

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНПРОВСЬКИЙ 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

« » _____ 2021 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ СПЕЦИФІЧНОЇ
ІМУНОПРОФІЛАКТИКИ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ
ХУДОБИ В УМОВАХ НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ
ТА ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО
КОМПЛЕКСУ ДНПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-
ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

26.06 – ДР. 1072.21.05.24.049.ПЗ

| | | |
|---------------------------|-------|-----------------|
| Студентка-дипломниця | _____ | Є.О. Пилипчук |
| Керівник дипломної роботи | | |
| д.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 – 2021

| | | |
|--------|--|----|
| | ЗМІСТ | |
| | СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ | 3 |
| | РЕФЕРАТ | 4 |
| | АНОТАЦІЯ | 5 |
| | ANNOTATION | 6 |
| | ВСТУП | 7 |
| 1. | ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 10 |
| 1.1. | Характеристика вірусної діареї ВРХ | 10 |
| 1.2. | Лабораторна діагностика вірусної діареї ВРХ | 16 |
| 1.3. | Профілактика вірусної діареї ВРХ | 19 |
| 2. | ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ | 23 |
| 2.1. | Матеріал і методи дослідження | 23 |
| 2.2. | Характеристика Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК | 33 |
| 2.3. | Результати власних досліджень та їх аналіз | 37 |
| 2.3.1. | Рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ у корів | 37 |
| 2.3.2. | Визначення тривалості колострального імунітету до антигенів збуднику вірусної діареї | 39 |
| 2.3.3. | Рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ у телят за активної імунопрофілактики | 43 |
| 2.4. | Розрахунок економічної ефективності | 47 |
| 3. | ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ | 51 |
| 4. | ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ | 56 |
| 5. | СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ | 58 |
| 6. | ДОДАТКИ | 64 |

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВРХ – велика рогата худоба

IgG – імуноглобулін

ПІ-тварини – персистентно або постійно інфіковані тварини

ВД – вірусна діарея

BVD – bovine viral diarrhea

BVDV – bovine viral diarrhea virus

НЦП – не цитопатогенний біотип

ЦП – цитопатогенний біотип

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ІФА – імуноферментний аналіз

ОЩ – оптична щільність

НДЦ – науково-дослідний центр

АПК – агропромисловий комплекс

РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на 63 сторінках комп'ютерного тексту і містить список умовних скорочень, 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 5 рисунків та 7 таблиць, додатки. Список використаної літератури налічує 55 джерел латиною та кирилицею.

Метою роботи було визначити особливості лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики вірусної діареї ВРХ.

Об'єктом дослідження було застосування методу імуноферментного аналізу для контролю ефективності проведених лікувально профілактичних заходів щодо вірусної діареї ВРХ.

У дипломній роботі наведено вирішення завдань щодо визначення рівню загальних імуноглобулінів (IgG) специфічних до антигенів збуднику та протеїну р80 збуднику вірусної діареї у крові корів за імунопрофілактики, тривалості циркуляції у крові телят колостральних імуноглобулінів, специфічних до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ, а також рівня специфічних антитіл до антигенів та протеїну р80 збуднику вірусної діареї у крові імунізованих телят.

За результатами досліджень було запропоновано господарству умовно благополучному щодо вірусної діареї ВРХ проводити специфічну імунопрофілактику шляхом парентеральної вакцинації, телят вакцинувати з урахуванням особливостей тривалості колострального імунітету.

Для виявлення інфікованих тварин рекомендовано проводити одночасне дослідження, з використанням дискримінуючих тестів, для визначення антитіл до глікопротеїну р80 та антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота Пилипчук Є.О. на тему «Лабораторний контроль специфічної імунопрофілактики вірусної діареї великої рогатої худоби 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 вірусної діареї великої рогатої худоби. Встановлено, що новонароджені телята до ссання молозива не містять специфічних IgG до вірусної діареї. З 7 доби життя у крові 100 % телят містяться колостральні антитіла специфічні до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ, які зберігаються до 56 доби життя. На 77 добу від народження виявлено 29 % серонегативних телят, що пов'язано з природнім катаболізмом колостральних імуноглобулінів.

Встановлено, що серед досліджених імунізованих телят 3-6 місячного віку виявлено 90 % тварин, які містять антитіла до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ, рівень яких знижується до 70% у 12 місяців життя. Однак, відсутність специфічних антитіл у 10 % імунізованих телят, в тому числі і до протеїну р80, свідчить про наявність у них персистентної інфекції.

Для лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики вірусної діареї необхідно визначати наявність специфічних антитіл до антигенів вірусу вірусної діареї, неструктурного протеїну р80, а також антигени збуднику.

З метою виявлення персистентно інфікованих тварин рекомендовано проводити дослідження по визначенню не структурного протеїну р80 у всіх серонегативних імунізованих тварин, а також проводити тестування безмолозивних телят на наявність антигенів вірусної діареї.

Ключові слова: вірусна діарея, протеїн р80, колостральні антитіла, специфічні антитіла, імуноферментний аналіз.

ANNOTATION

Diploma thesis Pilipchuk E.A. on the topic «Laboratory control of specific immunoprophylaxis of viral diarrhea in cattle Research Centre of Biosafety and Environmental Control Agro-industrial Complex of Dnipro State Agrarian and Economic University».

The paper presents the definitions of the features of laboratory control of specific immunoprophylaxis of viral diarrhea in cattle. It was found that newborn calves before colostrum suckling do not contain specific IgG to viral diarrhea. From the 7th day of life, the blood of 100% of calves contains colostral antibodies specific to the antigens of the causative agent of cattle viral diarrhea, which are stored up to 56 days of life. On the 77th day from birth, 29% of seronegative calves were found, which is associated with natural catabolism of colostral immunoglobulins.

It was found that among the investigated immunized calves of 3-6 months of age, 90% of animals were identified containing antibodies to the antigens of the causative agent of cattle viral diarrhea, the level of which decreases to 70% at 12 months of age. However, the absence of specific antibodies in 10% of immunized calves, including those against the p80 protein, indicates that they have persistent infection.

For laboratory control of specific immunoprophylaxis of viral diarrhea, it is necessary to determine the presence of specific antibodies to antigens of the virus of viral diarrhea, non-structural protein p80, as well as antigens of the pathogen.

In order to identify persistently infected animals, it is recommended to conduct studies to determine the structural protein p80 in all seronegative immunized animals, as well as to test nonsmoking calves for the presence of viral diarrhea antigens.

Key words: viral diarrhea, p80 protein, colostral antibodies, specific antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay.

ВСТУП

Вірусна діарея великої рогатої худоби (ВД, BVD) є широко поширеним захворюванням вірусної етіології і зустрічається у більшості країн світу. Це досить складне захворювання, що веде до виснаження і значного зниження продуктивності тварини, іноді до загибелі, вимушеного забою, народженням не життєздатного і персистентно інфікованого потомства (ПІ).

Ефективністю програми контролю вірусної діареї являється систематичний моніторинг, видалення ПІ-тварин, виявлення інфікованих тварин у стаді, застосування імунопрофілактичних заходів, суворий біозахист.

Контроль за поширенням вірусної діареї проводять за допомогою специфічної імунопрофілактики. Вакцинацію, як інструмент контролю, використовують зокрема в Німеччині, Бельгії, Ірландії, Шотландії та інші [3, 14, 22, 32, 34].

На ефективність імунопрофілактичних заходів впливає низка факторів, серед яких слід виділити зниження резистентності організму, стреси, неналежні умови утримання та годівлі, неправильне зберігання та застосування біопрепаратів, інтерференцію материнських антитіл з вакцинним антигеном, тощо [10].

Імунопрофілактика захворювання базується на використанні вакцин проти вірусної діареї. На даний час використовують живі та інактивовані, моно- і комплексні вакцини. Завдяки своїй нешкідливості й високій імуногенності широке застосування отримали інактивовані вакцини проти ВД. На відміну від живих, інактивовані вакцини не викликають абортів, імуносупресії та персистенції, щеплені тварини не виділяють вірус у зовнішнє середовище і тому не становлять загрозу поширення захворювання. Вони нешкідливі і їх можна використовувати для імунізації тільних корів та биків-плідників. Ще однією перевагою інактивованих вакцин над живими є їх відносна висока стабільність при зберіганні. Вакцини такого типу індукують синтез антитіл до всіх глікопротеїнів збуднику вірусної діареї, які можна визначити за допомогою лабораторних методів дослідження.

На сьогоднішній день з метою контролю ефективності проведеної специфічної імунопрофілактики застосовують метод імуноферментного аналізу – ІФА, що дозволяє виявити присутність специфічних імуноглобулінів до антигенів та глікопротеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ, встановити груповий імунітет та визначити тривалість колострального або поствакцинального імунітету у тварин [6].

Втім, імунопрофілактика тварин сприяє лише «стримуванню» проявів типових клінічних ознак [20]. Необхідною умовою повної ерадикації збудника вірусної діареї зі стада є виявлення ПП - та інфікованих тварин й подальше їх видалення зі стада.

В зв'язку з вище наведеним важливо встановити особливості лабораторного контролю за формуванням та тривалості специфічного імунітету до збуднику вірусної діареї та визначення ефективності специфічної імунопрофілактики.

Об'єкт дослідження: специфічна імунопрофілактика вірусної діареї ВРХ

Предмет дослідження: антигени збуднику вірусної діареї, специфічні загальні імуноглобуліни сироватки крові до збуднику вірусної діареї ВРХ, специфічні імуноглобуліни сироватки крові до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ.

Мета роботи: визначити особливості лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики вірусної діареї ВРХ.

Завдання роботи:

1. Визначити рівень загальних імуноглобулінів та глікопротеїну р80 збуднику вірусної діареї у крові корів за специфічної імунопрофілактики;
2. З'ясувати тривалість циркуляції у крові телят колостральних імуноглобулінів та наявність антигенів вірусної діареї у новонароджених телят;
3. Визначити рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї у телят за активної імунопрофілактики
4. Розрахувати економічну ефективність застосування методу імуноферментного аналізу для лабораторного контролю специфічної

імунопрофілактики корів проти вірусної діареї.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика вірусної діареї ВРХ

Клінічні прояви інфікування вірусом вірусної діареї великої рогатої худоби (ВД, *BVDV*) були вперше описані Олафсоном і його колегами [1, 8, 25], які повідомили про вочевидь нове захворювання великої рогатої худоби, що характеризується гострим гастроентеритом і ерозіями травного тракту.

Вірус вірусної діареї – хвороби слизових великої рогатої худоби (ВД, *Bovine viral diarrhoea virus, BVDV*) є прототипним представником роду *Pestivirus* сімейства *Flaviviridae* [26] і, таким чином, володіє багатьма рисами, що характеризують це сімейство, як і всі флавівіруси, *BVDV* має ліпідну оболонку, утворену мембранами інфікованих клітин і тому чутливий до дії розчинників і миючих засобів.

Геном збуднику представлений лінійною одноланцюговою (+) РНК. [37, 44], розміром близько 12 500 нуклеотидів [29]. Характерною особливістю генома вірусу вірусної діареї є його висока варіабельність [2,11,41].

Раніше у вірусу виявлено два генотипи, а в даний час вони визнані самостійними видами: *BVDV-1* і *BVDV-2* [17, 33, 38], частина ізолятів, виділених в Італії, Бразилії і Таїланді, відносять до третього типу [7, 15, 18]. В основному, *BVDV-1* і *BVDV-2* виявляють однаковий спектр патогенності [26, 32, 39, 43]. Проте штами 2 типу були спочатку асоційовані зі спалахами гострої стадії захворювання з високою захворюваністю і смертністю [22, 27, 33, 59].

Штами і ізоляти *BVDV-1* і *BVDV-2* представлені двома біотипами: нецитопатогенним (НЦП) і цитопатогенним (ЦП), залежно від їх здатності викликати лізис уражених клітин [6, 7, 24, 26, 39]. ЦП біотипи виникають шляхом мутації з НЦП біотипом вірусу. Мутації, що лежать в основі зміни на ЦП біотип, різноманітні, але частіше пов'язані з мутаціями гена NS3 в 2 позиціях і включають вставки клітинних послідовностей, дуплікації генів,

делеції і заміни одиночних нуклеотидів [25,38].

Для всіх ЦП біотипів властивий синтез неструктурного протеїну NS3, тоді як в клітинах, інфікованих НЦП вірусом, може виявлятися тільки нерозщеплена форма NS2-3 (або р80) [28, 30].

Взаємодія цих біотипів в організмі сприйнятливих тварин визначає різноманіття форм перебігу інфекційного процесу – від субклінічної до важкої форми хвороби слизових зі смертельними наслідками.

Ряд наукових досліджень повідомляють, що вірус *BVDV* здатний інфікувати широкий спектр домашніх і диких копитних тварин [6, 15, 30].

У роботах низки вчених були описані випадки передачі вірусу від вівці великій рогатій худобі [23, 26] і встановлена персистентна інфекція у білохвостих оленів, альпаки, мишачих оленів, гірських козлів, овець і кіз [16, 37] і відтворена у білохвостих оленів [38], що вказує на можливість персистенції вірусу в дикій природі і вплив на програми по боротьбі із захворюванням.

У своїх дослідженнях Deregts et al., D. Goens, Lindberg, A Fulton RW, Brodersen BW, встановили, що серопозитивність тварин становить 20-100% що, залежить від концентрації поголів'я, а також від наявності у тварин феномена толерантності. В даний час захворювання на вірусну діарею широко поширене в усьому світі і завдає значних економічних збитків тваринництву розвинених країн світу.

Вірус може викликати 3 форми інфекції: субклінічну, гостру і персистентну. Було підраховано, що в 70-90% випадків інфекція, викликана вірусом *BVDV* у серонегативних тварин протікає без прояву клінічних ознак [4, 11, 18, 35], або у вигляді легкої лихоманки, що супроводжується лейкопенією. Субклінічний перебіг інфекції можна пояснити високим рівнем серопозитивності у не вакцинованих тварин.

Perdrizet J.A. та Pritchard G.C. довели, що найбільш важливим фактором, що визначає результат захворювання у сприйнятливої тварини, є вірулентність інфікуючого штаму вірусу.

Collen T., Morrison W.I. зазначають, що штами ЦП і НЦП біотипів вірусу по різному взаємодіють з імунною системою організму. У відповідь на інфікування НЦП штамом активується гуморальний імунітет, а ЦП – клітинний, що, ймовірно, пов'язано з різною дією біотипів вірусу на моноцити і дендритні клітини, що доведено у наукових працях Lambot M., Glew E.J.

Результат постнатального інфікування на *BVDV* в основному залежить від того, тільна чи інфікована тварина чи ні, і чи було воно раніше інфіковано цим вірусом. Вцілому, попереднє інфікування великої рогатої худоби з нормальною імунною відповіддю призводить до позитивного імунітету і захисту плода під час майбутніх тільностей [6, 13]. Однак ступінь захисту плода від гетерологічного зараження може залежати від генотипу. У вівцематок природний імунітет до штамів типу 1 може забезпечити хороший перехресний захист, тоді як імунітет проти штамів типу 2 – немає [55].

Перебіг захворювання у нетільних неімунних тварин. У сприйнятливих нетільних тварин інфекція в більшості випадків носить субклінічний характер [27], але може, залежно від генотипу і лінії, також викликати важкий перебіг захворювання, при якому тварини вмирають від вірусу [23, 45, 37].

Як правило, вірус можна виявити в більшості виділень впродовж 4-10 діб після зараження, але періодично і на низьких рівнях [30]. Часто спостерігаються клінічні симптоми - лихоманка приблизно на 6-9 добу після інфікування, відсутність апетиту і ураження слизової оболонки. У телят захворювання часто супроводжується респіраторними і шлунково-кишковими симптомами, такими як кашель і діарея [10, 15, 52]. Такі симптоми також можуть бути результатом вторинних або супутніх інфекцій [20], оскільки *BVDV* діє як імунодепресивний агент, порушуючи імунні функції, в основному пов'язані з клітинною відповіддю [16, 33].

