anais Agnel
Responsable Contrôle Qualité
anais.agnel@id-vet.com

Director : Philippe Pourquier
Directeur
philippe.pourquier@id-vet.com

Додаток 5





**Матеріали V Міжнародної
науково-практичної
конференції викладачів і студентів**

**АКТУАЛЬНІ АСПЕКТИ
БІОЛОГІЇ ТВАРИН,
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ТА ВЕТЕРИНАРНО-
САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

06-07 травня 2020 р.

ДНІПРО - 2020

V Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів "Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи", травень 2020

УДК 61-619

ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ ХВОРОБИ АУЄСКИ У СВИНЕЙ ЗА АКТИВНОЇ ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ

Годда К. О., магістрант, Масюк Д. М., к. вет.н., доцент, Кокарев А. В., к. вет. н.,
Т. О. Василенко к.с.-г. н.

katia.kryciy@gmail.com

Дніпровський державний аграрний університет, Дніпро, Україна

Вступ. Хвороба Ауєска це висококонтагіозне вірусне захворювання, яке спричинює значних економічних збитків. Основний шлях контролю поширення хв. Ауєска проводять за допомогою специфічної імунопрофілактики з одночасним виявленням та видаленням інфікованих тварин з обов'язковим дотриманням заходів біобезпеки.

Для проведення імунопрофілактики хв. Ауєска з успіхом застосовують, як живі (атенуйовані), так й інактивовані вакцини (Бузун, 2010). Згідно ветеринарного законодавства України, імунопрофілактика хв. Ауєска базується на використанні маркованих gE-негативних вакцин проти хв. Ауєска.

На сьогоднішній день для контролю ефективності проведення активної імунопрофілактики з успіхом застосовують метод ІФА, що дозволяє встановити наявність специфічних антитіл (Ситюк, 2012), оцінити рівень групового імунітету (Круглій та ін., 2017), а також тривалість колострального або поствакцинального імунітету (Masiak et al., 2019).

Мета роботи. Визначити особливості лабораторного контролю хвороби Ауєска у свиней за специфічної імунопрофілактики.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення дослідів було сформовано 3 аналогічні групи свиней – контрольна та дві дослідні, по 220 поросят у кожній. Поросят контрольної групи парентерально щеплювали вакциною «Адівак» у віці 75 днів життя. Поросят першої дослідної групи вакцинували внутрішньом'язово у віці 65 днів життя у дозі 2 мл. Тварин другої дослідної групи на 14 добу життя імунізували інтраназально вакциною «Адівак +» у дозі 1 мл в кожну ніздрю та внутрішньом'язово у віці 65 днів життя у дозі 2 мл. Для визначення формування поствакцинального імунітету сироватку крові відбирали від поросят контрольної та дослідних груп з 63 по 154 добу життя з інтервалом у 7 днів, по 7 проб з кожної вікової групи. Наявність антитіл до антигенів gB та gE вірусу хв. Ауєска визначали за допомогою тест-систем «ID Screen Aujeszky gB Antibody Competition» та «ID Screen Aujeszky gE Antibody Competition» («ID veto Франція»).

Отримані результати статистично обробляли з використанням пакету аналізу даних Microsoft Excel. Проводили розрахунок середнього арифметичного (M) та його похибки (m). Вірогідність різниці між групами визначали за критерієм Стьюдента: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Результати досліджень.

У результаті проведених досліджень встановлено динаміку формування групового імунітету свиней за специфічними до антигенів gB та gE вірусу хв. Ауєска антитілами на тлі проведення специфічної імунопрофілактики.

Порівнюючи різні схеми імунізації тварин проти хвороби Ауєска встановлено, що 100% тварин першої та другої дослідної груп у віці 63 та 70 днів життя мають високий рівень показнику S/N за виявлення специфічних антитіл до gB вірусу хвороби Ауєска, який достовірно не відрізняється від показників тварин контрольної групи. На 77 добу життя рівень показнику S/N у поросят першої та другої дослідних груп є достовірно меншим ($p \leq 0,05$) за значення тварин контрольної групи, що може бути обумовлено проведенням парентеральної імунізації тварин дослідних груп у більш ранньому віці. Надалі, серед тварин дослідних груп відмічається поступове зниження показнику S/N з досягненням мінімальних значень на 98

V Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів "Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи", травень 2020

Етіологічна структура респіраторних захворювань свиней за результатами бактеріологічних досліджень	
Супенко М., студент, Глебенюк В.В., к.вет.н., доцент	161
Епізоотична ситуація щодо гемофільних інфекцій тварин у Дніпропетровській області	
Шевченко Є., студент, Глебенюк В.В., к. вет. н., доцент	162
Частота виділення полірезистентних штамів бактерій від дрібних тварин у Дніпропетровській області	

Несекційні матеріали

Єфімов В.Г., к.вет.н., доцент, Шевченко А.А., студентка, Кібальченко В.В., фахівець	163
Особливості поживної цінності та елементного складу крупи рисової	
Голда К. О., магістрант, Масюк Д. М., к. вет.н., доцент, Кокарев А. В., к. вет. н., Т. О. Василенко к с.-г. н.	165
Лабораторний контроль хвороби Ауєскі у свиней за активної імунпрофілактики	