

## ОДЕРЖАННЯ КОМПОНЕНТІВ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНОГО ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ

Музика Н.М.

Інститут птахівництва УААН, с. Борки, Харківська обл.

Стегній Б.Т.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

*Одержано очищений та концентрований вірус ентериту гусей з титром 10-10,5 Іg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> та високоактивна гіперімунна сироватка з титром 1:5120. За характеристиками компоненти придатні для випробування в якості антигену та позитивного контролю при розробці вітчизняної тест-системи ІФА.*

Однією з найбільш розповсюджених і небезпечних хвороб гусей є вірусний ентерит (ВЕГ, хвороба Держі, Enteritis viralis anserculogum), що викликається парвовірусом з родини Parvoviridae рід Parvovirus, характеризується пригніченням, малорухливістю, серозним та серозно-фібринозним ринітом, кон'юнктивітом, діареєю, враженням шлунково-кишкового тракту, печінки та інших органів і високою летальністю – до 30-90%. Хворіє птиця віком від 1 до 30 діб [6, 12, 13].

При виникненні в господарстві захворювання спричиняє великі економічні збитки, обумовлені недоотриманням гусенят при виводі (підвищений відхід ембріонів на останніх стадіях інкубації), загибеллю молодняку, витратами на проведення проти-епізоотичних заходів та інше. Головне в боротьбі з вірусним ентеритом гусей – специфічна профілактика захворювання, але важливою складовою успішної боротьби з захворюванням є своєчасна швидка діагностика та контроль напруженості та рівня імунітету у вакцинованої птиці.

На даний час існують методи серологічної діагностики вірусного ентериту гусей – реакція нейтралізації (РН), реакція дифузної преципітації (РДП) [8], реакція непрямой гемаглютинації (РНГА) [1]. РДП і РНГА за чутливістю і специфічністю значно поступаються реакції нейтралізації, яка в свою чергу трудомістка і потребує значного часу для постановки. В Росії проводились розробки непрямого методу ІФА для діагностики вірусного ентериту гусей, але у виробництво ці методи не впроваджені [7, 9, 4]. В Україні та світі комерційні тест-системи для діагностики вірусного ентериту гусей в ІФА відсутні. Дуже актуальним та необхідним для сучасного гусівництва є створення діагностичних тест-систем для серологічної діагностики вірусного ентериту гусей. Саме тому в Інституті птахівництва УААН продовжуються наукові дослідження щодо створення імуноферментної тест-системи для серологічної діагностики цього захворювання.

Метою наших досліджень було одержання високоактивного антигену та гіперімунних сироваток до вірусу ентериту гусей, що дасть змогу конструювати вітчизняний діагностичний набір ІФА.

**Матеріали та методи.** В дослідженнях використовували вакцинний штам вірусу ентериту гусей BBS-99. Розмноження вірусу здійснювали на одношаровій культурі клітин інтактних гусячих фібробластів, яку отримували загальноприйнятим методом [2]. Визначення біологічної активності вірусу до та після очистки проводили шляхом титрування на цій же культурі клітин.

Для очищення та концентрування вірусу використовували стандартні методи [3] - осадження ПЕГ-6000, низькошвидкісне центрифугування, центрифугування через 30% сахарозну «подушку», ультрацентрифугування через градієнт густини сахарозилхлористого цезію. Але крім цього додатково проводили обробку вірусного матеріалу ультразвуком 22 кГц 1-2 хвилини, щоб розірвати тісні зв'язки між віріонами та клітинними мембранами.

Для перевірки якості очистки проводили електрофорез отриманого вірусного препарату в поліакріламідному гелі (ПААГ) за Gorg A. [11] в порівнянні зі стандартними білками.

При отриманні гіперімунних сироваток крові випробували дві схеми імунізації:  
 – триразове введення зростаючих доз вірусвміщуючої рідини після обробки хлороформом дорослим гусям [10];  
 – триразове введення очищеного та концентрованого за описаними вище методами матеріалу 30-добовим гусеняттям [4].

Активність отриманих гіперімунних сироваток визначали в реакції нейтралізації на культурі клітин гусячих фібробластів за загальноприйнятими методиками.

Автори роботи дякують за допомогу при проведенні наукових досліджень завідувачу відділом вивчення хвороб птиці Інституту птахівництва УААН кандидату ветеринарних наук Безрукавій І.Ю., завідувачу лабораторії ветеринарної біотехнології Інституту птахівництва УААН кандидату біологічних наук Білецькій Г.В. та старшому науковому співробітнику відділу профілактики хвороб птиці Інституту птахівництва УААН кандидату біологічних наук Циновому О.В.

**Результати досліджень.** Одним з основних компонентів імуноферментних тест-систем є антиген, який сорбований на твердій фазі та забезпечує специфічність реакції. В зв'язку з цим велика увага при розробці нових тест-систем приділяється отриманню високоочищеного та концентрованого антигену [5]. В зв'язку з біологічними та морфологічними особливостями вірусу ентериту гусей (розмір, морфологія та структура), а також особливостями репродукції (тісний взаємозв'язок з клітинними елементами) методи отримання очищеного та концентрованого антигену складні та мають багато етапів.