У дорослих биків гострий перебіг захворювання може бути пов'язаний з тимчасовим погіршенням якості сперми. Є ознаки того, що вірус може зберігатися і розмножуватися в тканини яєчок більше 6 місяців, хоча його не

можна виділити з сперми [17]. Проте, було повідомлення про один випадок постійного виділення зі спермою бика з нормальним імунним статусом [2, 14].

Перебіг захворювання у тільних неімунних тварин

Вірус проявляє спорідненість до клітин, швидко діляться, і тому активно зростаючий плід є кращим місцем для реплікації. У неімунних тільних тварин вірус вражає концептуса незалежно від терміну тільності з 100% вірогідністю [5].

Однак точний шлях, яким вірус досягає плоду, нез'ясований, як і тимчасова послідовність ураження різних тканин. Використовуючи внутрішньом'язову інюкуляцію телиць, Фредріксен і його колеги з'ясували, що найбільш рання стадія інфікування, на якій антиген *BVDV* може бути виявлений у плода, настає через 14 днів після інфікування і через 4 дні в міжклітинних оболонках плоду. Свасдипан і його колеги виявили вірус в аллантаїдній та амніотичній мембранах вже через 72 години після зараження, у плода через 4 доби і в ендометрії спочатку через через 10 діб після зараження вівцематок з інтраназальним введенням.

Конкретний результат інфекції плода залежить від стадії вагітності, тому в інфікованих стадах може спостерігатися широкий спектр репродуктивних патологій [44]. Вони включають, наприклад, нездатність запліднення, народження імунотолерантних, стійко, тобто постійно інфікованих (ПІ) телят, вади розвитку, загибель плода і аборт або муміфікацію, затримку внутрішньоутробного розвитку і слабких або мертвонароджених телят [37, 44, 46]. Аборти можуть з'явитися на будь-якому терміні вагітності і не обов'язково пов'язані з часом зараження.

Інфікування в першому триместрі, до того як плід стане імунокомпетентним, може привести до стійкої, постійної інфекції у плода.

Тварини з ПІ є ключовими переносниками вірусу, оскільки вони поширюють вірус постійно, у великих кількостях [26, 42]. Як правило,

вони не продукують детектованої відповіді антитіл на персистуючий вірус, але при впливі гетерологічних штамів *BVDV* вони будуть продукувати нейтралізуючі антитіла [18, 32].

Наявність специфічних нейтралізуючих антитіл може вплинути на здатність виділяти вірус від таких тварин [25]. У ПІ тварин порушені імунні функції, і вони, як правило, більш сприйнятливі до інших інфекцій [16]. Однак вони також можуть бути клінічно здоровими. Якщо корови ПІ, які досягли віку запліднення, були запліднені, то вірус передається плоду, і, отже, потомство завжди буде ПІ [9].

Якщо плід інфікований після того, як він став імунокомпетентним, у нього продукуються антитіла [5]. Однак, незважаючи на здатність викликати імунну відповідь, це негативно позначається на зростаючому плоді, і ці тварини можуть бути слабкими при народженні і, отже, більш сприйнятливими до інших інфекцій [7, 13].

Перебіг захворювання у тварин з пасивним імунітетом

Телята, які отримують молозиво, що містить антитіла до *BVDV*, набувають пасивний імунітет, який захищає їх від інфікування впродовж перших місяців життя [20, 36]. Зазвичай материнські антитіла виявляються через кілька годин після першого прийому молозива і знижуються на половину кожні 21 добу [21]. Тривалість цього захисту залежить від концентрації антитіл в молозиві, кількості спожитих. Як правило, пасивні антитіла виявляються протягом 4-6 місяців [41]. У тварин з ПІ материнські антитіла будуть знижуватися ще швидше [25, 35]. Пасивний імунітет заважає вакцинації. Елліс і його колеги показали, що вакцинація до значного зниження материнських антитіл не захищає від інфекції зараження вірулентним штамом типу *BVDV-2*.

Наслідком стійкого інфікування є хвороба слизових оболонок (*Mucosal disease, MD*), яка зазвичай вражає велику рогату худобу в віці від 6 місяців до 2 років. Перебіг хвороби може бути як гострим, тривалістю від 2 діб до 3 тижнів, так і хронічним, коли тварини доживають до 18 місяців. Як правило,

у хворих тварин спостерігається лихоманка, анорексія, масивні ерозії слизової оболонки по всьому шлунково-кишковому каналу і рясна діарея, яка веде до прогресуючого виснаження і смерті [10]. У хронічних випадках у тварин проявляються аналогічні симптоми, але в більш тривалій формі. Більш того, крім шлунково-кишкових симптомів, таких як переміжна діарея і хронічне здуття черева, можуть розвиватися дерматологічні симптоми, такі як ерозійні ураження на шкірі і ламініт.

Шляхи передачі збуднику вірусної діареї

Збудник вірусної діареї може передаватися як при прямому контакті між інфікованими і сприйнятливими тваринами, так і опосередовано через різні типи транспортних засобів тощо.

Прямий контакт з ПІ тваринами є найбільш дієвим шляхом передачі збуднику. Проте, зареєстровані випадки, коли первинно інфіковані тварини на BVD, виявилися поганими переносниками вірусу [1, 6, 13, 42] навіть при наявності ко-інфекції [43].

Непряма передача BVDV відбувається при пальпації прямої кишки, пальпації носового дзеркала, через навколишнє повітря, фетальні води, забруднені ручки, а також ін'єкції, що було проведено експериментально, але тільки там, де первинний контакт був з ПІ-тваринами [7, 10, 11, 12, 19, 25, 47]. Імовірність передачі непрямим шляхом залежить від часу, температури тощо. Якщо вірус зберігається в транспортному засобі, наприклад в кріоконсервованій спермі биків з гострою стадією інфікування або ПІ, заражених ембріонах або заражених ін'єкційних препаратах ймовірність поширення збільшується [6, 13, 21, 22, 39].

Передача всередині і між стадами

Поширення BVD всередині стада відбувається майже виключно в ті періоди, коли присутні постійно інфіковані тварини (ПІ) [8, 15]. Коли тварини з ПІ видаляються зі стада, циркуляція вірусу по суті припиняється, але він все ще може бути присутнім в стаді внутрішньоутробно у самок, які тільки ПІ плодом [11]. В цьому випадку поширення почнеться знову, як

тільки народиться теля. Ефективним способом зараження *BVDV*, крім покупки тварин з ПІ, є введення самок без ПІ, вагітних плодом з ПІ [2]. Аналогічно до утримання тільних тварин на загальних пасовищах, де немає контролю над *BVDV*, являє собою високий ризик [17, 24]. Якщо *BVDV* потрапляє в стадо непрямим шляхом, це призведе до гострої стадії інфекції.

1.2. Лабораторна діагностика вірусної діареї ВРХ

Лабораторні дослідження спрямовані або на виявлення самого вірусу (включаючи сліди вірусної РНК), або антитіл до нього. Всі діагностичні інструменти, згадані нижче, розроблені для індивідуальної діагностики, але деякі з них також були розроблені для використання моіторингу стада.

Діагностичні методи виявлення вірусів

Присутність *BVDV* в зразку може бути підтверджена методом виділення і виявлення в культурі клітин, виявлення вірусних антигенів або виявлення нуклеїнової кислоти вірусу.

Ізоляція вірусу (ІВ, VІ) проводиться шляхом інкубації зразків на культурах з малою кількістю пасажів первинних клітин нирок, носових раковин або сім'яників великої рогатої худоби. VІ вважається еталонним тестом для вірусологічного діагнозу [54] і є хорошим індикатором присутності живого (і інфекційного) вірусу. Однак наявність токсичних речовин і / або антитіл в зразку може привести до хибнонегативного результату тесту [23].

У доступній науковій літературі опубліковано кілька методів виявлення вірусного антигену за допомогою різних видів імуноферментних аналізів (ELISA) [44, 51].

Такі тести мають низку переваг, оскільки вони швидкі, чутливі і незалежні від обладнання, необхідного для культивування клітин, і тому стали широко популярними. Більшість з доступних тестів відносяться до сендвіч-типу, з захопленням антитіл, пов'язаним з твердою фазою, і

детекторним антитілом, кон'югованим з субстратом, такий як пероксидаза. Імуногістохімія – це метод виявлення внутрішньоклітинного вірусного антигену і є кращим тестом для виявлення вірусу в тканинах [7, 42]. Використання вушних вищипів в якості зразка, може бути використаний для скринінгу ПП тварин.

Для виявлення вірусної РНК використовуються методи полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР). Розробка закритих систем аналізу, в яких ампліфікація і виявлення нуклеїнових кислот *BVDV* проводиться в одній пробірці, зменшила цю проблему [12, 32]. Сьогодні розробка ведеться в напрямку кількісних і мультиплексних аналізів, в яких вірус може бути визначений кількісно і де обидва генотипи або додаткові вірусні агенти можуть бути проаналізовані в одному зразку [9, 14].

Виявлення антитіл

Імуноферментний аналіз широко застосовують для виявлення антитіл до *BVDV*. Є два основних типи: непрямий і конкурентний. У непрямому ІФА антитіла уловлюються іммобілізованим антигеном і виявляються з використанням фермент-кон'югованих видоспецифічних антиглобулінів і хромогенного субстрату. Потім вимірюється оптична щільність (OD), яка буде вище в позитивному зразку, ніж в негативному. Конкурентний ІФА (також званий блокуючим ELISA), вірус-специфічні антитіла в зразку блокують зв'язування кон'югованих вірус-специфічних антитіл з фіксованим вірусним антигеном. На відміну від непрямого ELISA, позитивний зразок в блокуючому ELISA дасть більш слабкий сигнал, ніж негативний зразок.

З точки зору контролю поширення у стаді *BVDV*, мета діагностики захворювання полягає в тому, щоб визначити: інфіковане чи неінфіковане стадо відповідно, а також всередині інфікованих стада, щоб розрізнити тварин з ПП, імунних тварин і тварин, сприйнятливих до інфекції. Тварин з ПП також необхідно диференціювати від гостро інфікованих тварин. Крім того, в недавно інфікованих стадах однією метою може бути виявлення маток

з ризиком народження ПІ телят, щоб вжити заходів щодо запобігання більшого спалаху інфекції. Тестування стада спрямовані на диференціацію між стадами з триваючою інфекцією і стадами, які можуть бути вільними від збуднику.

Це можна зробити або за допомогою імуноферментного аналізу або ізоляції вірусу. Визначення антитіл проводять також у пулах молока (наприклад, танкове молоко), або в індивідуальних зразках від імовірно серонегативних тварин [13, 36, 39].

Масові дослідження молока можна використовувати для моніторингу вакцинованого поголів'я, але індивідуальне тестування, все ж таки, мають вищу чутливість, що знижує отримання хибних результатів [15]. Оскільки тварини з ПІ зазвичай більш поширені серед молодих тварин, тестування молока в основному використовуються для виключення присутності ПІ-тварин серед корів-матерів. З метою виявлення всіх ПІ-тварин, необхідно протестувати все поголів'я [51].

Підтвердження циркуляції *BVDV* може бути встановлено або шляхом виявлення самого вірусу, або шляхом виявлення сероконверсії в парних зразках сироватки крові. Тварина з ПІ зазвичай є вірус-позитивним і серонегативним. Потім інфікування підтверджується повторним виявленням вірусу в зразках, взятих з інтервалом 2-3 тижні. Вірус іноді можна виділити також від тварин з гострим перебігом захворювання, але такі тварини будуть мати вірус-негативний і серопозитивний результат, у разі повторного тестування [17].

Виявити, що самка є тільною ПІ-плодом, можна використовуючи серологічні дослідження. Цей метод заснований на виявленні, що корови-ПІ носії мають значно більш високі рівні антитіл на пізніх термінах тільності. Основні вимоги полягають в тому, щоб аналіз міг кількісно відображати титр антитіл, щоб зразки сироватки бралися в останньому триместрі і щоб рівень антитіл не залежав від вакцинації [13]. Іншою альтернативою є аналіз зразків плідної рідини, отриманої на пізніх термінах тільності [34, 44], за

допомогою ЗТ-ПЛР або ізоляції вірусу. Однак метод ізоляції вірусу може дати хибний результат, що пояснюється наявністю нейтралізуючих антитіл в зразку [11, 34].

1.3. Профілактика вірусної діареї ВРХ

На сьогодні єдиними підходами, які виявилися успішними в зниженні пресінгу збуднику в більшому масштабі, є ті, які чинять упор на біобезпеку в цілому і контроль прямих контактів з тваринами зокрема – з додатковим використанням вакцин або без них.

Масова ерадикація збуднику вірусної діареї без використання вакцин

Розвинені сільськогосподарські країни, зокрема скандинавські країни, а також кілька інших регіонів Європи успішно досягли контролю над *BVDV* без використання вакцин і надалі прагнуть до повного викорінення [4, 17, 25]. У цих схемах, дослідження проб молока та індивідуальне тестування тварин певного віку, використовуються для визначення статусу стада за *BVDV*.

Неінфіковані стада контролюються і сертифікуються як вільні шляхом повторного відбору проб із застосуванням одного з вищезазначених методів, а інфіковані стада проходять програму ліквідації вірусу, спрямовану на видалення стійко інфікованих (ПІ) тварин [11].

Вакцинація тварин

У багатьох країнах вакцинацію використовують для боротьби зі збудником *BVDV*. Класичні вакцини проти *BVDV* бувають двох різних типів; модифіковані живі та інактивовані (убиті). Модифіковані живі вакцини містять живий, але ослаблений штам вірусу і зазвичай дають сильнішу імунологічну відповідь, ніж убиті вакцини. Останні складаються з вірусу, який був інактивований, разом з імуностимулюючою добавкою [20, 29, 33].

Модифіковані живі вакцини здатні викликати трансплацентарне інфікування у вагітних тварин і захворювання слизових оболонок у великої

рогатої худоби, у разі неправильного, безсистемного використання. Також було показано, що вони володіють такими ж імуносупресивними властивостями, що і дикі штами [17].

Убиті вакцини безпечніше використовувати, але для забезпечення адекватного захисту потрібне суворе дотримання програм імунізації. Існує тенденція до розробки нереплікуючих вакцин (подібних класичним убитим вакцинам) через проблеми з безпекою. Нові типи нереплікуючих вакцин, наприклад, субодиничні вакцини, рекомбінантні субодиничні вакцини, пептидні вакцини, ДНК-вакцини і деякі векторні вакцини.

Збудник вірусної діареї ВРХ – це вірус, який демонструє істотні варіації, і, хоча основні антигенні епітопи відомі, важко розробити вакцини, здатні запобігти зараженню гетерологічними генотипами і підтипами всередині них [7, 9]. Крім того, було неможливо задовольнити потреби в широкому, високого ступеня захисту з можливістю розрізнати природну інфекцію і вакцинацію [20, 38].

Основна мета вакцинації проти *BVDV* – запобігти трансплацентарне інфікування і, таким чином, появі нових стійких інфекцій [2, 19]. У США, де широко застосовується вакцинація, зареєстровано понад 140 різних імунобіологічних продуктів [16, 27]. Вимоги до реєстрації достатньо доступні, низькі, що призвело до появи безлічі вакцин з сумнівною ефективністю.

Живі вакцини, як правило, мають проблеми з безпекою, пов'язані із зараженням пестівірусами. Проблема інактивації будь-якого вірусу, а також її згубні наслідки добре задокументовані [7, 61]. Нещодавно голландська схема імунопрофілактичних заходів, в якій використовувалася модифікована жива вакцина, постраждала від серйозних спалахів *BVDV* після того, як партії контамінованої вакцини потрапили на ринок [12]. Ще одним ускладнюючим фактором є те, що в даний час немає доступних вакцин проти *BVDV*, які дозволяли б застосувати ДІВА-стратегію (розрізнати інфікованих від вакцинованих тварин) [28].

