

УДК 636.09:616.98:578.825:599.731.1:57.083.3:611.018.54

М. П. СИТЮК, кандидат ветеринарних наук

Л. В. ОСМОЛОВСЬКА

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

О. М. НЕВОЛЬКО, кандидат ветеринарних наук

Ж. М. ДРОЖЖЕ

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ГУМОРАЛЬНИХ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЕСКІ В СИРОВАТКАХ КРОВІ ДИКИХ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ТА В РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

У статті наведені дані щодо визначення специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі в сироватках крові диких свиней методом імуноферментного аналізу та реакцією нейтралізації.

Ключові слова: хвороба Ауескі, дикі свині, реакція віруснейтралізації, імуноферментний аналіз, антитіла.

Хвороба Ауескі – вірусне захворювання, до якого сприйнятливі усі види домашніх тварин (свині, ВРХ, вівці, кози, собаки, коти), диких тварин (дикі кабани, мавпи, борсуки, гризуни, кажани, черепахи), хутрові звірі (кролі, песці, норки, лиси, тхорі), птиця (індики, кури, голуби, і інші птахи) [1-3]. Угорський вчений А. Ауескі перший диференціював цю хворобу від сказу та в 1902 році ізолював специфічний вірус-збудник [4] з патологічного матеріалу від бугая, собаки і kota та описав клінічну картину нової невідомої хвороби, що характеризувалася ураженням нервової системи і зудом та експериментально відтворив її на кролях [5]. Захворювання поширене у всіх європейській країнах, Південній і Північній Америці, Африці і Азії [1, 2, 6], окрім Австралії [7]. На території бувшого СРСР хвороба вперше була описана серед великої рогатої худоби (ВРХ) В. Акуловим у 1909 році [8], а в Україні – Б.Е. Айзенманом і І.І. Лукашевим у 1935 році серед поросят-сосунів на території Дніпропетровської області [5]. Наразі станом за 2011 рік в Україні виявлено 345 свинарських господарств, інфікованих вірусом хвороби Ауескі [9]. Доведено, що природним резервуаром збудника інфекції є домашні свині, однак деякі вчені вважають, що і дикі кабани є резервуаром збудника інфекції і відіграють певну роль в патології цього захворювання серед домашніх свиней [10].

Важливе місце в системі профілактики та боротьби з хворобою відіграють засоби діагностики та специфічної профілактики, які на сьогодні проводяться з використанням маркованих вакцин та дискримінуючих тестів, що дозволяють диференціювати постінфекційні та поствакцинальні антитіла за рахунок чого виправдано та ефективно проводяться заходи по ерадикації хвороби [1, 3, 4, 10-15]. Для діагностики хвороби Ауескі розроблені ряд методів. Індикацію антигену вірусу проводять електронною мікроскопією, вірусовиділенням в культурах

клітин, полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР). Серологічну ідентифікацію збудника здійснюють в реакції нейтралізації (РН), імуофлуоресценції (РІФ), реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), реакції дифузійної преципітації (РДП), реакції імуоелектрофорезу (РІЕФ), реакції зв'язування комплементу (РЗК), імуоферментному аналізі (ІФА). Молекулярно-генетичну ідентифікацію здійснюють методом ПЛР, рестрикційним аналізом, секвенуванням з подальшим філогенетичним аналізом досліджуваних ізолятів вірусу. Серодіагностика проводиться РН, РНГА, РДП, ІФА, радіальної імуодифузії (РРІД), латексаглютинації, радіоімунологічним аналізом (РІА) [1, 3, 4, 10-13]. Більшість авторів вважають, що найбільш чутливими та специфічними при серологічній діагностиці хвороби Ауескі є РН та твердофазний ІФА [1, 3, 4, 10-13].

За даними світової організації здоров'я тварин (ОІЕ) для діагностики хвороби Ауескі рекомендовано 2 тести: ІФА та РН [16].

Застосування реакції нейтралізації для серологічної діагностики хвороби Ауескі не виправдане у випадках вакцинації свинопоголів'я маркованими вакцинами, коли відрізнити інфікованих та вакцинованих тварин можна лише з використанням так званих дискримінуючих тестів [1, 3, 4, 12, 13, 15]. В інших випадках, коли в господарствах не проводилася раніше імунізація проти хвороби Ауескі або при моніторингових дослідженнях тварин дикої фауни, реакція нейтралізації є найбільш об'єктивним, чутливим і специфічним серологічним методом при виявленні антитіл до даного вірусу, а також антигену вірусу з його ідентифікацією, визначенням антигенної спорідненості та відмінностей.

