

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ МЕТОД ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ВАКЦИНАЦІЇ БРОЙЛЕРІВ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ

І. К. Авдосьєва, В. В. Регенчук, О. Б. Басараб, І. Л. Мельничук

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

У статті наведені результати серологічного контролю ефективності вакцинації бройлерів проти інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) при застосуванні імуноферментного методу (ІФА). Протестовано 104 партії бройлерів після застосування живих вакцин, що містили різні штами проти ІБХ (Вінтерфілд 2512, G-61, 228E, V877, V217, GM-97, Лукерт) Про якісно проведenu вакцинацію свідчили показники: високий і однорідний середній титр, наявність 80–100 % позитивних титрів, висока ступінь однорідності КВ 20–45 % та середній індекс вакцинації (ІВ) 50–600. Про недоброякісно проведenu вакцинацію чи наявність польового вірусу ІБК свідчили показники: наявність титрів, значення яких були нижче очікуваних із високим ступенем неоднорідності, збільшення відсотка негативних зразків сироваток, що часто асоціювалися із значеннями КВ <9–15 % чи КВ >67–78 % та ІВ <50–200 чи ІВ >300–600.

Серологічний моніторинг є одним із важливих інструментів розробки та підтримки ефективних програм вакцинацій птиці проти вірусних захворювань, в тому числі проти інфекційної бурсальної хвороби.

Інфекційна бурсальна хвороба (ІБХ) — гостре, висококонтагіозне вірусне захворювання, уражає курчат 2-15-тижневого віку і характеризується руйнуванням В-лімфоцитів бурси, селезінки, тимусу, лімфоїдної тканини кишечника, гардерової залози, викликає стан імуносупресії.

Вірус стійкий у навколишньому середовищі і зберігає свою активність у приміщенні понад 3 місяці; у кормах, воді і посліді — до 2 місяців, за t 25 °С — 21 день, за t 37 °С — 10 днів, за t мінус 20 °С — 3 роки, стабільний за рН 2,0. Втрачає свою активність за t 56 °С через 5 год, за t 70 °С — через 30 хв.

Джерелом інфекції є хвора та перехворіла птиця, вірус виділяється з послідом протягом 2 тижнів з моменту захворювання. Факторами передачі є продукти забою хворої птиці, інфіковані корми, вода підстилка, повітря, інвентар, одяг і взуття обслуговуючого персоналу, транспортні засоби.

Шляхи передачі — аерогенний, оральний, через слизову очей і носа, а також трансваріальний (контамінація яєчної шкаралупи). *Allphitobius desperinus* (мучний хрущак), від якого вірус можна виділити через 8 тижнів після інфікування. Носії патогенного вірусу — качки, індики, гуси, цесарки. Інкубаційний період до 72 годин.

Форми перебігу хвороби ІБХ — субклінічна та клінічна.

За субклінічної форми ІБХ спостерігається діарея, послід водянистий білого кольору, пір'я скуйовджене, масова поява секундарних інфекцій, гіпотрофія бурси, зниження приростів на 100–200 г, призводить до імуносупресії, знижується імунітет проти хвороби Марека (ХМ) та ньюкаслської хвороби (НХ), підвищується відсоток захворювання птиці ХМ та кокцидіозом, дерматити, некротичний ентерит, виникає “синдром малоадсорбції” у кишечника, анемія, виснаження, затримку росту, погане засвоєння корму, чутливість до інших захворювань, зниження приростів, збільшення затрат кормів.

За клінічної гострої форми загибель курчат настає через 1–3 дні після появи перших ознак хвороби. Максимальна кількість тих, що загинули швидко збільшується на 3–4 добу, а через 8–9 днів загибель припиняється, тривалість хвороби становить 5–7 діб, а при ускладненні іншими інфекціями (колібактеріозом, сальмонельозом, стрептококозом) та кокцидіозом ІБХ продовжується до 15–20 діб. У подальшому ІБХ переходить у скриту форму у курчат до 2-тижневого віку і у дорослої птиці перебіг хвороби часто безсимптомний. Смертність коливається від 5 до 15 %, а інколи до 60 %, в залежності від вірулентності вірусу.

Клінічна та субклінічна форми ІБХ призводять до зниження продуктивності, підвищення загибелі птиці.

Патологоанатомічні зміни — бурса збільшена в об'ємі у 2–3 рази, вишневого кольору, у порожнині бурси містяться згустки крові чи накопичення фібрину. Крововиливи в різних групах м'язів — грудних, стегнах та крилах, крововиливи у залозистому шлунку та на границі із м'язовим шлунком, нирки збільшені, сечовивідні канали переповнені сечокислими солями, катарально-геморагічне запалення шлунково-кишкового тракту.