Отже, неправильна вакцинація ставить під загрозу можливість використання серологічних досліджень в діагностичних цілях. Інтерпретація результатів серологічних досліджень у вакцинованих стадах утруднена, оскільки вони різняться залежно від типів вакцин і тих програм імунізації, що були розроблені для використання [25].

Ще одна проблема полягає в тому, як вакцини проти *BVDV* використовуються в польових умовах [9, 18]. Обстеження, проведене в США, показало, що, хоча більшість стад було вакциновано, менше 30% робили це правильно [16]. Незначних людських помилок, таких як нездатність вакцинувати одну або двох тварин, досить для встановлення нових стійких інфекцій, якщо в стадо введено ПІ-тварину.

Підходи до вакцинації, тестування і вибракування для викорінення *BVDV* не виключають один одного, якщо використовуються безпечні (убиті) вакцини і забезпечується можливість моніторингу статусу *BVDV* стада. Однак слід визнати, що біозахист – це перша лінія захисту, а вакцинація - це резервна захист. Крім того, в схемах, повністю заснованих на принципах «тестування і вибракування», вакцинація може бути корисним інструментом для розриву порочного кола в інфікованих стадах з обов'язковим систематичним лабораторним моніторингом поголів'я.

Отже, підсумовуючи вищевказане можна зробити висновок, що вірус вірусної хвороби є висококонтагіозним, що обумовлено наявністю постійноінфікованих тварин, що сприяє інфікуванню до 100% стада. Серед клінічних ознак виділяють респіраторну та репродуктивну патології, що призводять зниження показнику збереження телят, недоотримання приростів та приплоду, зниження якості молока.

Отже, підхід до діагностики захворювання має бути комплексним з урахуванням ситуації в господарстві, наявності певних клінічних ознак, патологічних змін та результатів лабораторних досліджень. Під час збору анамнестичних даних слід враховувати несталість та подекуди подібність клінічних ознак, що зумовлено наявністю вторинних вірусних та бактеріальних

інфекцій. З огляду на це необхідною умовою успішної діагностики вірусної діареї ВРХ є проведення комплексного лабораторного дослідження.

На сьогодні лабораторні методи ПЛР та ІФА вважаються найбільш ефективними та обґрунтованими методами лабораторної діагностики, які дозволяють ефективно сформулювати та контролювати схему профілактичних заходів, що ґрунтуються на ідентифікації та видаленні інфікованих тварин зі стада, проведенні специфічної імунопрофілактики із застосуванням інактивованої вакцини та дотриманням правил біобезпеки.

З представлених в огляді літературних даних видно, що вірусна діарея ВРХ має широке поширення в усьому світі, в тому числі в Україні, та є причиною значних економічних збитків тваринницьким господарствам.

Штами та ізоляти вірусної діареї ВРХ відрізняються генетичним та імунологічним різноманіттям, що може впливати на ефективність діагностики та імунопрофілактичні заходи. Застосування сучасних методів лабораторної діагностики дозволяє швидко виявляти збудників безпосередньо в пробах біоматеріалу від хворих тварин, а також виявляти в сироватці крові та або молоці специфічні антитіла як колострального, так і поствакцинального або постінфекційного походження.

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 господарства східного регіону, що налічує 1000 голів ВРХ, з яких 150 – дійного поголів'я.

В господарстві для профілактики вірусної діареї ВРХ впродовж останніх трьох років використовують імунобіологічний препарат – «КЭТЛМАСТЕР ГОЛД FP5 L5» (Zoetis, США), який сприяє довгостроковому захисту у сприйнятливих тварин до 1 року.

У складі вакцини два окремо розфасованих компонентів:

* ліофілізований компонент, що містить живі аттенуєвані збудники інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (штам PLB 106), парагрипу-3 (штам PLB 103) і респіраторно-сінтіціальний інфекції (штам BRSV / 375);

* рідкий компонент, що містить інактивовані збудник вірусної діареї типу 1 і 2 штами 5960 і 53637, й інактивовані лептоспіри серогрупи: *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* і *L. Pomona*.

Перед застосуванням вакцини вміст флакона з рідким компонентом переносили у флакон з ліофілізованим компонентом, дотримуючись правил асептики, і збовтували флакон до повного розчинення.

Первинну вакцинацію проводили лише у клінічно здорових тварин двічі з інтервалом 3-4 тижні. Вакцинацію телят, згідно рекомендації інструкції проводили у тому випадку, як тільки рівень колостральних антитіл знижувався нижче нейтралізуючого.

Для захисту плода від внутрішньоутробного зараження і профілактики абортів,

викликаних вірусами вірусної діареї, вакцинація корів проводиться двічі, відповідно до рекомендацій із застосування вакцини.

Отже, відповідно до рекомендацій із застосування вакцини, корови систематично, згідно запровадженого плану імунопрофілактичних заходів, вакциновані проти вірусної діареї підшкірно в область шиї в об'ємі 5 мл (1 доза) за 5 і 2 тижні до запліднення. Місце ін'єкції обробляли 70% спиртом.

З метою забезпечення формування колострального імунітету у телят в господарстві створено банк молозива, в якому вміст імуноглобулінів становить 45 г/л та вище та відібране від корів 2-5 лактації.

Для проведення дослідів з метою визначення формування групового імунітету за імунізації тварин інактивованою вакциною біологічний матеріал було відібрано від тварин за схемою (рис.1).

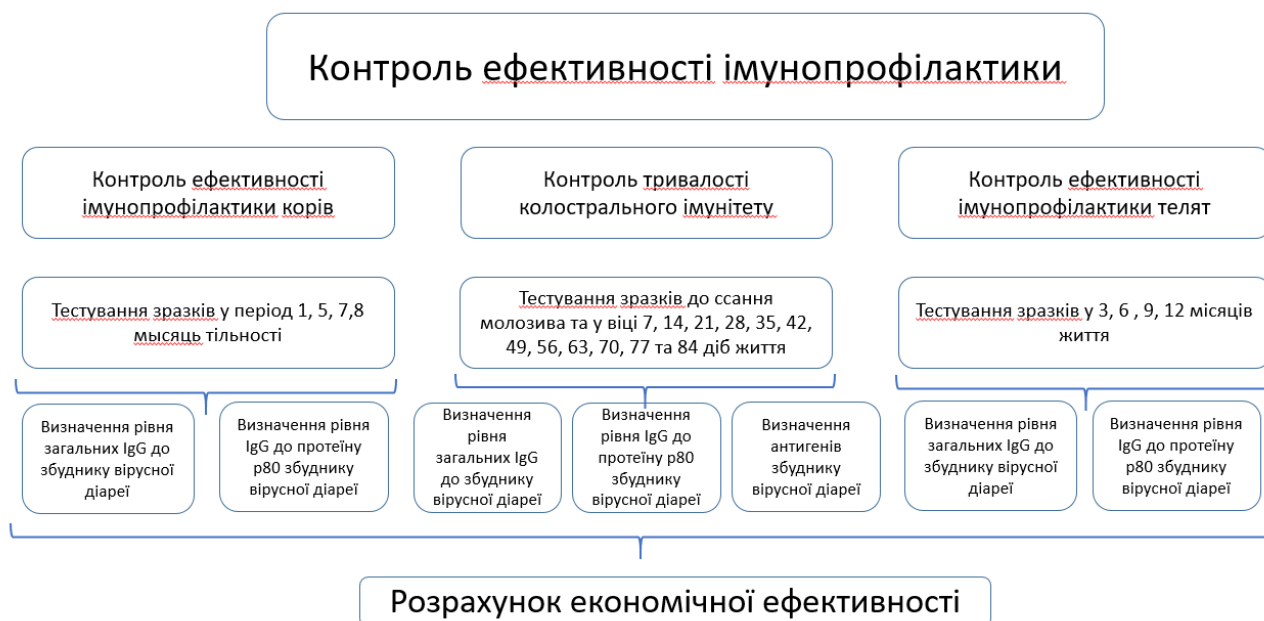


Рис. 1. Загальна схема проведення досліджень.

Для визначення рівня групового імунітету у 10 корів-матерів 3-4 лактації відбирали сироватку крові у період 200-210 діб тільності, за 30 діб до та через 30

після розтелення, й на піку лактації.

Для дослідження тривалості колострального імунітету у телят відбирали сироватку крові: одразу після їх народження – до ссання корови, та у віці 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 та 84 діб життя, по 10 проб з кожної вікової групи.

Для визначення рівня групового поствакцинального імунітету у 10 телят відбирали сироватку крові в 3, 6, 9, 12 місяців життя.

Всі зразки сироваток крові від телят відбирали рандомно.

Наявність антитіл до антигенів вірусу вірусної діареї визначали за допомогою непрямого імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізатор–фотометрі BioTek ELx800 (США) (рис. 2) із використанням тест-систем «Bovine Viral Diarrhoea Virus Total Antibody Test kit» («IDEXX» США) (додатки 10-12).

Наявність антитіл до протеїну р80-125 (NS2-3) вірусу вірусної діареї визначали за допомогою конкурентного імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізатор–фотометрі BioTek ELx800 (США) із використанням тест-систем «ID Screen BVD р80 Antibody Competition» («ID vet» Франція) (додатки 1-4).

Антигени вірусної діареї визначали за допомогою конкурентного імуноферментного аналізу (ІФА) на аналізатор–фотометрі BioTek ELx800 (США) із використанням тест-систем «Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen Test kit/ serum plus» («IDEXX» США) (додатки 5-9).

Для первинної обробки матеріалу та підготовки досліджуваних зразків механічним дозатором зі змінним об'ємом, зразки крові переносили у центрифужні пробірки та центрифугували впродовж 10 хвилин при 1200 об/хв (рис. 2). Для кожного зразку використовувати окремий одноразові пробірки типу «Еппендорф» та накінцівник. Після проводили відбір 0,25 мл сироватки крові у мікропробірку об'ємом 0,5 мл та маркірували зразки.



Рис. 2 Центрифуга-вортекс для підготовки зразків

До початку тестування зразків відповідні реактиви, розчини, полістеролові стрипи та зразки витримували за кімнатної температури 18-22 °С впродовж 20-30 хв. Для тестування зразків проводили розрахунок необхідної кількості робочого промиваючого розчину та лунок-стріпів, як поміщали одразу в робочу пляшку.

Специфічні імуноглобуліни до антигену збудника вірусної діареї ВРХ виявляли у діагностичному титрі 1:4. У лунки, які заздалегідь підготовлені для контрольних та досліджуваних зразків вносили по 100 мкл буферного розчину та по 25 мкл позитивного, негативного контролів і досліджуваних зразків сироваток крові.

Заповнений мікропланшет переносили у термошейкер за температури 18-26°C (рис. 3) на 90 хвилин для інкубації. За 10 хв. до кінця інкубації готували робочий розчин кон'югату.



Рис. 3 Термошейкер

Після закінчення інкубації мікропланшет поміщали до автоматичної мийки для мікропланшетів BioTek ELx50 (Рис.4) з метою проведення промивання лунок.

Промиті лунки обережно спустошували на паперовому рушнику чи серветці для максимальної аспірації рідини з лунок. Готовий робочий розчин кон'югату вносили по 100 мкл у кожну лунку мікропланшету.

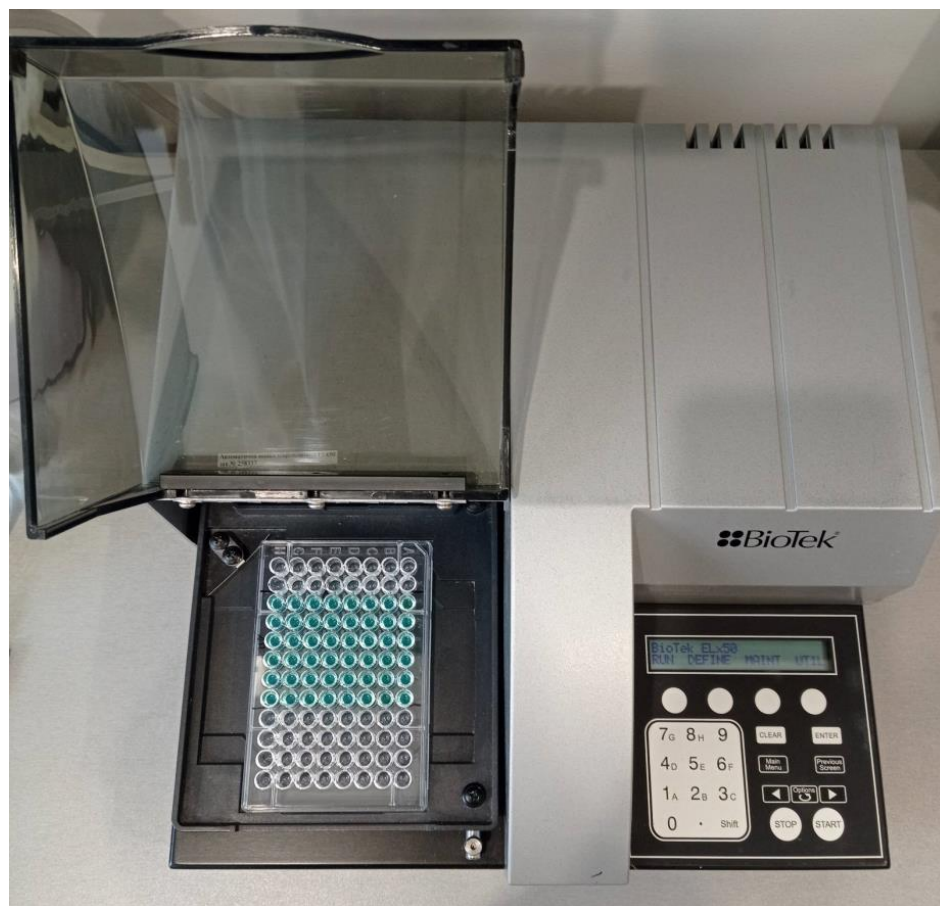


Рис. 4 Автоматичний промивач мікропланшет BioTek ELx50

Стрипи з кон'югатом поміщали у термошейкер для інкубації за температури 18-26°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 10 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 (Рис.5) та зчитували оптичні щільності кожної з лунок за допомогою комп'ютерної програми при довжині хвилі 450нм.



Рис.5 Автоматичний імуноферментний аналізатор-фотометр ELx800

Розрахунок показнику S/N проводили за формулою:

$$S/P = (\text{Ощ зразку} - \text{Ощ К-}) : (\text{Ощ К+} - \text{Ощ К-})$$

де:

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

Ощ. К+ – середнє значення оптичної щільності позитивного контрольного зразку;

Ощ. зразку – середнє значення оптичної щільності досліджуваного зразку.

Згідно інструкції до набору BVDV Total Ab, зразок вважали негавним при значенні показнику S/P менше 0,2%;

зразок вважали сумнівним при значенні показнику S/P в діапазоні 0,2-0,3%;

зразок вважали позитивним при значенні показнику S/P дорівнює або більше 0,3%

Специфічні імуноглобуліни до протеїну р80 вірусу вірусної діареї виявляли у діагностичному титрі 1:10. Для цього у лунки, що відведені для контрольних та досліджуваних зразків вносили по 90 мкл буферного розчину та по 10 мкл позитивного, негативного контролів і досліджуваних зразків сироваток крові.

Заповнений мікропланшет поміщали до термошейкеру за температури 37°C на 45 хвилин 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 мікропланшета. Стрипи з кон'югатом поміщали у термошейкер для інкубації за температури 21°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 21°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 «ID Screen BVD p80 Antibody Competition», зразок вважали позитивним при значенні показнику S/N менше або дорівнює 40%;

зразок вважали сумнівним при значенні показнику S/N в діапазоні 40-50 %;

Згідно інструкції до набору, зразок вважали негативним при значенні показнику S/N більше або дорівнює 50%.

