

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 636.09: 578.831.083.3

ГЕМАГЛЮТИНУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ ВАКЦИННОГО ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР ЗБЕРІГАННЯ

Г.І. Гарагуля, доцент, Харківська державна зооветеринарна академія

В.В. Гаркава, ст. викладач, Сумський національний аграрний університет

Стаття присвячена вивченню гемаглютинуючих властивостей вірусу НХ за різних температур зберігання (-18°C, +4°C, +20°C та +37°C). Виявлено залежність гемаглютинуючого титру вірусу від температури: чим вища температура, тим швидше знижується титр вірусу.

Ключові слова: вірус ньюкаслської хвороби, гемаглютинація, температура зберігання.

Актуальність проблеми. Збудник хвороби Ньюкасла – вірус родини *Paramyxoviridae*, який відноситься до серотипу 1 параміксовірусів птахів. Різні штами вірусу відрізняються один від одного біологічними властивостями (вірулентністю, тропізмом, гемаглютинуючими властивостями) [1, 5, 7].

Вірус містить два основних антигени: V-антиген, що відповідає за рівень гемаглютинуючої активності, антигенність та імуногенність, а також S-антиген, який виконує функції нейрамінідази [1, 8]. На гемаглютинуючі властивості вірусу НХ звертали увагу перші дослідники цього захворювання [3, 6, 8]. Вірус Ньюкаслської хвороби (НХ) аглютинуює еритроцити амфібій, рептилій, птахів, людини, мишей та мурчаків за температури +18+22°C. Еритроцити ВРХ, свиней, овець, кіз та коней аглютинуються не всіма штамами вірусу [1, 2, 4, 6, 8]. Приблизно 105 інфекційних одиниць вірусу дорівнює одній гемаглютинуючій одиниці (1ГАО). Деякі штами вірусу втрачають гемаглютинуючу активність при +56°C за 5 хвилин, зберігаючи інфекційні властивості, інші, навпаки, зберігають гемаглютинуючу активність при +56°C впродовж 180-240 хвилин, а інфекційні властивості їх втрачаються через 90 хвилин. Для окремих штамів НХ властива певна температура, за якої вони втрачають гемаглютинуючу активність [1].

Ряд вчених використовували гемаглютинуючі властивості вірусу для виявлення його в матеріалі, отриманому після культивування. Наявність вірусу НХ підтверджували встановленням титру гемаглютинінів в реакції гемаглютинації (РГА) з екстраембріональною рідиною. Титр вірусу коливався від 1:640 до 1:1280. При постановці РГА в ембріональній алантоїсній рідині загіблених ембріонів виявляли гемаглютиніни в тирах 1:32-1:512. При постановці РГА з культуральною рідиною клітин *HeLa* титр досягав 1:512 [5]. В. П. Образцов отримував вірусомісну амніон-алантоїсну рідину від заражених 8-11-добових ембріонів курей. При постановці РГА було отримано високі титри в межах від 1:1280 до 1:320. Амніотична та алантоїсна рідини, отримані від ембріонів загіблених в результаті зараження їх вірусом НХ, майже незмінно зберігали гемаглютинуючу активність в умовах холодильника (+2+4 °C) до 6 місяців [3].

Дані літератури містять відомості про дію різних температур на вірус НХ [1, 3, 8]. Стьйкість

вірусу НХ в значній мірі залежить від середовища в якому він знаходиться. Засушування та холод сприяють кращому збереженню вірусу: в замороженому стані активність вірусу зберігається понад 2 роки, а ліофільно висушений вірус НХ при зберіганні за температури +4°C не втрачає своєї активності протягом 4-5 місяців. За температури від 0°C до +4°C вірус втрачав свою активність за 5 місяців. В замороженому патологічному матеріалі вірус зберігається протягом 6 місяців. За температури зберігання від +14°C до +23°C вірус втрачав свою активність через 2 тижні. За температури +75°C, +65°C, +55°C вірус НХ інактивується протягом 30 хвилин [1, 6, 8].

Вірус термолабільний: гине при нагріванні до температури +60+75°C за 30 хвилин, у тушках курей при витримуванні їх у гарячій воді, температура якої сягає +90+95°C – за 40 хвилин, а при температурі +100°C – за кілька секунд. У навколишньому середовищі при температурі +18+21°C і вологості 64-76 % вірус може зберігатися 15-75 діб. При температурі мінус 2-4°C в інфікованих тканинах вірус зберігається понад рік, у заморожених тушках птиці – до 6 місяців. У пташниках при температурі від -5°C до +19°C вірус життєздатний протягом 5 місяців [1, 5, 8].

Гемаглютинуючу властивість вірусу використовують для диференціації штамів. Гемаглютинін лентогенного штаму В1 за 12 годин культивування в клітинах хоріоналантаїсної оболонки накопичується в титрах 1:16-1:32, а гемаглютинін велогенного Т/53 штаму вірусу – у вищих титрах – 1:64-1:128 [2, 3, 5, 8].