Методи лабораторної діагностики: патолого-морфологічний, біологічний, серологічний, молекулярно-генетичний. Диференціальна діагностика: кокцидіоз, інфекційний бронхіт, аденовірус, НХ, гіповітаміноз Е, мікотоксикози [2, 3].

Для ефективного вибору вакцин необхідно проводити визначення генетичної структури і молекулярної групи польового вірусу у ПЛР та використовувати вакцини, які мають геном однорідний до польового вірусу [1, 3].

Класифікація живих вакцин: середня, середня плюс, середня ++, “гаряча”.

Добре відома роль гуморального імунітету у захисті від захворювання на ІБХ. Доведено, що наявність високих титрів гуморальних антитіл добре корелює з високою захищеністю від розповсюдження вірусу в організмі птиці..

Одними із напрямків у боротьбі з ІБХ є своєчасна діагностика захворювання, систематична вакцинопрофілактика живими та інактивованими вакцинами, застосування вакцин з першого дня (в інкубаторії).

Профілактика ІБХ родинного та товарного стад здійснюється шляхом вакцинації живими вакцинами, що застосовують у період вирощування (2–3 рази) та родинного стада одноразово інактивованою вакциною, що застосовують як мінімум за 3 тижні до яйцекладки; бройлерів вакцинують живими вакцинами.

Незважаючи на виконання програми вакцинації, ІБХ наносить значні економічні збитки птахівничим господарствам у різних країнах світу.

Застосування живих вакцин проти ІБХ не завжди викликають захист птиці від ІБХ, так як з'являються нові серотипи у процесі рекомбінації чи спонтанної мутації вірусу.

Тому важливим є прогнозування першої вакцинації проти ІБК, а систематичне проведення серологічного моніторингу як засобу не тільки контролю ефективності застосування вакцин проти ІБХ, але як одного із лабораторних методів для здійснювання ранньої діагностики захворювання [1].

Завдяки моніторингу та ранньому виявленню захворювання, можна знизити виробничі витрати за допомогою підвищення ефективності програм вакцинації та звести до мінімуму збитки від хвороби. Проте сам факт використання вакцин не є гарантом захисту поголів'я від вірусних захворювань. Позитивний ефект від вакцинопрофілактики птиці буде досягнутий тільки при постійному проведенні серологічного контролю.

Існує декілька методів серологічного контролю: РНГА (реакція непрямой гемаглютинації), РДП (реакція дифузної преципітації), РН (реакція нейтралізації), імуноферментний аналіз (ІФА). Незважаючи на те, що традиційні імунобіологічні методи як і раніше широко використовуються у ветеринарній практиці, метод ІФА займає провідне місце при проведенні серологічних досліджень. Використання даних серології, отриманих за

допомогою ІФА, дозволяє прогнозувати входження з вакциною, контролювати імунну відповідь після вакцинації проти ІБХ, а також є одним із тестів при постановці діагнозу.

Метод ІФА характеризується високою чутливістю, швидкістю отримання результатів, масовістю досліджень. Завдяки простоті, специфічності і високій чутливості метод ІФА дуже зручний для скринінгу великої кількості зразків.

Це експрес-тест для виявлення материнських, а згодом і поствакцинальних антитіл. Перевагою ІФА є її безпека (так-як використовується інактивованій вірус), зручність у роботі (автоматизація проміжних стадій реакції — застосування вошера для промивання плашки) і відсутність необхідності роботи з культурою клітин, а також застосування вимірювального обладнання, зокрема спектрофотометра для зчитування значень оптичної щільності в мікроплашках за лічені секунди, що дозволяє значно збільшити кількість аналізів, які проводяться і спростити методичну процедуру виконання ІФА. Одночасно створено і впроваджено у ветеринарну практику спеціалізованих комп'ютерних програм не тільки для перекладу оптичної щільності в числове значення точного титру, але для автоматичної обробки, зберігання та створення баз даних.

Найбільшими фірмами-виробниками імуноферментних тест-наборів для виявлення антитіл проти інфекційного бронхіту є: IDEXX (США), Synbiotics (Великобританія), Biocheck (Нідерланди).

Для проведення специфічної профілактики бройлерів проти ІБХ застосовують живі вакцини, що містять різні штами вірусу ІБХ, а саме: D78, Лукерт, S706, LC 75, Вірго 7, Вінтерфілд 2512 G-61, GM-97, MB/20, 228E, V877, V217, MB/5, БГ-93, MB, MB/3.