Специфічні антигени збуднику вірусної діареї ВРХ виявляли у діагностичному титрі 1:1. У лунки, які заздалегідь підготовлені для контрольних та досліджуваних зразків вносили по 50 мкл буферного розчину та по 50 мкл позитивного, негативного контролів і досліджуваних зразків сироваток крові.

Заповнений мікропланшет переносили у термошейкеру за температури 37°C на 120 хвилин 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 промивання лунок. Промиті лунки обережно спустошували на паперовому рушнику чи серветці для максимальної аспірації рідини з лунок. Готовий робочий розчин кон'югату вносили по 100 мкл у кожен лунку мікропланшета. Стрипи з кон'югатом поміщали у термошейкер для інкубації за температури 18-26°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 10 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:

$$S-N = \text{Ощ зразку} - \text{Ощ К-}$$

де:

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

Ощ. зразку – середнє значення оптичної щільності досліджуваного зразку.

Згідно інструкції до набору BVDV Ag/Serum Plus, зразок вважали негавним при значенні показнику **S-N** менше або дорівнює 0,300 %; зразок вважали позитивним при значенні показнику **S-N** більше за 0,300%

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 за використання критерію 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 був створений на базі факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету (далі НДЦ). Свою роботу НДЦ започаткував відповідно наказу ректора закладу вищої освіти №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 державного аграрно-економічного університету. Очолює науково-дослідний центр доктор ветеринарних наук, професор ДДАЕУ Масюк Д. М.

Технічна компетентність вимірювальних процесів Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету підтверджена сертифікатом, виданим Українським біологічним центром сертифікації на відповідність (№ LB 13/2019 від 26.12.2019 р.), а також має акредитацію, присвоєну Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок (№ 027/вир. лаб. від 11 серпня 2017 року) для надання послуг з метою визначення біохімічних та гематологічних показників, оцінка якості корму, моніторингові дослідження щодо інфекційних патологій, а також визначення ГМО методом ПЛР.

У складі НДЦ налічується 5 відділів:

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

- імунохімічного та молекулярно-генетичного аналізу.

У функції інформаційно-аналітичний відділу входить проведення прийому та реєстрації зразків матеріалу, оформлення супутньої документації, відправлення оригіналів протоколів випробувань контрагенту.

Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу складається з лабораторії клінічної біохімії, що займається морфологічними та біохімічними дослідженнями біологічного матеріалу – кров, сеча; лабораторії хіміко-токсикологічних досліджень, на меті якої є визначення у біологічних субстратах вмісту найпоширених ксенобіотиків – мікотоксинів, пестицидів, мінеральних речовин, амінокислот, вітамінів, а також складових корму – сирого протеїну, жиру, клітковини, тощо.

Відділ бактеріології та біотехнології займається діагностикою інфекційних хвороб тварин з використанням методів класичної бактеріології. Провідні фахівці відділу займаються культивуванням, індикацією та ідентифікацією мікроорганізмів з подальшим встановленням їх чутливості до низки антибіотиків, виконують контроль за ефективністю дезінфекції, проводять ветеринарно-санітарні дослідження кормів, води та харчових продуктів.

Діагностикою хвороб тварин і визначенням їх імунного статусу займаються співробітники відділу морфологічних досліджень за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів. Також фахівці проводять також займаються визначенням мікроструктурного аналізу кормів, м'яса та м'ясних продуктів для встановлення їх якості та відповідності вимогам нормативної документації.

Відділу імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень підпорядковано лабораторія імунохімії та лабораторія 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 харчування і кормів.

Співробітники лабораторії імунохімії проводять дослідження, які

дозволяють проводити детекцію антитіл та антигенів до низки збудників у продуктивних та домішніх тварин методом імуноферментного аналізу. Антитіла метод дозволяє у сироватці чи плазмі крові, слині, молозиві та молоці різних видів самок, жовтку яєць, антигенів збудників інфекційних захворювань у біологічних рідинах організму та тканинах. Отримані результати дозволяють проводити моніторингові дослідження

Фахівці лабораторії проводять дослідження на сучасному обладнанні та реактивами: зразки, що надійшли на дослідження, зберігають у морозильній камері за температурного режиму від -18°C до -20°C ; реактиви зберігають у холодильній камері з температурним режимом від $+8^{\circ}\text{C}$ до $+2^{\circ}\text{C}$; для підготовки зразків до дослідження є вортекс, під час тестувань зразків користуються двома термошейкерами з температурним діапазоном $+21-37^{\circ}\text{C}$, у яких твердотільний термоблок для перемішування та витримуванням за необхідних температур полістеролових планшетів для ELISA; промивання полістеролових лунок при проведенні ІФА здійснюється в автоматичній мийці BioTek ELx50; зчитування оптичної щільності досліджених зразків проводиться на імуноферментному аналізаторі-фотометрі BioTek ELx800, що обладнаний фільтрами з довжиною хвилі 405, 450, 490 та 630 нм; дозування дослідного матеріалу та реактивів проводять набором одно- та восьмиканальних дозаторів з перемінним об'ємом, дозатори для зручності використання та забезпечення їх цілісності зберігаються на штативах, серед основних витратних матеріалів є накінцівники для дозаторів різного об'єму, пробірки типу «Еппендорф» об'ємом 1,5 та 0,5 мл, титр-трубки, гумові рукавички, а також використовують в рутинній роботі робочі штативи для мікропробірок, ємності для приготування та використання робочих розчинів та інше.

Всі прилади та обладнання, яке використовуються в лабораторіях науково-дослідного центру є технічно придатними до експлуатації, мають паспорт і робочу інструкцію з експлуатації, до роботи з ними допускають лише спеціально навчений персонал.

У приміщенні кожного відділу стіни, стеля та підлога вкриті вологостійким матеріалом для забезпечення проведення ретельної дезінфекції.

Утилізація залишків дослідженого матеріалу та використаного витратного матеріалу у НДЦ відбувається у спеціальнообладнаній кімнаті – автоклавній, що обладнана автоклавом об'ємом 65 л.

Таким чином, підбиваючи підсумок слід зауважити, що Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету улаштований новочасним обладнанням та приладами, екологічно-безпечними реактивами та і має відповідну документацію на проведення належних лабораторних досліджень.

2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз

2.3.1. Рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ

У результаті дослідження специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї встановлено, що рівень групового імунітету серед корів різних технологічних груп має тенденцію до збільшення кількості серопозитивних тварин у вибірці (таблиця 1).

Слід відзначити, що тварини всіх досліджених технологічних груп містять специфічні антитіла до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ.

Встановлено, що на тлі проведення імунопрофілактики інактивованою вакциною, наявність специфічних імуноглобулінів до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ свідчить про формування групового імунітету серед досліджених тварин. Варто зауважити на зростаючій тенденції кількості серопозитивних тварин відносно першої імунізації тварин.

Таблиця 1

Рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї у крові корів різних технологічних груп за активної імунопрофілактики (M±m, %)

| Доби, після отелення | Група тварин | | |
|-----------------------------------|----------------------|------------|----|
| | Позитивних тварин, % | S/P | CV |
| Корови 200-210 діб тільності | 100 | 0,41±0,011 | 56 |
| Крови за 30 діб до отелення | 100 | 0,45±0,025 | 63 |
| Крови через 30 діб після отелення | 100 | 0,59±0,014 | 39 |
| Корови на піку лактації | 100 | 0,57±0,085 | 29 |

Таким чином, проведення імунізації корів забезпечує ефективний захист тварин від збудника вірусної діареї ВРХ.

Слід зауважити, що показник CV корів на 200-210 добу тільності та за 30 дів до отелення істотно не відрізняються, проте з часом цей показник майже вдвічі зменшується у тварин через 30 дів після розтелення та корів на піку лактації.

Програми лабораторного моніторингу поголів'я, імунізованого інактивованою полівалентною вакциною, обов'язково включають тестування, спрямовані для виявлення тварин, серопозитивних за BVDV р80 (NS2-3).

З метою виключення циркуляції серед імунізованих корів збуднику вірусної діареї ВРХ було проведено тестування зразків, результати якого представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Рівень специфічних антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї у крові корів різних вікових груп за активної імунопрофілактики ($M \pm m$, %)

| Доби, після отелення | Позитивних тварин, % | S/N | CV |
|-------------------------------------|----------------------|-------------|----|
| Корови 200-210 дів тільності | 40 | 45,81±25,14 | 55 |
| Крови за 30 дів до розтелення | 50 | 44,57±29,15 | 66 |
| Крови через 30 дів після розтелення | 30 | 51,14±24,14 | 47 |
| Корови на піку лактації | 40 | 50,29±24,50 | 47 |

Рівень специфічних антитіл до протеїну р80 у сироватці крові тварин знаходиться в діапазоні – S/N 44-51, що обумовлено присутністю серопозитивних тварин, попри специфічну імунопрофілактику інактивованою вакциною. Водночас показник однорідності рівня специфічних антитіл до протеїну р80 у сироватці крові тварин в межах певної дослідженої групи знаходиться в діапазоні середніх значень з поступовим його зменшенням, що обумовлено зниженням кількості серопозитивних тварин у вибірці порівняно до тестувань корів 200-210 дів тільності та за 30 дів до розтелення.

Таким чином, у 100% тварин відсутні специфічні антитіла до збуднику

вірусної діареї ВРХ на тлі проведення імунізації інактивованою вакциною. Проте виявлення серопозитивних зразків вказує на циркуляцію епізоотичного штаму збуднику серед досліджених корів.

2.3.2. Визначення тривалості колострального імунітету до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ

У результаті проведеного дослідження встановлено, що зразки крові телят до ссання молозива не містять специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ (таблиця 3).

Одночасно сироватка крові телят добового віку була протестована на присутність антигенів вірусної діареї телят. Результати тестування знаходилися в межах значно нижче за 0,300, що згідно інтерпретації результатів, описаної в розділі «Матеріали та методи досліджень» вказує на відсутність трансплацентарного інфікування телят збудником *BVDV*.

Починаючи з 7-ї до 56-ї доби життя 100% телят мають високий рівень специфічних антитіл до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ. Починаючи з 63-ї доби життя у вибірці з'являються серонегативні тварини.

Аналізуючи значення показнику S/N телят вікового періоду з 7-ї до 56-ї доби життя встановлено, що вміст специфічних антитіл до збудника вірусної діареї ВРХ у крові тварин цих вікових груп має низхідну тенденцію, що пояснюється катаболізмом імуноглобулінів. Втім суттєвої різниці в кожній віковій групі не спостерігається, що підтверджено показником CV – однорідністю специфічних імуноглобулінів.

Рівень специфічних IgG антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ у крові телят дослідної групи перших 84 діб життя ($M \pm m$, %)

| Доба життя | Серопозитивних тварин, % | S/N | CV |
|------------|--------------------------|--------------|----|
| 0 | 0 | 0,07±0,01 | 18 |
| 7 | 100 | 1,13±0,13 | 11 |
| 14 | 100 | 0,93±0,10 | 10 |
| 21 | 100 | 0,80±0,10 | 12 |
| 28 | 100 | 0,69±0,10 | 14 |
| 35 | 100 | 0,60±0,10 | 16 |
| 42 | 100 | 0,51±0,10 | 19 |
| 49 | 100 | 0,38±0,13 | 18 |
| 56 | 100 | 0,31±0,06** | 19 |
| 63 | 60 | 0,25±0,13*** | 29 |
| 70 | 70 | 0,25±0,10*** | 40 |
| 77 | 70 | 0,27±0,18*** | 67 |
| 84 | 90 | 0,36±0,20*** | 55 |

Примітка: *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$, ***- $p \leq 0,001$ порівняно до значень телят 7 доби життя

Слід зауважити, що середнє значення показнику S/N у телят з 7 до 56 доби життя знаходиться в діапазоні від 0,31 % до 1,13%, а показник CV коливається у межах 11-19%, що вказує на гомогенний рівень специфічних імуноглобулінів до антигену. Виявлення специфічних імуноглобулінів у досліджених зразках вказує на 100% сформований груповий імунітет, який, більш за все, має колостральне походження.

Досліджуючи зразки крові від телят старших вікових груп встановлено, що з 63 доби життя тварини мають майже втричі, на 0,90% ($p \leq 0,01$) нижче значення показнику S/N порівняно до телят 7-ї доби життя. У тварин віком 70, 77 та 84 доби життя цей показник активно знижується у середньому на 24% порівняно до значень тварин попередньої групи.

Середній показник CV тварин вікової групи 70 діб життя збільшився на 4% порівняно зі значеннями тварин на 63 добу життя, на 6% - зі значеннями у телят на 77 добу життя, а порівняно телят 84 доби життя з тваринами 7-ї доби життя – 27%.

Слід відзначити, що серед телят 63- та 70-тидобового віку 50%, 77-тидобового – 60, та 84-добового віку – 70 % тварин виявилися серонегативними, що спричинено відсутністю специфічних імуноглобулінів до збуднику вірусної діареї ВРХ в діагностичному титрі 1:4. Це більш за все зумовлено природним катаболізмом колостральних антитіл.

Таким чином, збільшення показнику S/N, сприяє формуванню «серологічного вікна», що в подальшому може зумовити інфікування телят епізоотичним штамом збудника вірусної діареї ВРХ.

Отже, колостральний імунітет до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ у діагностичному титрі 1:4 зберігається включно до 56 доби життя у 100% телят. З 63 доби життя рівень специфічних антитіл поступово знижується і з'являються серонегативні тварини, попри проведення специфічної імунопрофілактики вже на 84 добу від народження.

Результати дослідження сироваткових антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ представлені в таблиці 4.

У телят до ссання молозива не виявлено специфічних антитіл до протеїну р80 вірусної діареї ВРХ. Це свідчить про відсутність трансплацентарної передачі збуднику телятам. Надалі виявлено, що 100% телят 7-28 добового віку містять специфічні антитіла. Виявлення специфічних до протеїну р80 імуноглобулінів у телят пояснюється впоювання їм молозива, яке отримано від корів 2-5 лактації, серед яких є серопозитивні за глікопротеїном р80, що підтверджено результатами дослідження.

Порівнюючи показник S/N встановлено, що його значення достовірно не відрізняється між віковими групами тварин з 7 до 28 доби життя і коливається у межах 7-27%. Середнє значення показнику CV складає близько 12%, що вказує на високий і гомогенний рівень антитіл та сформований груповий імунітет.

Рівень специфічних антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї у крові телят перших 84 діб життя (M±m, %)

| Доба життя | Серопозитивних тварин, % | S/N | CV |
|------------|--------------------------|---------------|----|
| 0 | 0 | 68,60±15,36 | 23 |
| 7 | 100 | 7,92±0,90 | 11 |
| 14 | 100 | 12,10±1,25 | 10 |
| 21 | 100 | 18,43±2,20 | 12 |
| 28 | 100 | 27,64±3,83 | 14 |
| 35 | 90 | 33,66±5,37 | 16 |
| 42 | 60 | 37,68±7,23 | 19 |
| 49 | 20 | 47,89±9,63*** | 20 |
| 56 | 30 | 42,40±8,49* | 20 |
| 63 | 70 | 33,90±10,27 | 30 |
| 70 | 80 | 29,10±12,06* | 41 |
| 77 | 90 | 25,84±13,21* | 51 |
| 84 | 90 | 17,91±16,46 | 92 |

Примітка: *- $p \leq 0,05$, **- $p \leq 0,01$, ***- $p \leq 0,001$ порівняно до значень телят 7 доби життя

Починаючи з 35 доби життя середній показник S/N збільшується на 5 % порівняно з показником тварин 7 доби життя, проте на 78% ($p \leq 0,001$) порівняно з показниками телят 84 доби життя.