У лабораторії хвороб свиней та біотехнології IBM НААН з 2010 року розпочатий та проводиться серологічний моніторинг в популяції диких свиней відносно хвороби Ауескі. За результатами досліджень сироваток крові диких свиней в реакції нейтралізації встановлено серопревалентність цих представників дикої фауни в розрізі регіонів України: західний – 10,72 %, південний – 10,89 %, північний – 17,52 %, східний – 8,14 %, центральний – 17,38 % [17-21].

Метою наших досліджень було дослідити сироватки крові диких свиней на наявність специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі методом ІФА та РН та порівняти одержані результати.

Матеріали і методи досліджень. Сироватки крові диких свиней (694 проби), що відібрані під час відстрілу в сезон полювання 2011-2012 років з територій 182 районів 19 областей України. Дослідження наявності специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі в сироватках крові здійснювали мікрометодом реакції нейтралізації в перещеплюваній культурі клітин ВНК-21, який як і твердофазний імуоферментний аналіз, рекомендований ОІЕ для виявлення антигену і антитіл до вірусу хвороби Ауескі [16]. При дослідженнях використовували виділений нами польовий ізолят вірусу хвороби Ауескі, котрий був задепонований 17.10.2011 року в Державному науково-контрольному інституті біотехнологій і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) під номером 532, як діагностичний штам “Петриківський-2006”, з титром інфекційної активності $10^{7.7}$ Іг ТЦД₅₀/см³ та гіперімунну сироватку крові проти вірусу хвороби Ауескі з титром специфічних нейтралізуючих антитіл 1:512. При постановці реакції нейтралізації використовували: сучасну апаратуру – ламінарний бокс та СО₂ інкубатор фірми JOUAN, інвертований мікроскоп фірми ZEISS AXIOVERT 25, пластикові мікропланшети з плоским та U-подібним дном фірми Sarstedt; автопіпетки фірми

БІОНІТ 50-250 мкл; живильні середовища: DMEM, виробництва PAA Laboratories GmbH, Австрія; 199, виробництва НВП “Біо-Тест-Лабораторія”; розчин версену, виробництва ПанЕко; сироватку крові великої рогатої худоби серія, виробництва “Біо-Тест-Лабораторія”; розчин трипсину 0,25 % на фосфатному буфері для культур клітин, виробництва НВП “Біо-Тест-Лабораторія”.

При дослідженні сироваток крові медодом ІФА використовували тест-систему для діагностики хвороби Ауескі "ІФАgЕ-ВХА", серія 09, Р/П № ВВ-00253-06-10, термін придатності до 02.2013 р., виробництва НВП "Біо-Тест-Лабораторія".

Згідно літературних даних [1], при дослідженні сироваток крові в реакції нейтралізації, за діагностичний титр антитіл вважали рівень 1:8 і вище.

Результати досліджень та їх аналіз. Сироватки крові диких свиней надходили до Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи і досліджувалися методом ІФА. Аналогічні сироватки крові досліджувалися в лабораторії хвороб свиней та біотехнології ІВМ НААН мікрометодом реакції нейтралізації. Результати проведених досліджень наведені в таблиці.

Таблиця

Результати досліджень сироваток крові диких кабанів на предмет виявлення специфічних гуморальних антитіл методом ІФА та РН

Область	Кількість досліджених		Результати досліджень сироваток крові						
	районів	сироваток	ІФА				РН		
			негативні	позитивні	сумнівні	позитивних від досліджених, %	негативні	Позитивні з титром антитіл 1:8 і вище	позитивних від досліджених, %
АР Крим	6	42	42	-	-	-	42	-	-
Вінницька	11	19	17	2	-	10,52	17	2	10,52
Дніпропетровська	9	20	17	3	-	15,0	17	3	15,0
Житомирська	11	47	35	12	-	25,53	35	12	25,53
Закарпатська	9	16	16	-	-	-	16	-	-
Запорізька	5	34	32	2	-	5,88	32	2	5,88
Івано-Франківська	10	19	19	-	-	-	19	-	-
Київська	12	38	34	4	-	10,52	34	4	10,52
Кіровоградська	1	16	16	-	-	-	16	-	-
Луганська	8	47	44	3	-	6,38	44	3	6,38
Львівська	11	75	61	13	1	17,33	60	14	18,66
Одеська	14	22	16	6	-	27,27	16	6	27,27
Полтавська	19	98	81	17	-	17,34	81	17	17,34
Рівненська	12	32	25	7	-	21,87	25	7	21,87
Сумська	9	50	40	10	-	20,0	40	10	20,0
Тернопільська	9	14	12	2	-	14,28	12	2	14,28
Хмельницька	13	35	20	15	-	42,85	20	15	42,85
Черкаська	6	46	38	8	-	17,39	38	8	17,39
Чернівецька	7	24	24	-	-	-	24	-	-
Всього	182	694	589	104	1	14,98	588	105	15,12

Примітка: «-» – відсутність позитивних, сумнівних сироваток крові та відсутність позитивних сироваток від числа досліджених.