Метою нашої роботи було проведення серологічного моніторингу сироваток крові від бройлерів як засобу прогнозування вакцинації та контролю ефективності вакцин проти ІБХ.

Матеріали і методи. Аналіз зареєстрованих вакцин в Україні проти ІБХ, характеристика методів серологічного контролю ІБК, тест-системи фірми “Bio Check” для визначення специфічних антитіл проти ІБХ, сироватки крові від м'ясних кросів Кобб-500 і Росс-308, що були імунізовані вакцинами, виготовленими із різних штамів проти ІБХ (Вінтерфілд 2512 G-61, 228E, V877, V217, GM-97, Лукерт).

Серологічний контроль ефективності вакцинопрофілактики проти ІБК бройлерів проводили в ІФА за допомогою тест системи “Bio Check” згідно з інструкцією.

Результати й обговорення. Коротка характеристика методів серологічного контролю наведена у таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика методів серологічного контролю ІБК

| Характеристика методів | ІФА | РН | РНГА | РДП |
|---|-----------|------------|------------|----------|
| Час проведення | 2 години | 2-10 днів | 2-3 години | 1-2 дні |
| Кількість сироватки | 0,005 мл. | 0,2-1 мл. | 0,025 мл. | 0,03 мл. |
| Одночасне проведення великої кількості зразків | так | важко | так | так |
| Комп'ютеризація і використання програмного забезпечення | так | ні | ні | ні |
| Неспецифічна реакція | - | - | + | + |
| Методика постановки реакції | проста | комплексна | проста | проста |
| Продуктивність праці | висока | низька | середня | низька |

Всього зареєстровано 22 живі вакцини проти ІБХ, які застосовуються в залежності від епізоотичної ситуації та рівня материнських антитіл (МАТ) (табл. 2).

Перелік живих вакцин проти інфекційної бурсальної хвороби, зареєстрованих в Україні

| Назва вакцин | Країни | Штами | Біологічна активність | Пробивний титр |
|--|---------------------------------|----------------------|---|----------------|
| Севак Трансмун ІБХ | Угорщина | Вінтерфілд 2512 G-6 | min 65 PD ₉₀ | |
| Нобіліс Д78 | Нідерланди | D78 | $\geq 10^{4,0}$ ТСІД ₅₀ | 1 : 125-250 |
| Пулвак Бурсін 2 | Нідерланди | Лукегт | $\geq 10^{3,1}$ ТСІД ₅₀ | 1 : 125-250 |
| Галлівак ІБХ | Франція | S706 | $\geq 10^{4,0}$ ТСІД ₅₀ | 1 : 250 |
| АвіПро Пресайз | Німеччина | LC 75 | $\geq 10^{3,0}$ ЦПД ₅₀ | 1 : 300 |
| ВІР 114 | Ізраїль | Віпро 7 | $\geq 10^{2,5}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| Пулвак Бурсін Плюс | Нідерланди | Лукегт | $\geq 10^{2,4}$ ТСІД ₅₀ | 1 : 350-500 |
| Севак ІБХ Л | Угорщина | Вінтерфілд 2512 G-61 | min 10 ^{2,0} ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| Хіпра Гамборо GM-97 | Іспанія | GM-97 | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| Полімун ІБХ Лайт | Україна | МВ/20 | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| ІВА-VAC ST (Фатро) | Італія | Вінтерфілд 2512 | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| Нобіліс Гамборо 228Е | Нідерланди | 228Е | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 500 |
| Пулвак Бурса Ф (Пулвак Бурса Плюс) | Бразилія, Нідерланди, США | V877 | $\geq 10^{3,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 600 |
| АвіПро ІБХ Екстрім | Німеччина | V217 | $\geq 10^{1,5}$ ЦПД ₅₀ | 1 : 630 |
| Полімун ІБХ | Україна | МВ/5 | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 800 |
| БГ-93 | Україна | БГ-93 | $\geq 10^{3,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 800 |
| Табік М.В. | Ізраїль | МВ | $\geq 10^{2,5}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 800 |
| Полімун ІБХ + | Україна | МВ/3 | $\geq 10^{2,0}$ ЕІД ₅₀ | 1 : 1000 |
| Вакцина жива проти ІБХ тип Інтермедіа плюс | Індія | | | 1 : 500 |
| Вірус-вакцина культуральна проти ІБХ | Україна | Вінтерфілд 2512 | ≥ 4 Іг ТЦД ₅₀ - ЕІД ₅₀ | 1:500 |
| Вірус-вакцина-2 проти ІБХ | Україна | УМ-93 | $\geq 10^{5,0}$ ЕІД ₅₀ | 1:500 |
| Ізовак ГАМБОРО 2 | Італія | Вінтерфілд 2512 | | 1 : 300-500 |

У цілому було протестовано більше 104 партії бройлерів після застосування вакцин, що містили різні штами проти ІБХ.