Починаючи з 35 доби життя серед досліджених тварин виявлено збільшення середнього показнику S/N на 5% порівняно з тваринами 7-доби життя, що обумовлено появою у цій віковій групі серонегативних тварин.

У віковому періоді 42-49-56 діб життя виявлено відповідно 4-8-7 тварин, які не містять специфічних антитіл до протеїну р80.

Таким чином, можна зробити висновок, що тривалість колострального

імунітету у досліджених телят становить 42 доби життя. Згідно схеми імунопрофілактичних заходів, вакцинація тварин у господарстві починається у 2 місяці життя. Втім, у 63 доби життя виявлено 7 серопозитивних тварин, що можна пояснити початком сероконверсії внаслідок інфікування телят польовим штамом збуднику вірусної діареї телят.

Отже, дослідні телята мають високий рівень колостральних антитіл до протеїну р80 збудника вірусної діареї ВРХ, що активно знижується, але зберігається у 100% тварин до 28-добового віку, а вже на 49 добу життя виявлено 80% серонегативних телят. За встановлення факту захворювання на вірусну діарею у телят формується специфічний лактогенний імунітет, який зберігається у 100% тварин до 6-тижневого віку. З 7 тижня життя виявлено серонегативних тварин, які утворюють «серологічне вікно», що обумовлює сприйнятливість цих тварин до дії епізоотичного штаму вірусу, тобто появою «транзиторних тварин».

2.3.2 Рівень специфічних антитіл до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ у телят за активної імунопрофілактики

У результаті проведеного дослідження визначено вікову динаміку специфічних антитіл до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ на тлі застосування полівалентної інактивованої вакцини (таблиця 5).

Встановлено, що переважна більшість тварин всіх досліджених вікових груп з 3 до 12 місяців життя мають специфічні антитіла, рівень яких поступово знижується на кінець 12 місяця.

Рівень специфічних антитіл до збудника вірусної діареї у телят 3-місячного віку є досить гомогенним, на що вказує показник CV. Груповий імунітет в цій вковій групі сформований на 90%, оскільки серед досліджених зразків виявлено 10% серонегативних зразків.

**Рівень специфічних антитіл до антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ
у крові телят різних вікових груп за активної імунопрофілактики
($M \pm m$, %)**

| вік життя, міс | позитивних тварин, % | S/N | CV |
|-----------------------|---------------------------------|------------|-----------|
| 3 | 90 | 0,49±0,15 | 31 |
| 6 | 90 | 0,63±0,18 | 28 |
| 9 | 90 | 0,65±0,23 | 36 |
| 12 | 70 | 0,30±0,14 | 46 |

Враховуючи проведену активну імунопрофілактику у 2-місячному віці та ревакцинацію за 2 тижні, у досліджених тварин на 6 та 9 місяць життя виявлено високий та однорідний рівень специфічних антитіл. Проте, аналогічно результатам дослідження зразків телят тримісячного віку, у тварин 6-9-тимісячного віку виявлено тварин, у яких відсутні специфічні імуноглобуліни.

У групі тварин 12-місячного віку виявлено на 20 % менше серопозитивних тварин відносно телят 3-9-місячного віку.

Отже, рівень групового імунітету в жодній групі не досяг 100 %, що обумовлено присутністю серонегативної тварини.

Відсутність специфічних імуноглобулінів у вакцинованих телят може вказувати на циркуляцію польового збудника захворювання.

Залогом успішного оздоровлення господарства від збудника захворювання є виявлення, та обов'язкове видалення зі стада ПІ-тварин, які виділяють збудник вірусної діареї впродовж всього життя.

Моніторингові дослідження, спрямовані на контроль ефективності імунопрофілактичних заходів молодняку, проводять в господарстві щоквартально.

Результати визначення рівня антитіл до неструктурного протеїну р80 свідчать про недостатньо сформований груповий імунітет, оскільки серопревалентність у досліджених телят коливається в діапазоні 20-40 %.

(таблиця 6)

Таблиця 6

**Рівень специфічних антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ у крові телят різних вікових груп за активної імунопрофілактики
($M \pm m$, %)**

| вік життя, міс | позитивних тварин, % | S/N | CV |
|-----------------------|---------------------------------|-------------|-----------|
| 3 | 20 | 48,00±11,73 | 24 |
| 6 | 30 | 24,98±17,30 | 40 |
| 9 | 40 | 63,60±47,98 | 75 |
| 12 | 30 | 64,23±25,84 | 40 |

Середній рівень антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ у крові телят 3-місячного віку зберігається на високому рівні, незважаючи на те, що 20 % тварин є серопозитивними у цій віковій групі.

Починаючи з 6 місяця життя однорідність титрів знижується на 16 % порівняно з телятами 3-місячного віку, що обумовлено 30 % серопозитивних тварин. Слід відзначити, що в цей віковий період показник S/N є найнижчим серед всіх досліджених вікових груп імунованого молодняка.

Отже, після парентеральної імунізації у телят 9-місячного віку середній рівень антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ збільшився на 39 % відносно тварин 6-місячного віку, а кількість серопозитивних тварин збільшилася до 40%, через що титри антитіл є не гомогенними, і відповідно показник CV у цих тварин є найвищим.

У телят 12-місячного віку середній рівень антитіл виявився аналогічним показнику телят 9-місячного віку. Проте серопозитивних тварин виявлено на 10 % менше, й однорідність специфічних антитіл знижена, про що вказує показник CV, який менше на 35 % аналогічного показнику у 9-ти місячних телят.

Аналіз результатів дослідження сироватки крові імунованих тварин проти вірусної діареї показав, що відсутність специфічних антитіл у 10 % тварин як збуднику вірусної діареї, так і до протеїну р80, що свідчить про присутність у

стаді П-тварини.

Таким чином специфічні антитіла виявлені в імунізованих телят до протеїну р80 вказують на транзиторне інфікування телят, яке спричинене циркуляцією польового штаму збуднику вірусної діареї великої рогатої худоби.

2.4. Розрахунок економічної ефективності

Відповідно до останнього завдання, поставленого до виконання дипломної роботи, розраховано економічну ефективність застосування методу імуноферментного аналізу для контролю специфічної імунопрофілактики вірусної діареї ВРХ за використання інактивованої вакцини.

Складовими тарифного показнику на ветеринарні послуги (дослідження) в лабораторії імунохімії НДЦ є наступні показники:

1. Вартість одиниці часу лікаря ветеринарної медицини (техніка першої категорії), виходячи із середньомісячного рівня оплати праці, що складає 6423 грн.
2. Вартість реактивів та розхідних матеріалів, які необхідні для проведення дослідження, за цінами придбання.
3. Амортизація обладнання, що необхідне для проведення дослідження.

Таким чином, враховуючи вищезазначені тарифні складові проводимо обчислення розходів за одне дослідження.

Для проведення наукової роботи було досліджено 430 зразків сироваток крові від ВРХ та 36 контрольних зразки, які були поставлено у дублях відповідно до вимог інструкції із застосування діагностичного набору. На проведення досліджень технік першої категорії витратив 40 години.

Отже, розрахункові дані виглядають наступним чином:

$$ВР_{\text{день}} = О : 21 = 6423 : 21 = 305,86 \text{ (1 людина\день);}$$

$$ВР_{\text{год}} = ВР_{\text{день}} : 8 = 305,86 : 8 = 38,23 \text{ (1 людина\година);}$$

$$\mathbf{Вв1 = Т * ВР_{\text{год}} = Вв1 = 40 * 38,23 = 1\ 529,29 \text{ (грн)}}$$

Очевидно, що для виконання аналізу ІФА ветеринарні витрати на роботу лікаря ветеринарної медицини становили 1529,29 грн.

Витрати на реактиви та допоміжний матеріал, необхідний для проведення імуноферментного аналізу на виявлення специфічних антитіл до антигенів gВ, протеїну р80 та антигенів збуднику вірусної діареї обчислюємо за формулою:

$$\mathbf{Вв2 = (Ц_y : К) * В_a}$$

де:

C_y – ціна, грн / за упаковку, штук;

K – кількість штук / тестів в упаковці;

V_a – витрата для аналізу зразків / штук.

Розрахунки представлені у таблиці 7.

Таблиця 7

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 | 47 717,40 | 452 зразки | 22 466,9 |
| Тест система ELISA протеїн р80 на 480 тестів | 56 050,40 | 452 зразки | 26 390,40 |
| Тест система ELISA Ag на 480 тестів | 59 870,40 | 14 зразків | 1 746,22 |
| Накінцівники на 1000мкл | 84,11 грн. / 1000 шт | 476 шт. | 43,06 |
| Накінцівники на 200 мкл | 117,00 грн. / 1000 шт | 905 шт. | 110,09 |
| Накінцівники на 10 мкл | 142,99 грн. / 1000 шт | 476 шт. | 439,26 |
| Пробірки типу «Еппендорф» 1,5 мл | 284,00 грн. / 500 шт | 430 шт. | 73,21 |
| Пробірки типу «Еппендорф» 0,5 мл | 142,00 грн. / 500 шт | 430 шт. | 264,68 |
| Всього: | | | 51 226,96 |

Цифрові дані, які представлені, ветеринарні затрати на реактиви та розхідні матеріали для проведення ІФА становлять:

$V_{в2} = 51\ 226,96$ грн.

Одночасно проводимо розрахунок вартості амортизації обладнання за дослідження 430 зразків сироваток крові від ВРХ та 36 контрольних зразки в двох повтореннях на виявлення специфічних антитіл до антигенів gB, протеїну р80 та антигенів збуднику вірусної діареї методом ІФА.

Оцінка лабораторного обладнання для проведення досліджень методом

ІФА, що складається з термошейкеру, автоматичної мийки для мікропланшет та імуноферментного аналізаторфотометру, складає – 434 250,00 грн.

Виходячи з вищенаведеного проводимо розрахунки:

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

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

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

$$VA = VA_{\text{день}} : 8 = 344,64 : 8 = 43,08 \text{ грн на 1 годину.}$$

$$\mathbf{ВвЗ = VA * T = 43,08 * 40 = 1\,723,21 \text{ грн.}}$$

Отже, вартість амортизації обладнання за дослідження на виявлення специфічних антитіл до антигенів протеїну р80 та збуднику вірусної діареї методом ІФА становить 1 723,21 грн.

Загальні ветеринарні витрати на проведення досліджень методом ІФА становлять:

$$\mathbf{Вв_{\text{заг}} = (1\,529,29 + 51\,226,96 + 1\,723,21) / 466 = 116,91 \text{ грн}}$$

Проведені розрахунки на визначення ветеринарних витрат на проведення імуно-ферментного аналізу одного зразку від дослідної тварини складають 116,91 грн.

У науково-дослідному центрі дослідження специфічних антитіл до антигенів gВ збуднику вірусної діареї в одному зразку сироватки крові від дослідної тварини коштує 180 грн, специфічних антитіл до протеїну р80 – 146 грн, власне антигенів збуднику вірусної діареї – 219 грн.

Економічну ефективність визначаємо за формулою:

$$Ee = Vд - Vв_{заг}$$

де:

$Vд$ – вартість дослідження одного зразку сироватки крові від дослідної тварини;

$Vв_{заг}$ - 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 gВ збуднику вірусної діареї:

$$Ee = 146 - 116,91 = 29,09 \text{ грн.}$$

2. виявлення специфічних антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ:

$$Ee = 180 - 116,91 = 63,09 \text{ грн.}$$

3. виявлення антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ:

$$Ee = 219 - 116,91 = 102,09 \text{ грн.}$$

Таким чином, економічна ефективність застосування методу імуноферментного дослідження за виявлення специфічних антитіл до антигенів gВ збуднику вірусної діареї ВРХ становить 29,09 грн на одну пробу від досліджуваної тварини, виявлення специфічних антитіл до протеїну р80 збуднику вірусної діареї ВРХ– 63,09 грн, виявлення антигенів збуднику вірусної діареї ВРХ– 102,09 грн

3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

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

Законодавство України про охорону праці поєднує низку документів серед яких – 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 [52].

Охорона праці у науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК забезпечується відповідно до наказу Держнаглядохоронпраці 20.04.99 №67, що затверджено та зареєстровано Міністерством юстиції України 11 жовтня 1999 р. за №695/3988 [47].

До роботи співробітники лабораторії допускаються за наявності відповідної підготовки, лише після проходження інструктажу. При проведенні інструктажу відбувається опрацювання основних правил безпеки під час виконання лабораторної роботи та по її закінченню. Дані про проведення інструктажу вносять у «Журнал реєстрації інструктажу на робочому місці». Володіння необхідними знаннями щодо проведення методики безпечного випробування та використання обладнання дозволяють безечно проводити випробування.

Працівники при прийнятті на роботу до науково-дослідного центру укладають колективний договір, в якому визначено здійснення комплексних заходів щодо організації безпечних умов праці та попередження й недопущення виробничого травматизму та професійних захворювань, визначені обов'язки сторін, а також впровадження до застосування працівниками своїх прав та соціальних гарантій з охорони праці.

Зобов'язання щодо організації навчання та планування заходів у сфері

охорони праці у НДЦ покладено на 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.

У кожному підрозділі НДЦ відповідальність за дотримання правил техніки безпеки полягає на завідувачах 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 [52].

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 огорожена парканом з металевого прута, облаштовані автоматичні ворота, за для зручного пересування викладена тротуарною плиткою, ввечері та у вихідні й святкові дні ворота зачинені. Вхід до науково-дослідного центру контролюється відеокамерою та домофоном. Сторонні особи до лабораторії не допускаються.

В приміщеннях НДЦ підтримують сталий мікроклімат, за основними гігієнічними показниками, серед яких: температура в приміщеннях від 20°C до 25°C, відносна вологість 60-75%, швидкість руху повітря 0,1 м/с. За допомогою вентиляційних шаф, якими оснащені приміщення, забезпечується постійна циркуляція повітря в робочих зонах.

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

Першочергово, до входу до відділу лабораторії, працівник одягає спецодяг (медичний білий халат, медичну шапочку або білу хустинку та спеціальне змінне взуття).

До початку та після закінчення роботи виробничі приміщення лабораторії підлягають прибиранню 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».

Під час роботи з патологічним матеріалом працівник суворо дотримується правил безпеки. Працювати потрібно лише в гумових рукавичках, забороняється торкатись досліджуваного матеріалу руками без захисту, 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 та утилізації. Скляний, порцеляновий чи металевий лабораторний посуд, а також інструменти та штативи після роботи з ними поміщаються в дезінфекційний розчин.

По закінченню роботи з досліджуваним матеріалом поверхні робочого місця та приладів підлягають обробці відповідним дезінфекційним розчином. Залишки дослідного матеріалу заморожують, для архівування.

Відпрацьований матеріал з архіву знезаражується шляхом автоклавування. Робота з автоклавом дозволена лише тим працівникам, які пройшли медичну перевірку, мають відповідний рівень підготовки, 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 [54].

Факультет ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ, де розміщений Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК, облаштований відводом блискавок, який встановлений на даху приміщення.

ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

ВИСНОВКИ

У дипломній роботі наведено дані щодо вирішення завдань з визначення особливостей лабораторного контролю специфічної імунопрофілактики проти вірусної діареї ВРХ, що підтверджується наступними висновками:

1. Груповий імунітет серед корів за парентеральної імунізації сформований на 100 %. Груповий імунітет до неструктурного глікопротеїну р80 становить в середньому 45 %, що вказує на циркуляцію польового збуднику вірусної діареї серед тварин.

2. Новонароджені телята до ссання молозива не містять специфічних антитіл IgG до збудника вірусної діареї. З 7 доби життя у крові 100% телят містяться колостральні антитіла, специфічні до антигенів вірусної діареї, які зберігаються до 70 добового віку. На 63 добу від народження виявлено 40 % серонегативних телят, що пов'язано з природнім катаболізмом колостральних імуноглобулінів.