В наших наукових дослідженнях було випробувано різні методи та їх комбінації, проведено 4 різних досліди щодо отримання антигену вірусу ентериту гусей.

Основні етапи концентрування та очищення вірусу ентериту гусей в проведених дослідах представлені в табл. 1.

**Таблиця 1** – Етапи концентрування та очищення вірусу ентериту гусей

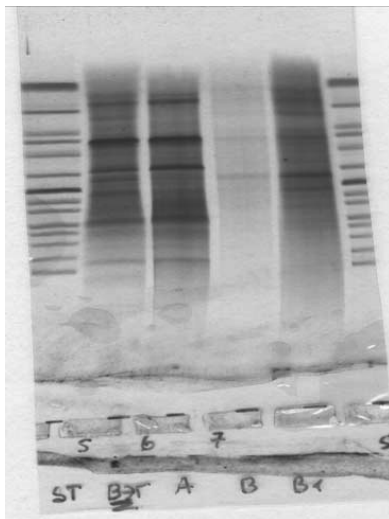
№ досліду	Етапи концентрування та очищення						Титр вірусу, lg ТЦД <sub>50/см3</sub>	
	Осадження ПЕГ-6000	Низькошвидкісне центрифугування	Центри-фугування через 30 % сахарозу	Центрифугування через градієнт 10-50% сахарози + градієнт хлористого цезію	Діаліз через напівпроникну мембрану	Додаткове центрифугування через 30 % сахарозу	Вихідний	Після очистки і концентрування
1	+	+	+	+	-	-	7,5	8,2
2	+	+	+	+	+	-	7,5	9,2
3	+	+	+	+	-	+	7,5	10,5
4	+	+	+	+	-	+	7,5	10,0

Так, у першому досліді титр очищеного вірусу склав 8,2 lg ТЦД<sub>50/см3</sub>. Проведення діалізу через напівпроникну мембрану у другому досліді дало можливість підвищити концентрацію вірусу до 9,2 lg ТЦД<sub>50/см3</sub>, у третьому та четвертому дослідах замість діалізу застосували переосадження через 30%-ву сахарозу, що дало змогу збільшити титр до 10-10,5 lg ТЦД<sub>50/см3</sub>, що на 3 lg ТЦД<sub>50/см3</sub> вище, ніж у вихідному матеріалі та відповідно на 1 lg ТЦД<sub>50/см3</sub> вище, ніж у перших двох дослідах.

При електрофорезі отриманих фракцій вірусу в препаратах було виявлено чотири структурні поліпептиди, які за молекулярною вагою відносяться до вірусу ентериту гусей - 40, 47, 58, 87 кДа (Рис. 1).

Також важливим компонентом в будь-якій діагностичній тест-системі є контроль - позитивний та негативний. Тому частина наших досліджень була присвячена отриманню високоактивного позитивного контролю – гіперімунної сироватки крові

гусей. При отриманні гіперімунних сироваток за першою схемою використовували гусей віком 2,5 роки. Імунізацію проводили культуральною розплідкою вакцинного вірусу BBS - 99 з титром  $7,5 \text{ lg TЦД}_{50/\text{cm}^3}$  (попередньо обробленою хлороформом) триразово зростаючими дозами. На останньому етапі до вірусної суспензії додавали 0,2% сапоніна і вводили в очеревину. Кров від гусей відбирали через 10 днів після останньої імунізації.



**Рис. 1.** Плоскосний електрофорез в поліакриламідному гелі.

При відпрацюванні другої схеми використали 30-денних гусенят, яким вводили очищений препарат вірусу BBS - 99 з титром  $10,5 \text{ lg TЦД}_{50/\text{cm}^3}$  теж триразово зростаючими дозами, але, на відміну від запропонованої методики [4], третю імунізацію провели внутрішньом'язево з додаванням до матеріалу ад'юванту Монтанід ISA-70 у співвідношенні 1:1. Відбір крові здійснювали через 14 діб після останньої імунізації.

Активність отриманих гіперімунних сироваток визначали в реакції нейтралізації на культурі клітин гусячих фібробластів, після чого сироватки були ліофілізовані. Результати обох дослідів наведені в табл.2.

**Таблиця 2** – Результати дослідів по отриманню гіперімунних сироваток до вірусу ентериту гусей

№ досліді	Вік птиці	Матеріал для імунізації	Титр матеріалу, $\text{lg TЦД}_{50/\text{cm}^3}$	Титр антитіл в РН
1	2,5 роки	культуральна розплідка штаму BBS-99	7,5	1:1000
2	30 днів	очищений препарат BBS-99	10,5	1:5120

Таким чином, як видно з таблиці 2, застосування другої схеми імунізації дало змогу отримати високоактивну сироватку, придатну для застосування в якості позитивного контролю при розробці тест-системи ІФА.