Результати серологічного моніторингу сироваток крові бройлерів у 34–52-добовому віці, вакцинованих проти ІБК наведені в таблиці 3, а індекс вакцинації — у таблиці 4.

Таблиця 3

Дані серологічного моніторингу сироваток крові бройлерів 34-52-добового віку, вакцинованих проти ІБХ

| Назва вакцин | к-ть партій | Діапазон значення титру | | | Діапазон значення % CV | | | Діапазон значення ІВ | |
|------------------------------------|-------------|-------------------------|------------|-------|------------------------|----------|---------------|----------------------|----------|
| | | норма | фактично | | норма | фактично | | Норма | фактично |
| | | | титри | СТ | | % CV | Середній % CV | | |
| АвіПро ІБХ Екстрім | 33 | 6000-12000 | 5395-13696 | 9545 | 20-45 | 10-42 | 26 | 200-600 | 137-816 |
| Нобіліс Гамборо 228Е | 5 | 6000-10000 | 8655-12801 | 10728 | 20-45 | 19-67 | 43 | 200-600 | 180-674 |
| Севак ІБХ Л | 26 | 6000-12000 | 4640-11598 | 8119 | 20-45 | 9-43 | 26 | 200-550 | 82-380 |
| Пулвак Бурса Ф (Пулвак Бурса Плюс) | 14 | 6000-10000 | 4462-10727 | 7594 | 20-45 | 14-42 | 28 | 200-550 | 121-715 |
| Хіпра Гамборо GM-97 | 10 | 2500-10000 | 5570-14764 | 10167 | 20-45 | 14-49 | 31 | 200-550 | 144-712 |
| Пулвак Бурсін Плюс | 16 | 2500-10000 | 4131-13949 | 9040 | 20-45 | 15-78 | 46 | 50-300 | 49-717 |

Дані індексу вакцинації (ІВ) бройлерів 34-52 добового віку, вакцинованих проти ІБХ

| Назва вакцин | К-ть стад | Показники ІВ, (< чи > норми) | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|------|--------|-----------|------|--------|-----------|------|
| | | норма | к-ть стад | % | ІВ (<) | к-ть стад | % | ІВ (>) | к-ть стад | % |
| АвіПро ІБХ Екстрім | 33 | 200-600 | 25 | 75,8 | <200 | 5 | 15,1 | >600 | 3 | 9 |
| Нобіліс Гамборо 228Е | 5 | | 3 | 60 | | 1 | 20 | | 1 | 20 |
| Севак ІБХ Л | 26 | 200-550 | 16 | 61,5 | <200 | 8 | 30,8 | >550 | 2 | 7,7 |
| Пулвак Бурса Ф (Пулвак Бурса Плюс) | 14 | | 6 | 42,8 | | 4 | 28,6 | | 4 | 28,6 |
| Хіпра Гамборо GM-97 | 10 | | 7 | 70,0 | | 1 | 10,0 | | 2 | 20,0 |
| Пулвак Бурсіне + | 16 | 50-300 | 9 | 56,3 | <50 | - | - | >300 | 7 | 43,7 |

При проведенні отриманих результатів успіх вакцинації визначали за трьома основними критеріями імунної відповіді: величиною середнього титру, відсотком коефіцієнту варіації (КВ), а також індексу вакцинації (ІВ) — нового параметру оцінки результатів вакцинації при використанні ІФА.

Про якісно проведену вакцинацію свідчили показники: високий і однорідний середній титр, значення якого знаходилось в очікуваних межах, що визначали за типом вакцини і методом її застосування, наявність 80-100 % протективних титрів та висока ступінь однорідності з КВ 20-45 %. Новий параметр ІВ від 50-600 становив при застосуванні живих вакцин, що містили штам V217 — 75,8 % (33 партій), тоді як при застосуванні вакцини, що містила штам V877 — 42,8 (6 партій).

Про недоброякісно проведену вакцинацію чи наявність польового вірусу ІБК свідчили показники: наявність титрів, значення яких були нижче очікуваних з високим ступенем неоднорідності, збільшення відсотка негативних зразків сироваток, що часто асоціювалися із зменшенням значення КВ (9-15 %) та збільшенням значення КВ (> 67-78 %). ІВ >300 становив при застосуванні вакцин, що містили штам Лукерт 43,7 % (7 партій), тоді як ІВ >550 при застосуванні вакцини із штаму Вінтерфілд 2512 G-61 — 7,7 % (2 партії).