Груповий імунітет до глікопротеїну р80 серед досліджених телят триває з 7 до 28 доби життя включно. На 49 добу виявлено лише 20 % серопозитивних тварин. Результати тестування зразків безмолозивних телят не виявили антигени збудника вірусної діареї, що підтверджує відсутність трансплацентарного інфікування телят.

3. Серед досліджених імунізованих телят 3-6 місячного віку виявлено 90 % тварин, які містять антитіла до антигенів збудника вірусної діареї ВРХ, рівень яких знижується до 70% у 12 місяців життя. Тестування сироваток крові імунізованих телят на наявність неструктурного глікопротеїну р80 у телят виявило в середньому по стаду 30 % серопозитивних тварин. Відсутність специфічних антитіл у 10 % імунізованих телят, в тому числі і до протеїну р80, свідчить про наявність у них персистентної інфекції.

4. Економічна ефективність застосування методу ІФА для виявлення імуноглобулінів специфічних до антигенів, протеїну р80 збудника вірусної

діареї складає відповідно 29,09 грн та 63,09 грн на одну пробу, а виявлення антигенів – 102,09 грн.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для лабораторного контролю трансплацентарної передачі збуднику вірусної діареї визначати наявність антигенів у сироватці крові безмолозивних телят за допомогою тест-набору «Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen Test kit/serum plus» (США).

Для контролю ефективності імунопрофілактики за використання інактивованої вакцини та виявлення поствакцинальних антитіл проводити тестування сироваток крові із використанням тест-систем «Bovine Viral Diarrhoea Virus Total Antibody Test kit» («IDEXX» США).

Для виявлення епізоотичного збуднику проводити визначення наявності антитіл до протеїну р80-125 (NS2-3) вірусу вірусної діареї за допомогою конкурентного імуноферментного аналізу із використанням тест-систем «ID Screen BVD р80 Antibody Competition» («ID vet» Франція).

У господарствах рекомендовано проводити моніторингові дослідження щодо контролю імунізації, тривалості колострального імунітету за вірусної діареї з подальшим оздоровленням поголів'я та обов'язковим видаленням персистентно інфікованих тварин.

Список використаної літератури

1. Bachofen C, Vogt HR, Stalder H, et al. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res.* 2013;44:32
2. Beaudeau F, Assie S, Seegers H, Belloc C, Sellai E and Joly A. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk. *Veterinary Record* 2001; 149: 236-240.
3. Bitsch V and R. Onsholt L. Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 1995; 627-640.
4. Callan RJ, Schnackel JA, Van Campen H, Mortimer RG, Cavender JA and Williams ES. Percutaneous collection of fetal fluids for detection of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; 220: 1348-1352.
5. Carlsson U. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec.* 1991;128:145-147.
6. Charleston B, Fary MD, Baigent S, Carr BV and Morrison WI. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *Journal of General Virology* 2001; 82 1893-1897.
7. Chernick A, van der Meer F. Evolution of Bovine viral diarrhoea virus in Canada from 1997 to 2013. *Virology.* 2017;509:232-238.
8. Downey-Slinker ED, Ridpath JF, Sawyer JE, Skow LC, Herring AD. Antibody titers to vaccination are not predictive of level of protection against a BVDV type 1b challenge in *Bos indicus* - *Bos taurus* steers. *Vaccine.* 2016;34:5053-5059.
9. Edwards S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea- mucosal disease in cattle. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Épizooties* 1990; 9:

115-130.

10. Ellis J, West K, Cortese V, Konoby C and Weigel D. Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type 1 in young calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 219: 351-356.

11. Evans CA, Lanyon SR, Reichel MP. Investigation of AGID and two commercial ELISAs for the detection of Bovine viral diarrhoea virus-specific antibodies in sheep serum. *J Vet Diagn Invest.* 2017;29:181-185.

12. Fredriksen B, Press CM, Sandvik T, Odegaard SA and Laken T. Detection of viral antigen in placenta and fetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 267-275.

13. Fulton RW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus 1a. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:31-37.

14. Graham DA, German A, McLaren IE and Fitzpatrick DA. Testing of bulk tank milk from Northern Ireland dairy herds for viral RNA and antibody to bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record* 2001; 149: 261-265.

15. Holmquist G, Toomik R, Rodgers S, Lawrence J and Ballagí A. Laboratory diagnosis of BVDV by using ELISA for antigen and antibody detection. In: *Detecting and controlling BVDV infections: Conference proceedings, 2002.* Ames, Iowa, 4-5 April 2002. p. 27.

16. Howard CJ. Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections, *Revue Scientifique et Technique, Office International des Épidémiologies* 1990; 9: 95-103.

17. Husu J and Kulkas L. The control programmes against BVDV. *Suomen Eläinlääkärilehti* 1993; 99: 482-483.

18. Jarvinen JA, O'Connor AM. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus in alpacas in the United States and assessment of risk factors for exposure, 2006-2007. *J Am Vet Med Assoc.* 2014;245:696-703.

19. Kelling CL. Evolution of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004;20:115-129.
20. Lanyon SR, Hill FI, Reichel MP, Brownlie J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J.* 2014;199:201-209.
21. Meyling A and Jensen AM. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Veterinary Microbiology* 1988; 17: 97-105.
22. Neill JD, Workman AM, Hesse R, et al. Identification of BVDV2b and 2c subgenotypes in the United States: genetic and antigenic characterization. *Virology.* 2019;528:19-29.
23. Nelson DD, Duprau JL, Wolff PL, et al. Persistent bovine viral diarrhea virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the mountain goat (*Oreamnos americanus*). *Front Microbiol.* 2015;6:1415.
24. Niskanen R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Veterinary Record* 1993; 133: 341-344.
25. Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA and Haines DM. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000; 12: 393-399.
26. Passler T, Ditchkoff SS, Givens MD, Brock KV, Deyoung RW, Walz PH. Transmission of bovine viral diarrhea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res.* 2010;41:20.
27. Paton DJ, Carlsson U, Lowings JP, Sands JJ, Vilcek S and Alenius S. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology* 1995; 43: 283-294.
28. Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003;31:107-112.
29. Potgieter LND. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 1995; 501

30. Ridpath JE, Neill JD, Endsley J and Roth JA. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. *American Journal of Veterinary Research* 2003; 64: 65-69.
31. Rufenacht J, Schaller P, Audige L, Strasser M and Peterhans E. Prevalence of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus in Switzerland. *Veterinary Record* 2000; 147: 413-417.
32. Rweyemamu MM, Fernández AA, Espinosa AM, Schudel AA, Lager IA and Mueller SBK. Incidence, epidemiology and control of bovine virus diarrhoea virus in South America. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Épizooties* 1990; 9: 207-214.
33. Sandvik T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology* 1999; 64: 123-134.
34. Schreiber P, Dubois F, Dreze F, Lacroix N, Limbourg B and Coppe P. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Veterinary Quarterly* 1999; 21: 28-32.
35. Sims SK, Lanyon SR, Cockcroft PD, Reichel MP. Comparison of serum, ear notches, and nasal and saliva swabs for Bovine viral diarrhoea virus antigen detection in colostrum-fed persistently infected (PI) calves and non-PI calves. *J Vet Diagn Invest.* 2014;26:783-787.
36. Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, Damiani P, Bishop MD and Wright JC. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. *Theriogenology* 2000; 53: 827-839.
37. Synge BA, Clark AM, Moar JAE, Nicolson JT, Nettleton PF and Herring JA. The control of bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 1999; 64: 223-229.
38. Tajima M. Bovine viral diarrhoea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet Microbiol.* 2004;99:131-138.
39. Tao J, Liao J, Wang Y, Zhang X, Wang J, Zhu G. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. *Vet Microbiol.* 2013;165:185-189.

40. Walz PH, Grooms DL, Passler T, et al. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J Vet Intern Med.* 2010;24:476-486.
41. World Organization for Animal Health [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Bovine viral diarrhoea // Paris: OIE; 2015. Available at: <https://www.oie.int/en/disease/bovine-viral-diarrhoea/>.
42. Xue W, Mattick D, Smith L, Umbaugh J, Trigo E. Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1b strains. *Vaccine.* 2010;29:70-76.
43. Бакулов И.А. Эпизоотология с микробиологией Москва: "Агропромиздат", 1987. – 415 с.
44. Довідник лікаря ветеринарної медицини/ П.І. Вербицький, П.П. Достоевський. - К.: «Урожай», 2004. – 128 с.
45. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А., Е.С. Воронин и др.; Под ред. А.А. Сидорчука. -- М.: Колосс, 2007. -- 671 с.
46. Каришева А. Ф. Спеціальна епізоотологія: Підручник. — К.: Вища освіта, 2002. — 703 с.
47. 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.
48. Організація профілактичних та оздоровчих заходів при інфекційних хворобах тварин: [методичний посібник]; - Житомир: Рута, 2013. – 65-75с.
49. Урбан В.П. Практикум по эпизоотологии и инфекционным болезням с ветеринарной санитарией. Л.: ВО Агропромиздат, 1987.- 269 с.
50. Факторні хвороби сільськогосподарських тварин / В.П. Литвин, Л.В.Олійник, Л.Є. Корнієнко та ін. – Біла Церква, 2002.– 303 с
51. 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)
52. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення основних

понять.

53. Наказ Державний комітет України з нагляду за охороною праці № 255 від 15.11.2004 «Про затвердження Типового положення про службу охорони праці»

54. ДСТУ 3855-99. Пожежна безпека. Визначення пожежної небезпеки матеріалів та конструкцій. Терміни та визначення

55. Методичні рекомендації до виконання і захисту дипломних робіт освітньо-кваліфікаційних рівнів «Бакалавр» і «Магістр» ветеринарної медицини / Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. – 2015.– 60с.

QUALITY CONTROL DATA SHEET – FICHE DE CONTRÔLE QUALITÉ

ID Screen® BVD p80 Antibody Competition

Product code / Code Produit : BVDC
 Batch / N° de lot: H81
 Manufacture date / Date de fabrication: 2020/12
 Expiry date / Date d'expiration: 2022/12

KIT COMPONENTS / COMPOSITION DU KIT

| Composants / Composants / Componentes | Lot / Lots | | |
|--|-------------|-------------|---------|
| Control complete / Microplaque sensibilisée / Microplaque sensibilisée | 983-014 | | |
| Positive Control / Contrôle positif / Contrôle positif | 983-3,5-015 | | |
| Negative Control / Contrôle négatif / Contrôle négatif | 37-006 | | |
| Milk Negative Control / Contrôle négatif Lait / Contrôle négatif Lait | 47-3,5-004 | | |
| Dilution buffer 10 / Tampon de dilution 10 / Diluente 10 | 19-401 | | |
| Ready to use conjugate 1 X / Conjugat prêt à l'emploi 1 X / Conjugato listo para usar 1X | 983-014 | | |
| Wash concentrate 20X / Solution de lavage 20X / Solución de lavado 20X | 15-101 | | |
| Substrate solution / Solution de révélation / Solución de revelación | 7-019 | | |
| Stop solution / Solution d'arrêt / Solución de parada | 10-102 | | |
| Product Code / Code Produit | BVDC | Batch / lot | H81 |
| Item / Mode d'emploi | 01711020 | Exp. | 2022/12 |

ACTIVITY / ACTIVITÉ

Short incubation / Incubation courte :

Mean OD of Milk Negative Control / DO moyenne du Contrôle négatif lait 1.325*
 Mean OD of Negative Control / DO moyenne du Contrôle négatif 1.142*
 Mean OD of Positive Control / DO moyenne du Contrôle Positif 0.075*

Overnight incubation / Incubation longue :

Mean OD of Milk Negative Control / DO moyenne du Contrôle négatif lait 1.271*
 Mean OD of Negative Control / DO moyenne du Contrôle négatif 1.188*
 Mean OD of Positive Control / DO moyenne du Contrôle Positif 0.068*

* 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 / CONTRÔLE DE LA SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

The analytical sensitivity is tested using an internal weak positive standard (a strong positive serum diluted in a negative one) produced by IDvet. By analyzing this internal standard, IDvet is able to guarantee that the kit's analytical sensitivity remains constant between batches.

La sensibilité analytique est obtenue par dilution d'un sérum faiblement positif (sérum positif fort dilué dans un sérum négatif) fabriqué par IDvet. Ce standard permet de garantir une sensibilité analytique constante d'un lot de kit à l'autre.

SENSITIVITY CONTROL / CONTROLE DE LA SENSIBILITE

110 positive sera were tested (origin: France); these 110 samples were found positive.
8 sera from experimentally infected cows (BVD-1) and 1 VNT positive serum (BVD-2), were tested. All sera were found positive.

55 positive milk samples were tested (origin: France); these 55 samples were found positive.

110 sérums positifs ont été testés (origine : France); les 110 échantillons ont été trouvés positifs.
8 sérums, provenant d'animaux expérimentalement infectés avec une souche de BVD-1, et 1 sérum (BVD-2), positifs en séroneutralisation, ont été testés. Les 9 échantillons ont été trouvés positifs.
55 laits positifs ont été testés (origine : France); les 55 échantillons ont été trouvés positifs.

SPECIFICITY CONTROL / CONTROLE DE LA SPECIFICITE

100 negative sera and 50 negative milk samples were tested (origin: France); all samples were found negative.

100 sérums négatifs et 50 laits négatifs ont été testés (origine: France); tous les échantillons ont été trouvés négatifs.

REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY CONTROLS / CONTROLE DES REPETABILITE ET REPRODUCIBILITE

Intra-plate repeatability was evaluated by measuring the coefficient of variation (CV %) of 90 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 5% 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 90 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 5% 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

ID Screen®
BVD p80 Antibody Competition



Тест-система для выявления антител, направленных против протеина р80-125 (NS2-3) вируса BVD / MD / BD конкурентным иммуноферментным методом (ELISA) в образцах сыворотки, плазмы или образцах молока (индивидуальных или пулов) крупного рогатого скота, овец, коз или других восприимчивых к вирусу видов

Инструкция 1 / 2

Для образцов сыворотки и плазмы крови

Для образцов молока использовать инструкцию 2 / 2

Короткая или ночная инкубация

Для применения *in vitro*

Январь 2017

- Изменения некоторых параметров при разведении контрольных образцов и образцов сыворотки или плазмы (для короткой или ночной инкубации)
- Ночная инкубация образцов сыворотки или плазмы осуществляется при температуре 5°C
- Новый протокол для смесей образцов сыворотки или плазмы

BVDC версия 0117 RU

IDvet, 310, rue Louis Pasteur – Grabels - FRANCE
Tel: +33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: +33 (0)4 67 45 36 95
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

007/385

Интерпретация

Для каждого исследуемого образца рассчитывается процент концентрации SN (SN%):

$$S/N \% = \frac{OPI_{образца}}{OPI_{К-}} \times 100$$

■ Индивидуальные образцы сыворотки или плазмы крови:

| Результат | Имунный статус |
|------------------|----------------|
| SN % ≤ 40% | ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ |
| 40% < SN % ≤ 50% | СОМНИТЕЛЬНЫЙ |
| SN % > 50% | ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ |

■ Пулы образцов сыворотки или плазмы крови:

| Результат | Имунный статус |
|------------|----------------|
| SN % ≥ 80% | ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ |
| SN % < 80% | ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ |

Корреляция между значениями SN% в образцах пулов сыворотки или плазмы и серопреvalентность внутри стада:

| Результат | Серопреvalентность | Интерпретация |
|------------|--|---|
| SN % < 35% | Отсутствие серопозитивных с Р80 животными с вероятностью выше 50% | Подозрение на отсутствие вирусной инфекции в прошлом или настоящем (активная инфекция или отсутствие инфекции вируса) |
| SN % ≥ 35% | Присутствие серопозитивных с Р80 животными с вероятностью ниже 50% | Низкая вероятность вирусной инфекции |

• **Ночная инкубация**

- Внести:
 - 90 мкл Буферного раствора 19 в каждую лунку.
 - 10 мкл Положительного контроля в лунки A1 и B1.
 - 10 мкл Отрицательного контроля в лунки C1 и D1.
 - 10 мкл каждого испытуемого образца в оставшиеся лунки.
 - Закреть микротитрационный планшет и инкубировать от 16 до 20 часов (в течение ночи) при температуре 5°C (±3°C).
 - Спустошить лунки. Промыть микротитрационный планшет 3 раза Промывочным раствором, внося 300 мкл в каждую лунку. Избегать высыхания лунок между этапами промывки.
- **Для всех протоколов:**
- Внести 100 мкл Конъюгата, готового к применению в каждую лунку.
 - Закреть микротитрационный планшет и инкубировать 30 мин ± 3 мин при температуре 21°C (± 5°C).
 - Спустошить лунки. Промыть микротитрационный планшет 3 раза Промывочным раствором, внося 300 мкл в каждую лунку. Избегать высыхания лунок между этапами промывки.
 - Внести 100 мкл Субстратного раствора в каждую лунку.
 - Закреть микротитрационный планшет и инкубировать 15 мин ± 2 мин при температуре 21°C (± 5°C) в темноте.
 - Внести 100 мкл Стоп-реагента в каждую лунку для остановки реакции в том же порядке, как в п.7.
 - Измерить оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм.