Порівняльний аналіз результатів проведених досліджень, що зображені в таблиці, вказує про те, що з 694 сироваток крові диких свиней досліджених методом ІФА позитивними до вірусу хвороби Ауескі були 104 зразки (14,98 %). При дослідженні цієї кількості сироваток мікрометодом реакції нейтралізації виявлено 105 позитивних проб з титром антитіл від 1:8 до 1:1024, що становить 15,12 %. Одна сироватка крові, що була сумнівною в ІФА, при дослідженні в реакції нейтралізації виявилася позитивною в титрі 1:8.

Враховуючи результати проведених досліджень слід сказати, що обидва методи є чутливими та специфічними і надають практично відповідні рівні результати (коефіцієнт кореляції $r=0,99$), що виправдовує застосування цих тестів в серологічній діагностиці захворювання.

Хочемо наголосити на тому, що результати досліджень сироваток крові методом ІФА – 14,98 % позитивних проб від досліджених, підтверджують раніше одержані дані стосовно серопревалентності диких свиней до вірусу хвороби Ауескі, котрі були проведені в лабораторії хвороб свиней та біотехнології ІВМ НААН М.П. Ситюком і становлять залежно від регіону України від 8,14 % до 17,52 % (загальний 13,46 %) [17-21].

Висновки. Порівняльний аналіз результатів досліджень сироваток крові диких свиней на предмет виявлення специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі методом імуноферментного аналізу ("ІФА_{gE}-ВХА") та в реакції нейтралізації вказує про корелятивну наближеність результатів $r=0,99$, що виправдовує застосування цих тестів в серологічній діагностиці захворювання.

Перспектива подальших досліджень. Реакцію нейтралізації та тест-системи "ІФА_{gE}-ВХА" імуноферментного аналізу слід використовувати з метою виявлення специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі в сироватках крові свиней.

Список використаної літератури:

1. Болезнь Ауески // Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 603–630.
2. Коломыцев А.А. Болезнь Ауески – эпизоотическая ситуация и современная система мер борьбы / А.А. Коломыцев, А.А. Стрижаков, Д.Г. Федоров, В.А. Филоматова // Болезни диких животных : труды Междунар. науч.-практич. конф., 28–30 сент. 2004 г. – Покров, 2004. – С. 134–145.
3. Оганесян А.С. Разработка непрямого варианта иммуноферментного анализа для определения титра антител к вирусу болезни Ауески в сыворотках крови свиней / А.С. Оганесян // Ветеринар. патология. – 2006. – № 4. – С. 103–106.
4. Моренков О.С. Иммуноферментные тесты для серологической диагностики болезни Ауески / О.С. Моренков, Ю.А. Собко, И.А. Собко [и др.] // Ветеринария. – 2001. – № 8. – С. 21–25.
5. Красочко П.А. Эпизоотология, инфекционные болезни: болезнь Ауески (Morbus Aujeszkyi) / П.А. Красочко, М.В. Якубовский, А.И. Ятусевич // Болезни сельскохозяйственных животных. – Минск, 2005.
6. Федоров Д.Г. Вклад ВНИИВВиМ в разработку методов диагностики и вирусспецифической профилактики болезни Ауески / Д.Г. Федоров, В.И. Жестев, Е.М. Хрипунов [и др.] // Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные

болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена : материалы Междунар. науч.-практ. конф. 30–31 мая 2001 г. – Покров, 2001. – С. 152–154.

7. Поздняков А.В. Как распознать Ауески / А.В. Поздняков // Ветеринарный консультант. – № 13. – С. 8–9.

8. Амирова И.В. Эпизоотологическая ситуация по болезни Ауески в Смоленской области / И.В. Амирова, А.Н. Андреева // Болезни диких животных : труды Междунар. науч.-практич. конф., 28–30 сент. 2004 г. – Покров, 2004. – С. 146–148.