Отже, реакцію гемаглютинації можна використовувати як для індикації вірусу у вірусомісному матеріалі, так і для визначення кількості вірусу, отриманого при культивуванні, а також при вивченні впливу різних факторів на збереження вірусу. При вивченні даної теми ми приділяли значну увагу визначенню умов короткочасного та тривалого зберігання вірусу.

Завдання дослідження. Метою нашої роботи було визначення титру вірусу в реакції гемаглютинації і вивчення впливу температури зберігання вірусу на його гемаглютинуючу активність.

Матеріали і методи дослідження. В дослідженнях використали два види вакцини. Вакцина №1 – PolimunNDClon 124 (вакцина проти ньюкаслської хвороби птиці, жива ліофілізована виробництва ТОВ НВП «Біо-Тест-Лабораторія»,

Вісник Сумського національного аграрного університету

Україна (ТУ У 46.15.556-2001; серія №7. Придана до 04.2004. Вакцина випускається у флаконах ємністю 5мл. Вакцина №2 – «Владивак «Ласота» сухая 9⁶ Іg_{50/см2} (ООО «Торговый дом», Россия. Серія 2. Произведена 02.14. Срок годности 12 месяцев). Вакцина випускається в ампулах ємністю 2мл.

Зберігали вакцини згідно з їх настановами при температурі 4-8⁰С до моменту використання.

Реакцію гемаглютинації (РГА) ставили мікрометодом в лунках плексигласової панелі за загальноприйнятною методикою [2, 3, 5, 9].

Готували послідовні двократні розведення вірусу від 1:2 до 1:4096. В усі 12 лунок додавали по 0,03мл 0,5%-ої зависі еритроцитів, панелі струшували. Після 20-30-хвилинної експозиції за кімнатної температури враховували результат. Позитивним вважали результат за утворення на дні лунки осаду у вигляді «парасольки» не менше, ніж на два плюси. При утворенні осаду у вигляді «гудзика» результат вважали негативним.

Досліди проводили в умовах лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології. Вакцинний вірус зберігали за різних температур, а саме: - 18⁰С та +4⁰С – в побутовому холодильнику кафедри мікробіології; при кімнатній температурі (+18+20⁰С) та при +37⁰С в термостаті лабораторії кафедри. Час експозиції коливався від кількох годин до кількох тижнів в залежності від температури.

Результати власних досліджень. Ми обрали 4 температурні режими, а саме: мінус 18⁰С, +4⁰С, +20⁰С та +37⁰С. Контролем слугували сухі вакцини, які впродовж дослідів зберігали при температурі +4⁰С в холодильнику.

Кожну партію вірусу після експозиції вміщували в морозильну камеру до повного закінчення досліду, після чого усі проби розморожували і використовували для постановки реакції гемаглютинації (рис.1). Результати реакції записували у логарифмах з основою 2. Титр контрольного вірусу впродовж дослідів не змінювався і становив 12lg₂.

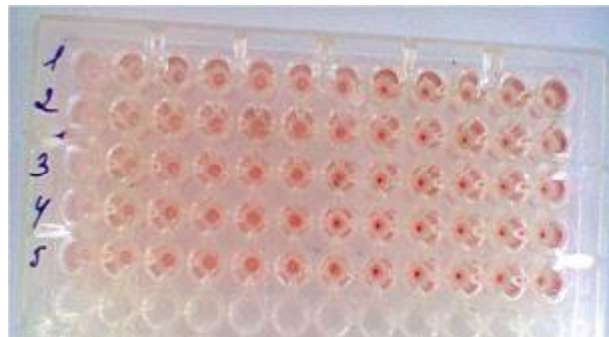


Рис. 1. Загальний вигляд панелі після постановки реакції гемаглютинації

Цифрами позначені проби вірусу, що зберігався за різних умов. Лунки, що розташовані ліворуч, містять осад у вигляді «парасольки» - позитивна реакція, лунки праворуч – осад у вигляді «гудзика» - негативна реакція.

Облік результатів зберігання вірусу при кімнатній температурі (+20⁰С) проводили через 12, 20, 24 та 48 годин. За зберігання вірусу при температурі +37⁰С у термостаті облік результатів проводили через 1, 4, 12, 20, 24 та 48 годин. Отримані дані титрування вірусів в РГА наведені у таблицях 1-2.

Таблиця 1

Гемаглютинуючі властивості вакцинного вірусу ньюкаслської хвороби при температурах +20⁰С та +37⁰С, Іg₂

Вакцина	Температура	Експозиція					
		1год.	4год.	12год.	20год.	24год.	48год.
№1	+20 ⁰ С	-	-	11	11	11	9
№2	+20 ⁰ С	-	-	11	10	10	9
№1	+37 ⁰ С	10	10	9	9	8	8
№2	+37 ⁰ С	10	10	9	9	8	8

Дані таблиці 1 свідчать про те, що зниження гемаглютинуючих властивостей вірусу відбувалося швидше за температури +37⁰С, ніж за температури +20⁰С і майже не відрізнялося у обох варіантів вакцин. В порівнянні з контрольним вірусом, за 48 годин кімнатна температура знижувала гемаглютинуючу здатність обох вакцинних штамів вірусів, що проявилось зниженням титру на три логарифми (у 8 разів), а при збері-

ганні в термостаті за той же період гемаглютинуючий титр вірусу падав на 4 логарифми (або у 16 разів).