Валидация

Результаты теста считаются достоверными, если:

- ✓ среднее значение оптической плотности Отрицательного контроля (ОП_{К-}) больше 0.7.

$$OPI_{К-} > 0.7$$

- ✓ отклонение между средними значениями ОП положительного контроля (ОП_{К+}) и отрицательного контроля (ОП_{К-}) меньше 3

$$OPI_{К+} / OPI_{К-} < 0.3$$

Общая информация

Диагностический набор конуричного иммуноферментного анализа, предназначенный для выявления антител, направленных против протеина р80-125 (таков известный, как NSP2-3) при заболевании Бычьей вирусной диареей (Вирус крупного рогатого скота) / Болезнь слизистых оболочек / Мукозная болезнь.

Для тестирования и диагностики могут быть использованы образцы сыворотки или плазмы крови (как отдельные образцы, так и пулы до 10 образцов), а также образцы молока (неиндивидуальные или пулы).

Этот тест также может быть использован для образцов сыворотки или плазмы крови (отдельные образцы или пулы до 5 образцов) для диагностики Бородеи болезни (Пограничной болезни овец — ПБСО) у мелких жвачных животных.

В этом документе описан протокол для тестирования образцов сыворотки и плазмы крови. Для тестирования образцов молока, пожалуйста, обратитесь к сопроводительной инструкции по применению («Протокол 2/2»).

Описание и принцип действия

Лучик микроплашета sensibilizированы очищенным антигеном р80 вируса ВУД. При высывании в лунки микроплашета исследуемых образцов, антигена анти-р80, специфичные к ВУД, связываются на твердой фазе с антигенами, образуя комплексы антиген-антитело, которые фиксируют антитела р80.

После этапа промывки, в лунки вносятся конъюгат анти-р80, меченый пероксидазой НРР. Он фиксируется на оставшихся свободными эпитопах, образуя комплекс антиген-конъюгат-НРР.

Избыток конъюгата удаляется промывкой, и высвобождаются субстрат (ТМВ).

Полученная окраска зависит от количества специфических антител, присутствующих в образце для тестирования.

- При отсутствии антител раствор имеет синий цвет, который становится желтым после добавления стоп-реагента;
- При наличии антител раствор не окрашивается.

Оптическое плотность раствора измеряют фотометрически при длине волны 450 нм.

Страница 2
ВУДС версия 01/17 RU

Компоненты набора

| Реагент* |
|---|
| Микроплашета, лунки которого покрыты очищенным антигеном р80 вируса ВУД |
| Конъюгат готовый к употреблению (1X) |
| Положительный контроль |
| Отрицательный контроль |
| Отрицательный контроль для МОПМА |
| Буферный раствор 19 |
| Концентрат промывочного раствора (20 X) |
| Субстратный раствор |
| Стоп-реагент (0,5 M) |

* Доставляемые количества компонентов обозначены на этикетке компонента.

1. Конъюгат, контрольные сыворотки и субстратный раствор хранят при T +5°C (± 3°C).
2. Другие реагенты хранят при T +2°C и +28°C.
3. Промывочный, субстратный растворы и стоп-реагент могут быть использованы для всего ассортимента продукции IDvet. Буферные растворы с одинаковыми номерами серий - взаимозаменяемы.

Примечание: в случае необходимости, IDvet может предоставить вам дополнительные объемы указанных выше компонентов.

Дополнительные материалы и оборудование, не поставляемые с наборами

1. Пипетки одноканальные и 8-канальные, откалиброванные к объемам 10 мкл, 100 мкл и 300 мкл.
2. Однокановые наконечники к пипеткам.
3. Фотометр оптической плотности для 96-луночного микроплашета.
4. Дистиллированная и деионизированная вода.
5. Ручная или автоматическая промывочная установка.
6. 96-луночный микроплашета для предварительного разведения образцов.

Меры предосторожности

1. Не пипетировать растворы ртом.
2. Субстратный раствор может вызвать раздражение кожи в случае контакта.
3. Стоп-реагент (0,5 M) может быть опасен при проглатывании. Раствор может стать пренной

разраженный при контакте с кожей (R22-R43).

Избегать контакта с кожей (S34-S37)

4. Не оставлять субстратный раствор под действием прямого солнечного света и не допускать его испарения.

5. Все отходы должны быть нейтрализованы образцом дезактивированной водой, утилизируются. Дезактивация должна проводиться в соответствии с местными санитарными правилами об утилизации и обезвреживания отходов

Подготовка образцов

Во избежание разливы во время высывания образцов, рекомендуется предварительно внести все образцы и контроли в отдельный 96-луночный микроплашета, затем внести миксованным дозатором в рабочий микроплашета.

Подготовка промывочного раствора

Дозировка концентрат промывочного раствора (20x) до комнатной температуры (+21°C (±15°C) перед разведением. При наличии кристаллов необходимо тщательно перемешать.

Для приготовления промывочного раствора (1X) необходимо развести концентрат промывочного раствора (20X) в соотношении 1:20 в дистиллированной/деионизированной воде.

Качество промывки может существенно влиять на результаты анализа. Убедитесь, что в лунках не остается капля раствора между промывками. При использовании автоматической промывочной установки, крайне важно правильно выбрать параметры: режим, тип аспирации, высота аспирации. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к документу "Duet Washing Guide", доступный по запросу по электронному адресу info@idvet.com

Процедура анализа для образцов сыворотки или крови

Все реагенты набора перед использованием должны иметь комнатную температуру и однородность (перемешиваем флакон перед применением или перемешиваем с помощью Vortex).

Индивидуальные образцы сыворотки или крови

1. Вынести
 - 50 мкл Буферного раствора 19 в каждую лунку.
 - 10 мкл Положительного контроля в лунки A1 и B1.

1. 10 мкл Отрицательного контроля в лунки C1 и D1.
- 10 мкл воздуха испытываемого образца в оставшиеся лунки

2. Закрыть микроплашета и инкубировать 48 мин ± 5 мин при температуре 37°C (±3°C).

3. Опустошить лунки. Промыть микроплашета 3 раза Промывочным раствором, внося 300 мкл в каждую лунку. Избегать высывания лунки между этапами промывки.

Ночная инкубация

1. Образцы для тестирования разбавляются в соотношении 1:50 следующим образом:

- а) В 96-луночный микроплашета для предварительного разведения образцов внести:
 - 5 мкл Положительного контроля в лунки A1 и B1.
 - 5 мкл Отрицательного контроля в лунки C1 и D1.
 - 5 мкл воздуха испытываемого образца в оставшиеся лунки
 - 245 мкл Буферного раствора 19 в каждую лунку.
- б) В рабочий микроплашета внести:
 - 100 мкл предварительно разбавленного Отрицательного контроля в лунки A1 и B1
 - 100 мкл предварительно разбавленного Положительного контроля в лунки C1 и D1
 - 100 мкл предварительно разбавленного образца в оставшиеся лунки

2. Закрыть микроплашета и инкубировать от 16 до 20 часов (в течение ночи) при температуре 5°C (±3°C).

3. Опустошить лунки. Промыть микроплашета 3 раза Промывочным раствором, внося 300 мкл в каждую лунку. Избегать высывания лунки между этапами промывки.

Пулы сыворотки или плазмы (до 10 образцов сывороток НРС в до 5 образцов млекопитающих животных)

Короткая инкубация

1. Вынести
 - 50 мкл Буферного раствора 19 в каждую лунку.
 - 50 мкл Положительного контроля в лунки A1 и B1.
 - 50 мкл Отрицательного контроля в лунки C1 и D1.
 - 50 мкл воздуха испытываемого образца в оставшиеся лунки.

2. Закрыть микроплашета и инкубировать 48 мин ± 5 мин при температуре 37°C (±3°C).

3. Опустошить лунки. Промыть микроплашета 3 раза Промывочным раствором, внося 300 мкл в каждую лунку. Избегать высывания лунки между этапами промывки.

Страница 3
ВУДС версия 01/17 RU



Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus

Kit de détection antigénique du Virus de la Diarrhée Virale Bovine
(BVDV)/Sérum Plus

Kit para Detecção de Antígeno do Vírus da Diarréia Viral Bovina
(BVDV)/Soro Plus

USO VETERINÁRIO

Kit para la detección de Antígeno del virus de la
Diarrea Vírica Bovina (BVDV)/Suero Plus

Testkit zum Nachweis von Antigen des Bovinen Virus Diarrhoe
Virus (BVDV)/Serum Plus

Die deutsche Fassung der Gebrauchsinformation ist entsprechend §17c TierSG zugelassen.

Test per la ricerca dell'antigene del virus della diarrea virale bovina
(BVDV)/Siero Plus

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus
95-4395-05

Test With Confidence®

IDEXX



English version

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit / Serum Plus

For veterinary use only

Name and Intended Use

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus is IDEXX's enzyme immunoassay for the detection of BVDV antigens in bovine serum, plasma, whole blood and ear notch tissue samples.

General Information

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Border Disease Virus (BDV) and Hog Cholera Virus (Classical Swine Fever Virus, CSFV) are the three member viruses of the genus Pestivirus within the family Flaviviridae. BVDV is one of the most important pathogenic viruses in cattle, causing considerable losses in the dairy and beef industries worldwide. The typical symptoms of the BVDV infection are diarrhoea, fever, followed by reduction in the milk production. The immune suppressive effect of BVDV may potentiate infection by other micro-organisms. The virus crosses the placenta in infected, pregnant cows causing reproductive losses due to abortions, stillborn calves or calves that die early in life. Some calves that survive are immunotolerant to the virus and these animals excrete large amounts of infectious virus for their entire lives. It is important to identify these persistently infected animals to break the cycle of infections in herds. The persistently infected animals often die of "mucosal disease" in the first two years of life. As a consequence of the in-utero infection, BVDV is a frequent contaminant of biological products, such as vaccines and pharmaceuticals. BDV causes similar disease syndromes in sheep, while CSFV cause serious losses in the pig industry since it is highly pathogenic and can cause widespread deaths. This kit is for in-vitro diagnostic use only.

Descriptions and Principles

IDEXX BVDV Ag/Serum Plus is an enzyme immunoassay designed to detect BVDV antigens (Ag) in serum, plasma, whole blood and ear notch tissue in cattle. A microtitration format has been configured by immobilizing specific monoclonal antibodies for BVDV (Erms) on the plates. BVDV Ag of the sample is captured on the plates. After incubation of the test sample in the well, captured BVDV Ag is detected by specific antibodies and a horseradish-peroxidase conjugate. Next, unbound conjugate is washed away and a substrate/chromogen solution is added. In the presence of enzyme, substrate is converted into a product which reacts with the chromogen to generate a blue color. Upon addition of the stop solution, a yellow color is generated. The absorbance at a single wavelength of 450 nm [A(450)] or a dual wavelength of 450 nm and 650 nm [A(450/650)] is measured using a spectrophotometer. The corrected OD value of the samples is calculated by using the absorbance [A(450)] or [A(450/650)] obtained with the test sample and corrected for the absorbance of the negative control.

Reagents

Store all reagents at 2-8°C.

Reagents

| | | Volume | | |
|---|---------------------------------------|--------|-----------|------------|
| 1 | Anti-E _m mAb Coated Plates | 2 | 5 | 30 |
| 2 | Positive Control | 1.6 mL | 2 mL | 8.5 mL |
| 3 | Negative Control | 1.6 mL | 2 mL | 8.5 mL |
| 4 | Conjugate | 25 mL | 60 mL | 350 mL |
| 5 | Ear Notch Tissue Soaking Buffer | 60 mL | 2 x 80 mL | 2 x 480 mL |
| A | TMB Substrate N.12 | 20 mL | 60 mL | 400 mL |
| B | Stop Solution N.3 | 20 mL | 60 mL | 400 mL |
| C | Wash Concentrate (10X) | 125 mL | 480 mL | 3 x 480 mL |
| D | Detection solution | 15 mL | 30 mL | 180 mL |
| | Other Components: Zip lock bag | 1 | 1 | |

NOTE: see table on page 47 for the description of international symbols used on the kit labels.

Materials Required but Not Provided

- Centrifuge (capacity 2000 x g)
- Precision Micropipettes and Multi-dispensing micropipettes (reagents volumes listed in the "Test Protocol" require pipette precision less than or equal to 5%).
- Disposable pipette tips
- Microplate shaker
- Distilled water or deionized water
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Microplate covers (Ic, aluminium foil or adhesive)
- 96-well Microplate reader equipped with a single wavelength filter of 450 nm or a dual wavelength of 450 nm and 650 nm
- Humid Chamber/ incubator capable of maintaining a temperature of +37°C (±3°C)
- Tubes for soaking of ear notch tissue samples

Precautions and Warnings for Users

- Do not pipette by mouth.
- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
- Controls, TMB-Substrate and Wash concentrate solutions can cause eye irritation.
- Stop Solution can cause severe skin burns and eye damage.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional and national regulations.

2 - IDEXX BVDV Ag-Serum Plus

IDEXX BVDV Ag-Serum Plus - 3

Preparation of Reagents

Wash Solution

The Wash Concentrate (10X) should be brought to 18-26°C and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. The Wash Concentrate (10X) must be diluted 1 to 10 with distilled/deionized water before use (e.g., 30 ml of Wash Concentrate (10X) plus 270 ml of water per plate to be assayed). When prepared under sterile conditions, the Wash Solution can be stored for one week at 2-8°C.

Preparation of Samples

Fresh or frozen serum, plasma, whole blood or ear notch tissue samples can be tested.

Ear Notch Tissue Samples

- Use ear notch tissue plugs (samples) of 2-3 mm diameter in size (e.g., sampled by applying ear tags with attached ear notch tissue sampling device).
- If applicable, ear notch samples can remain in the sampling device for incubation.

Note: Fresh, humid, desiccated or frozen ear notch tissue samples can be tested.

- Add 150-250 µl of IDEXX Ear Notch Soaking Buffer to the ear notch tissue. Make sure the tissue sample is completely covered with the solution (gently tap or mix).
- Seal the tube and allow the samples to soak in soaking buffer between 12 and 24 hours at 18-26°C or over weekend up to 72 hours at 18-26°C (or at 2-8°C) in a humid chamber.
- Aspirate 50 µl of the soaking buffer for testing.

Note: Remaining soaking buffer can be separated from the ear notch tissue sample and stored frozen (-20°C) for later testing or for retesting.