9. В Украине выявлено 345 свиноводческих хозяйств, иницированных вирусом болезни Ауески / [без авт.] // Сучасна вет. медицина. – 2011. – № 4. – С. 5.

10. Ma Wenjun. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses / Wenjun Ma, Kelly M. Lager, Juergen A. Richt [et al.] // J Vet Diagn Invest. – 2008. – N 20. – P. 440–447.

11. Юсупов Р.Х. Возможность дифференциации постинфекционных и поствакцинальных антител при болезни Ауески / Р.Х. Юсупов, Т.З. Байбилов, Г.Х. Ильясова [и др.] // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных : труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ 13–14 нояб. 2008 г. – Покров, 2008. – С. 129–132.

12. Мифтахов Н.Р. Разработка диагностикума на основе маркированного штамма «ВК» вируса болезни Ауески / Н.Р. Мифтахов, А.Н. Чернов // Ветеринар. врач. – 2010. – № 1. – С. 31–32.

13. Уласов В.И. Проблемы борьбы с болезнью Ауески у свиней / В.И. Уласов, А.А. Ольшанская // Ветеринария. – 2009. – № 4. – С. 20–23.

14. Мифтахов Н.Р. Разработка диагностикума на основе маркированного штамма «ВК» вируса болезни Ауески / Н.Р. Мифтахов, А.Н. Чернов // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 6. – С. 10.

15. Бабкін М.В. Проблеми та перспективи викорінення хвороби Ауескі (ХА) в Україні / М.В. Бабкін // Вет. медицина України. – 2010. – № 3. – С. 27–29.

16. МЕБ. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЕБ. – 19-е изд. – 2010. – 471 с.

17. Ситюк М.П. Ретроспективний аналіз серопревалентності диких кабанів до вірусу хвороби Ауескі на території південних областей України / М.П. Ситюк // Вісник Житомирського національного аграрного університету. – 2012. – № 1, Т. 3, Ч. 1. – С. 206–211.

18. Ситюк М.П. Серологічний моніторинг хвороби Ауескі в популяції дикого кабана території центральних областей України / М.П. Ситюк // Вет. біотехнологія : бюлетень. – Ніжин : ПП Лисенко М.М., 2012. – № 20. – С. 176–184.

19. Ситюк М.П. Серологічний моніторинг хвороби Ауескі серед диких кабанів території північних областей України / М.П. Ситюк // Ветеринарна медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2012. – Вип. 96. – С. 232–234.

20. Ситюк М.П. Серологічний моніторинг хвороби Ауескі серед диких кабанів території західних областей України / М.П. Ситюк // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2012. – № 172, Ч. 2. – С. 165–170.

21. Ситюк М.П. Визначення серопревалентності у диких кабанів до вірусу хвороби Ауескі на території північних областей України / Ситюк М.П. // Науковий вісник ветеринарної медицини : Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2012. – Вип. 9 (92). – С. 155-158.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГУММОРАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ДИКИХ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ / Ситюк Н. П., Осмоловская Л. В., Неволько О. Н., Дрожде Ж. Н.

В статье наведены данные относительно определения специфических гуморальных антител против вируса болезни Ауески в сыворотках крови диких свиней методом иммуноферментного анализа и реакцией нейтрализации. Показано, что оба метода дают практически равные результаты, что оправдывает применение их в серологической диагностике заболевания. Результаты исследования сывороток крови методом иммуноферментного анализа подтверждают ранее полученные данные относительно процентного показателя серопревалентности к вирусу болезни Ауески популяции диких свиней Украины.

Ключевые слова: болезнь Ауески, дикие свиньи, реакция вируснейтрализации, иммуноферментный анализ, антитела.

DETERMINATION OF SPECIFIC HUMMORAL ANTIBODIES AGAINST VIRUS OF AUJESKY DISEASE IN BLOOD SERUM OF WILD PIGS BY METHOD OF ELISA AND NEUTRALIZATION TEST / Sytiuk M. P., Osmolovska L. V., Nevolko O. M., Drozhzhe Zh. M.

The data of identification of humoral antibodies against Aujeszky disease in the sera of blood from wild boars with ELISA method and neutralization test was shown in the title. It was shown what both methods gives almost identical results, because of what it is recommended in serological diagnostics of the disease. The results of investigation sera with ELISA confirm the data about percentage index of seroprevalency toward Aujeszky disease obtained before from population of wild boars in Ukraine.

Keywords: Aujeszky disease, wild boars, virusneutralisation test, ELISA, antibodies.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук В.В. Уховський