Облік результатів зберігання вірусу при температурі побутового холодильника (+4⁰С) проводили через 20, 24 і 48 годин, а також через 12 діб і 2 місяці. Термін спостережень при зберіганні вірусу в морозильній камері (-18⁰С) тривав до 4 місяців (табл. 2).

Таблиця 2

Гемаглютинуючі властивості вакцинного вірусу ньюкаслської хвороби при температурах +4⁰С та -18⁰С, Іg₂

Вакцина	Температура	Експозиція					
		20год.	24год.	48год.	12діб.	2міс.	4міс.
№1	+4 ⁰ С	10	10	10	9	7	-
№2	+4 ⁰ С	10	10	9	-	-	-
№1	-18 ⁰ С	12	12	12	12	8	7
№2	-18 ⁰ С	12	12	12	-	-	-

Температура побутового холодильника +4°C викликала зниження титру вірусу на 2 логарифми через 48 годин, на 3 – через 12 діб і на 5 – через 2 місяці. Заморожування вірусу дозволило зберегти вірус на рівні контрольного (12 логарифмів) впродовж 12 діб, але при зберіганні вірусу 2 місяці титр його знизився на 4, а через 4 місяці – на 5 логарифмів, тобто у 32 рази.

З літературних даних відомо, що швидкість інактивації вірусу та змін його гемаглютинуючих властивостей залежить від температури та тривалості її дії на вірус. Проведені нами дослідження виявили аналогічні закономірності змін біологічних властивостей вірусу НХ та дозволили обрати найкращі умови його зберігання в лабораторії кафедри. Аналізуючи отримані нами результати, можна сказати, що для збереження вірусу на

кілька тижнів доцільно використовувати лише один із досліджених методів – зберігання вірусу у морозильній камері, бо усі інші випробувані методи викликають значне зниження гемаглютинуючих властивостей вірусу.

Висновки. 1. Усі апробовані умови зберігання вакцинного вірусу ньюкаслської хвороби приводять до зниження його гемаглютинуючого титру, причому чим вища температура зберігання, тим швидше знижується титр вірусу.

2. Температура -18°C дозволяє повністю зберегти на 100% гемаглютинуючі властивості вірусу протягом 12 діб, інші температурні режими (+4°C, +20°C, +37°C) знижують гемаглютинуючу здатність вірусу у 4-64 рази в порівнянні з початковими значеннями.

Список використаної літератури:

1. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. – М., 1998. – 928 с.
2. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине: Справочное пособие / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др.; Под ред. А.Н. Головкина. – Х.: НТМТ, 2007. – 511 с.
3. Образцов В.П. О диагностическом и иммунологическом значении реакции гемагглютинации и ее задержки при азиатской чуме птиц: Автореф. дис.... канд. вет. наук; ХВИ. – Х., 1954. – 11с.
4. Практикум з ветеринарної вірусології: Навч. посібник/ В.Г. Скибіцький, І.І. Панікар, О.А. Ткаченко та ін.– К.: Вища освіта, 2005. – 208 с.
5. Псевдочума птиц (Ньюкаслская болезнь) / В.Н. Сюрин. – М.: Издательство с/х литературы, журналов и плакатов, 1963. – С. 32-76.
6. Свинцов П.М. Азиатская чума птиц (Атипичная чума, Ньюкестльская болезнь).– М.: Россельхозиздат, 1949. – 158 с.
7. Смолянинов В.К. Изучение иммунной реакции организма кур при введении авирулентного (вакцинного) и вирулентного (эпизоотического) штаммов вируса псевдочумы птиц (болезни Ньюкасла): Автореф. дис...канд. вет. наук // ХЗВИ. – Х., 1972. – 18 с.
8. Disease of poultry / Edited by Calne B.W. – 10th ed. – 1997. – P. 543-560

Гарагуля Г.И., Гаркавая В.В. Гемагглютинирующие свойства вакцинного вируса Ньюкаслской болезни при разных температурах хранения

Статья посвящена изучению гемагглютинирующих свойств вируса ньюкаслской болезни при различных температурах хранения (-18°C, +4°C, +20°C та +37°C). Установлена зависимость гемагглютинирующего титра вируса от температуры: чем она выше, тем быстрее снижается титр вируса.

Ключевые слова: вирус ньюкаслской болезни, гемагглютинация, температура хранения.

Garagulya G.I., Garkava V.V. The hemagglutination activity of Newcastle disease virus in the different temperature of the save

In the article Newcastle disease virus hemagglutination activity and the role of the temperature (-18°C, +4°C, +20°C та +37°C) was studied. It was found that the hemagglutination activity decrease by 4-16 times in the time of save if the temperature increase.

Keywords: Newcastle disease virus, hemagglutination activity, save temperature.

Дата надходження до редакції: 02.01.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.