Додаток 8

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use.

Reagents should be mixed by gentle swirling or vortexing. Use a separate pipette tip for each sample. Obtain coated plates and record the sample position on a worksheet.

- Add 50 µl of the Deflection antibodies to each well. A multichannel pipette (8 or 12 Channel) can be used for this step.
- Add 50 µl Negative Control into the appropriate wells.
- Add 50 µl Positive Control into the appropriate wells.
- Add 50 µl samples into the remaining wells. Use a separate pipette tip for each sample.
- Mix the content of the microwells by gently tapping the plate or use a shaker for microtiter plates.
- Incubate for 2 hours (± 5 min.) at 37°C (± 3°C) or overnight (12–18 hours) at 2–8°C (in a refrigerator). With either option, the plates should be tightly sealed or incubated in a humid chamber using plate covers to avoid any evaporation.
- Aspirate the liquid contents of all the wells into an appropriate waste reservoir.
- Wash each well with approximately 300 µl of Wash Solution five times. Aspirate the liquid contents of all the wells after each wash. Following the final aspiration, firmly tap residual wash fluid from each plate onto absorbent material. Avoid plate drying between washes and prior to the addition of the next reagent.
- Important!** Control carefully that no traces of blood are left on the walls or edges of the wells. Additional 2–3 washes can be necessary to remove the blood before proceeding to the next step.
- Dispense 100 µl of Conjugate into each well.
- Incubate for 30 minutes (± 2 min.) at 18–26°C.
- Repeat steps 8 and 9.
- Dispense 100 µl of TMB Substrate N.12 solution into each well.
- Incubate for 10 minutes (± 1 min.) at 18–26°C in darkness. Begin timing after the first well is filled.
- Dispense 100 µl of Stop Solution N.3 into each well to stop the reaction. Add the Stop solution in the same order as the substrate solution was added in step 13.
- Blank the spectrophotometer on air.
- Measure and record the absorbance of the samples and controls at 450 nm or using a dual wavelength of 450 nm and 650 nm.
- Calculate the results.

4 – IDEXX BVDV Ag/Serum Plus

Results

For the assay to be valid, the difference (P-N) between the Positive Control mean (PCX) and the Negative Control mean (NCX) must be greater than or equal to 0.150 optical density (OD). In addition, the Negative Control mean (NCX) must be less than or equal to 0.250 OD.

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert. The presence or absence of BVDV antigen in the sample is determined by the corrected OD value (S-N) for each sample.

See the Calculations section for examples.

Note: IDEXX has instrument and software systems available that calculate means and S - N and provide data summaries.

Calculation

Calculation of Negative Control mean (NCX)

$$NCX = \frac{NC1_{A450} + NC2_{A450}}{2}$$

Example:
 $\frac{0.056 + 0.050}{2} = 0.058$

Calculation of Positive Control mean (PCX)

$$PCX = \frac{PC1_{A450} + PC2_{A450}}{2}$$

Example:
 $\frac{1.100 + 1.090}{2} = 1.095$

Calculation for test samples

$$S - N = \text{Sample } A_{450} - NCX$$

Example Sample $A_{450} = 1.558$
 $S - N = 1.558 - 0.058 = 1.500$

Interpretation of Results

Serum, Plasma and Whole Blood Samples

- Samples with S-N values equal or less than 0.300 are classified as **negative** for BVDV Ag.
 - Samples with S-N values greater than 0.300 are classified as **positive** for BVDV Ag.
- Positive** results from this assay are valid for calves of any age. Circulating high titers of maternal BVDV antibodies might interfere with the detection of BVDV antigen in serum, plasma and whole blood. Detection of BVDV antigen in serum, plasma and whole blood samples can be less sensitive after antibody intake via colostrum. "False-negative" results can occur after colostrum intake ("diagnostic gap"). In order to exclude influence of colostrum antibodies, it is recommended to test calves before colostrum intake. Negative results of calves after colostrum intake should be confirmed by re-testing at age of more than 30 days. Refer to regulation in your country if different from this description.

Ear Notch Tissue Samples

- Samples with S-N values equal or less than 0.200 are classified as **negative** for BVDV Ag.
 - Samples with S-N values greater than 0.200 but equal or less than 0.300 are considered **suspect** and should be retested.
 - Samples with S-N values greater than 0.300 are classified as **positive** for BVDV Ag.
- Suspect** samples should be retested by using another 50 µl of the same soaking buffer. If there is less than 50 µl remaining, retesting can be done by soaking a second time the ear notch tissue sample with 250 µl of new soaking buffer between 12 and 24 hours at 18–26°C in a humid chamber. If the sample tests as suspect again, a blood sample should be taken and tested by IDEXX BVDV Ag/Serum ELISA Plus, virus isolation or PCR for BVDV. If there is any doubt about the status of a valuable, positive live animal, retest another sample collected 7–14 days after the initial sample was collected to confirm persistent infection. We recommend that positive results obtained with whole blood should be confirmed using serum or plasma from the same animal.
- When testing ear notch samples, there is no diagnostic gap.

☞ = Modification in the using instructions

Summarized Test Procedure

IDEXX strongly recommends that you read the complete instructions carefully before using the test the first time.

| Steps | Action | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-------------------------|----------|---------|----------|----------------------------|---------|---------------------|---------|--|----------|----------|----------|
| 1. Ear Notch Tissue Samples | Use ear notch tissue plugs (samples) of 2–3 mm diameter in size (e.g., sampled by applying ear tags with attached ear notch tissue sampling device). If applicable, ear notch samples can remain in the sampling device for incubation. Add 150–250 µl Ear Notch Soaking Buffer to the ear notch tissue. Make sure the tissue sample is completely covered with the solution (gently tap or mix). Seal the tube and allow the samples to soak in soaking buffer between 12 and 24 hours at 18–26°C or over weekend up to 72 hours at 18–26°C (or at 2–8°C) in a humid chamber. | | | | | | | | | | | | |
| 2. Add detection antibodies | Aspirating 50 µl of the soaking buffer for testing. Obtain coated plate(s) and record the sample position on a worksheet. Add 50 µl of the Detection antibodies to each well. A multichannel pipette (8 or 12 channel) can be used for this step. | | | | | | | | | | | | |
| 3. Sample Distribution (Serum, Plasma, Whole Blood or Ear Notch Tissue Sample) | Add 50 µl Negative Control into the appropriate wells. Add 50 µl Positive Control into the appropriate wells. Add 50 µl samples into the remaining wells. Use a separate pipette tip for each sample. Mix the content of the microwells by gently tapping the plate or use a shaker for microtiter plates. | | | | | | | | | | | | |
| 4. Sample Incubation | Incubate for 2 hours (± 5 min.) at 37°C (± 3°C) or overnight (12–18 hours) at 2–8°C (in a refrigerator). With either option, the plates should be lightly sealed or incubated in a humid chamber using plate covers to avoid any evaporation. | | | | | | | | | | | | |
| 5. Washing the plate | Aspirate the liquid contents of all the wells into an appropriate waste reservoir. Wash each well with approximately 300 µl of Wash Solution five times. Aspirate the liquid contents of all the wells after each wash. Following the final aspiration, firmly tap residual wash fluid from each plate onto absorbent material. Avoid plate drying between washes and prior to the addition of the next reagent. | | | | | | | | | | | | |
| 6. Conjugate Distribution | Dispense 100 µl of Conjugate into each well. | | | | | | | | | | | | |
| 7. Conjugate Incubation | Incubate for 30 minutes (± 2 min.) at 18–26°C. | | | | | | | | | | | | |
| 8. Repeat step 5 | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Substrate distribution | Dispense 100 µl TMS Substrate N.12 in each well. | | | | | | | | | | | | |
| 10. Substrate incubation | Incubate for 10 minutes (± 1 min.) at 18–26°C in darkness. Begin timing after the first well is filled. | | | | | | | | | | | | |
| 11. Stopping the reaction | Dispense 100 µl of Stop Solution N.3 into each well to stop the reaction. Add the stop solution in the same order as the substrate solution was added in step 8. | | | | | | | | | | | | |
| 12. Measure the plate | Blank the spectrophotometer on air. Measure and record the absorbance of the samples and controls at 450 nm or stop solution in the same order as the substrate solution was added in step 8, using a dual wavelength of 450 nm and 650 nm. Calculate the results. | | | | | | | | | | | | |
| 13. Interpretation | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Ear Notch Tissue Sample</th> <th>Negative</th> <th>Suspect</th> <th>Positive</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Serum, Plasma, Whole Blood</td> <td>≤ 0.200</td> <td>> 0.200 and ≤ 0.300</td> <td>> 0.300</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Negative</td> <td>Negative</td> <td>Positive</td> </tr> </tbody> </table> | Ear Notch Tissue Sample | Negative | Suspect | Positive | Serum, Plasma, Whole Blood | ≤ 0.200 | > 0.200 and ≤ 0.300 | > 0.300 | | Negative | Negative | Positive |
| Ear Notch Tissue Sample | Negative | Suspect | Positive | | | | | | | | | | |
| Serum, Plasma, Whole Blood | ≤ 0.200 | > 0.200 and ≤ 0.300 | > 0.300 | | | | | | | | | | |
| | Negative | Negative | Positive | | | | | | | | | | |

For technical assistance

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit www.idexx.com/production/contact
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43389

3007 Liebfelds-Bern, Switzerland

*IDEXX and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antibody Test Kit

Kit de détection des anticorps dirigés contre le Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV)

Kit para detecção de Anticorpos contra o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)

Kit para la detección de Anticuerpos frente al Virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVDV)

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Bovinen Virus Diarrhoe (BVDV)

Die deutsche Gebrauchsinformation ist gemäß §11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Manufacturer
IDEXX Switzerland GmbH
Stadionstrasse 12
CH-3097 Liebefeld-Bern
Switzerland

EU-Representative
IDEXX Europe B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com

IDEXX

IDEXX BVDV Total Ab



06-44000-09

Test With Confidence™

IDEXX

| Reagents | Volume |
|---------------------------------------|------------|
| 1 BVDV Antigen Coated Plate | 5 |
| 2 Positive Control | 1 x 1.0 mL |
| 3 Negative Control | 1 x 1.0 mL |
| 4 Conjugate | 1 x 60 mL |
| 5 Sample Diluent | 1 x 60 mL |
| A TMB Substrate N.12 | 1 x 60 mL |
| B Stop Solution N.3 | 1 x 60 mL |
| C Wash Concentrate (10X) | 1 x 480 mL |
| Other Components: Zip lock bag | 1 |

Note: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels of this kit.

Storage

Store the reagents at 2–8°C. Reagents are stable until expiration date, provided they have been stored properly.

Materials Required but Not Provided

- Precision micropipettes or multi-dispensing micropipettes
- Disposable pipette tips
- Graduated cylinder for wash solution
- 96-well microplate reader (equipped with 450 nm filter or 450 and 650 nm filters)
- Microplate washer (manual, semi-automatic or automatic system)
- Use only distilled or deionized water for preparation of the reagents used in the test
- Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive)
- Centrifuge (capacity 2000 x g)
- Vortex or equivalent
- Microplate shaker

Precautions and Warnings

- Handle all biological material as potentially infectious.
- Wear protective gloves / protective clothing / eye or face protection when handling samples and reagents.
- Refer to the product Material Safety Data Sheet for additional information.
- See the end of this insert for reagent hazard and precaution warnings.

Laboratory Practices

- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting, timing, and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy. Use a separate pipette tip for each sample and control.
- Do not expose TMB solution to strong light or any oxidizing agents. Handle TMB solution with clean glass or plastic ware.
- All wastes should be properly decontaminated prior to disposal. Dispose of contents in accordance with local, regional, and national regulations.
- Care should be taken to prevent contamination of kit components. Do not pour unused reagents back into containers.
- Do not use kit past expiration date.

Preparation of Wash Solution

The Wash Concentrate (10X) should be brought to 18–26°C and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts. The wash concentrate must be diluted 1 to 10 with distilled/deionized water before use (e.g., 30 mL of concentrate plus 270 mL of water per plate to be assayed). When prepared under sterile conditions, the Wash Solution can be stored for one week at 2–8°C.

Preparation of Samples

Fresh or frozen serum, plasma or milk can be tested. Whole-milk samples may be used after centrifugation for 15 minutes at 2000 x g or left to stay overnight if refrigerated (2–8°C). No pre-treatment is needed for defatted milk.

Test Procedure

All reagents must be allowed to come to 18–26°C before use. Reagents should be mixed by gentle inverting or swirling.

Serum or Plasma Samples

- 1 Obtain coated plate(s) and record the sample position. If using partial plates, remove only those wells sufficient for samples to be tested. Place the remaining wells, along with the desiccant, in the extra zip lock bag provided and return to 2–8°C.
- 2 Add 100 µL of the Sample Diluent to each well.
- 3 Add 25 µL Negative Control (NC) into duplicate wells.
- 4 Add 25 µL Positive Control (PC) into duplicate wells.
- 5 Add 25 µL samples into remaining wells. Continue at Step 6.

Milk Samples

- 1 Obtain coated plate(s) and record the sample position. If using partial plates, remove only those wells sufficient for samples to be tested. Place the remaining wells, along with the desiccant, in the extra zip lock bag provided and return to 2–8°C.
- 2 Add 100 µL of the Sample Diluent only into the wells for Negative Control and for Positive Control.
- 3 Add 25 µL Negative Control (NC) into duplicate wells.
- 4 Add 25 µL Positive Control (PC) into duplicate wells.
- 5 Dispense 100 µL UNDILUTED milk samples (from underneath the fat layer) into remaining wells of the plate. Continue at Step 6.

Common procedure for serum, plasma, and milk samples

- 5 Mix the content of the microwells by gently tapping the plate or use a microplate shaker.
- 7 Incubate for 90 minutes (± 5 min.) at 18–26°C or overnight (12–18 hours) at 2–8°C. The overnight protocol is recommended for bulk milk samples. With either option, plates should be hermetically sealed or covered and incubated in a humid chamber.
- 3 Remove the solution and wash each well with approximately 300 µL of Wash Solution 5 times. Avoid plate drying between plate washings and prior to the addition of the next reagent. Tap each plate onto absorbent material after the final wash to remove any residual wash fluid.
- 3 Dispense 100 µL of Conjugate into each well.

- 10 Incubate for 30 minutes (± 2 min.) at 18–26°C.

- 11 Repeat step 8.

- 12 Dispense 100 µL of TMB Substrate N.12 solution into each well.

- 13 Incubate 10 minutes (± 1 min.) at 18–26°C.

- 14 Dispense 100 µL of Stop Solution N.3 into each well.

- 15 Measure and record the absorbance of the samples and controls at 450 nm or using a dual wavelength of 450 nm and 650 nm.

- 16 Calculation:

Controls

$$NC\bar{X} = \frac{NC1 A(450) + NC2 A(450)}{2} \quad PCR = \frac{PC1 A(450) + PC2 A(450)}{2}$$

Validity criteria

$$NC\bar{X} \leq 0.250$$

$$PCR - NC\bar{X} \geq 0.150$$

For invalid assays, technique may be suspect and the assay should be repeated following a thorough review of the package insert.

Samples

$$S/P = \frac{\text{Sample } A(450) - NC\bar{X}}{PCR - NC\bar{X}}$$

The presence or absence of BVDV antibodies in the sample is determined by S/P ratio for each sample.

- 17 Interpretation:

Serum, Plasma or Individual Milk samples

| | | |
|------------|-------------------|------------|
| Negative | Suspect | Positive |
| S/P < 0.20 | 0.20 ≤ S/P < 0.30 | S/P ≥ 0.30 |

Bulk Milk samples

| | |
|------------|------------|
| Negative | Positive |
| S/P < 0.20 | S/P ≥ 0.20 |

Note: IDEXX has instrument and software systems available that calculate results and provide data summaries.