Оцінка імунної відповіді у ІФА включає порівнювання отриманих значення середніх титрів з очікуваними титрами після вакцинації. Якщо титри антитіл підвищені після імунізації чи відповідають базовій нормі, то це свідчить про якісну проведену вакцинацію. Якщо титри в частині поголів'я в стаді високі, у той час як у другій частині нульові, то тестування показує, що стадо, можливо, інфіковане або це свідчить про недоброякісну проведену вакцинацію.

ІВ знаходиться в певних межах, залежно від типу і кратності застосовуваної вакцини, а у інфікованих стадах значно перевершує аналогічне у стадах без клінічних проявів інфекції.

Таким чином, широке застосування ІФА для проведення моніторингу надає допомогу в питанні контролю диференціації нормальної імунної відповіді після застосування вакцин, а у випадку прояву польового зараження птиці ІБК є одним із методів ранньої діагностики захворювання.

В И С Н О В К И

1. Протестовано 104 партії бройлерів після застосування вакцин, що містили різні штами проти ІБХ (Вінтерфілд 2512 G-61, 228Е, V877, V217, GM-97, Лукерт).

2. Про якісно проведену вакцинацію свідчили показники: високий і однорідний середній титр, наявність 80-100 % позитивних титрів, висока ступінь однорідності КВ 20-45 % та середній індекс вакцинації (ІВ) від 50-600.

3. Про недоброякісно проведену вакцинацію чи наявність польового вірусу ІБК свідчили показники: наявність титрів, значення яких були нижче очікуваних з високим ступенем неоднорідності, збільшення % негативних зразків сироваток, що часто асоціювалися із значеннями КВ <9-15 % чи КВ >67-78 % та ІВ <50-200 чи ІВ >300-600 відповідно.

Перспективи подальших досліджень. Планується подальше проведення серологічного моніторингу з метою підвищення ефективності застосування вакцин проти ІБХ в залежності від епізоотичної ситуації.

IMMUNE ENZYME METHOD OF EFFICACY ASSESMENT OF BROILER VACCINATION AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE

I. K. Avdosieva, V. V. Regenchuk, O. B. Basarab, I. L. Melnychuk

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,

S U M M A R Y

The article presents the results of serological efficacy control of broiler vaccination against infectious bursal disease at application of immune fermentative method. More than 104 batches of broilers were tested after application of live vaccines containing various strains against infectious bursal disease (Winterfield 2512 G-61, 228E, V877, V217, GM97). The following indices demonstrated the qualitative vaccination: high and homogeneous average titre, the presence of 80-100% of positive titres, high degree of homogeneity 20-45% and average vaccination index of 50-600. The following indices demonstrated the vaccination of low quality and the presence of field virus of infectious bursal disease: the presence of titres the indices of which were lower than expected with high degree of homogeneity, the increasing of negative samples of serum were very often associated with indices CV < 9-15% or CV > 67-78 % and VI < 50-200 or VI > 300-600.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ БРОЙЛЕРОВ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

И. К. Авдосьева, В. В. Регенчук, О. Б. Басараб, И. Л. Мельничук

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты серологического контроля эффективности вакцинации бройлеров против инфекционной бурсальной болезни (ИБХ) при применении иммуноферментного метода (ИФА). Протестировано более 104 партии бройлеров после применения живых вакцин, содержащих различные штаммы против ИБХ (Винтерфилд 2512 G-61, 228E, V877, V217, GM-97, Лукерт). О качественно проведенной вакцинации свидетельствовали показатели: высокий и однородный средний титр, наличие 80-100% положительных титров, высокая степень однородности КВ 20-45% и средний индекс вакцинации (ИС) от 50-600. О недоброкачественно проведенной вакцинации или наличии полевого вируса ИБК свидетельствовали показатели: наличие титров, значения которых были ниже ожидаемых с высокой степенью неоднородности, увеличение % негативных

образцов сывороток, часто ассоциировались с значениями КВ <9-15 % или КВ >67-78 %, а также ИВ <50-200 или ИВ >300-600.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Пьер-Мари Борн, Сильвен Комт.* Вакцины и вакцинация в птицеводстве. 2002. — *Ceva Sante Animale.* — С. 123–134.
2. *Calnek B.W.* Diseases of Poultry, 1991. — P. 648–663.
3. *Mazurkiewicz M.* Choroby drobiu, Wroclaw, 2005. — S. 653–663, 363–371.