**Висновки.** 1. В процесі очищення і концентрування вірусу переосадження через 30 % сахарозу дало змогу збільшити титр очищеного вірусу до  $10-10,5 \text{ lg TЦД}_{50/\text{cm}^3}$ . Якість очистки підтверджена електрофорезом в поліакриламідному гелі дослідних зразків.

2. Вдосконалена методика гіперімунізації гусей з додаванням до матеріалу ад'юванту Монтанід ISA-70 дозволила отримати високоактивну гіперімунну сироватку з титром в реакції нейтралізації 1:5120.

## Список літератури

1. Білецька, Г. В. Вивчення епізоотичного статусу щодо вірусного ентериту гусей методом серомоніторингу / Г. В. Білецька, І. Ю. Безрукава, Н. М. Пересада // Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. / ІП УААН. – Х., 2004. – Вип. 55. – С. 235-238. 2. Голубев, А. Д. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / А. Д. Голубев, А. А. Соминина. – Л.: Медицина, 1976. – 233 с. 3. Гридин, А. С. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных / А. С. Гридин, И. Н. Титов. – М.: Колос, 1971. – 240 с. 4. Маслов, Д. В. Серологическая диагностика вирусного энтерита гусей методом иммуноферментного анализа: автореф. дисс. на соискание канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Вет. микробиол., вирусол., эпизоотол., микология с микотоксикол. и иммунология» / Д. В. Маслов. – С.-П., 2006. – 17 с. 5. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций Ч.1 / ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2008. – 306 с. 6. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия / [Н. В. Кожемяка, Ф. С. Кудрявцев, Г. А. Грошева и др.] – М.: Колос, 1982. – 303 с. 7. Трефилов, Б. Б. Оценка поствакцинального иммунитета при вирусном энтерите гусей методом иммуноферментного анализа / Б. Б. Трефилов, Н. В. Никитина, Д. В. Маслов // Материалы междунар. Науч.-практ. Конф., посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России, 21-22 сентября 2006 г. – 2006. – С. 200-206. 8. Трефилов, Б. Б. Специфическая профилактика вирусного энтерита гусей / Б. Б. Трефилов // Вирусные болезни с.-х. животных. – Владимир, 1995. – С. 277. 9. Фадель, Г. А. Метод ИФА для диагностики вирусного энтерита гусей / Г. А. Фадель, Л. М. Надточей, А. В. Контримавичус // Ветеринария. – 1989. – № 7. – С. 36-39. 10. Шеглов, И. Применение гипериммунных сывороток для профилактики вирусного энтерита гусей / И. Шеглов, Б. Трефилов, В. Ивашенко // Передовой научно-производственный опыт в птицеводстве. Экспресс-информация. – 1980. – № 3 (99). – С. 12-14. 11. Gorg, A. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins / A. Gorg, W. Postel, J. Weser // Science Tools. – 1985. – Vol. 32, № 1. – С. 5-9. 12. Gough, R.E. Persistence of parvovirus antibody in geese that have survived Derzsy's disease / R.E. Gough // Avian Pathol. – 1987. – Vol. 16, № 2. – P. 327-330. 13. Samorek-Salamonowicz, E. Serokonwersja po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsy, ego u gesi niosek oraz ich potomstwa / E. Samorek-Salamonowicz, H. Czekaaj, G. Tomczyk, M. Musialik // Med. Weter. – 1989. – Vol. 45, № 6. – P. 336-338.

### RECEPTION OF COMPONENTS OF THE IMMUNE ENZYME TEST-SYSTEM FOR SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF GEESSE VIRUS ENTERITIS

Muzyka N.M.

Poultry Research Institute of the UAAS, Borky, Kharkiv Region

Stegniy B.T.

NSC "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

*It has been obtained purified and concentrated virus of geese enteritis with the titer 10-10,5 lg TTsD<sub>50</sub>/sm<sup>3</sup> and highly active hyper immune serum with the titer 1:5120. The components fit for testing as the antigen and positive control at the development of domestic ELISA test-system.*

УДК 619:615.371:578.832.1:619.5

### ЩЕПЛЕННЯ ДОБОВИХ КУРЧАТ ІНАКТИВОВАНОЮ ЕМУЛЬСОВАНОЮ ВАКЦИНОЮ ПРОТИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ «АВІФЛУВАК-ІЕКВМ», (СХЕМА ВАКЦИНАЦІЇ, РІВЕНЬ І НАПРУЖЕНІСТЬ ІМУНІТЕТУ)

Музыка Д.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна

*Стаття присвячена результатам вивчення особливостей формування специфічного імунітету в молодяку курей, щеплених інактивованою емульсованою вакциною проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» у добовому віці. Визначено рівень специфічних антитіл у сироватках крові курчат через різні строки після вакцинації з ревакцинацією, а також повторного введення. Запропонована схема щеплення добових курчат, визначена оптимальна доза вакцини.*

Успіх вакцинації, як одного з протиепізоотичних заходів при будь-якому інфекційному захворюванні, залежить від якості її проведення. Під цим розуміється максимально повне охоплення сприятливого до захворювання поголів'я птиці вакцинацією, здатності вакцини формувати у птиці достатній рівень специфічних антитіл.