

-206. 6. Красников, Г.А., Машенко, Е.В., Келеберда, Н.И. О морфофункциональной зависимости между фабрициевой бурсой и селезенкой. // Проблемы зооинженерии и-та вет. медицины :Сб.науч. тр. / ХЗВИ.- X., 2001.- Вып. 8 (32). — С. 141-143. 7. Красников, Г.А., Келеберда, Н.И., Машенко, Е.В. Морфофункциональные проявления иммунодефицитов при вирусных болезнях птиц // Матеріали 5-го з'їзду паразитологів України. Зб. наук. праць/ХЗВИ.-X., 2001. — С. 186-187. 8. Красніков, Г.А., Медвідь, К.О. Динаміка змін маси імунокомпетентних органів курчат у нормі та після щеплення проти хвороби Марекка. // Вет.медицина : Між від. темат. наук.зб.- 2005.- Вип.85(1). С. 612. 9. Sven Reese, G. Dalamani, Bernd Kaspers. The avian lung-associated immune system. Vet. Res. 37(2006) 311-324. 10. Ройт, А. Иммунология [Текст] / А.Ройт, Дж Бростофф. - Мир, 2000. -528 с.

DYNAMICS OF MASS INDEXES OF CHICKEN IMMUNOCOMPETENT ORGANS AT THE IMMUNIZATION AGAINST CHICKEN INFECTIOUS BRONCHITIS

Dovganyuk A.O.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

By the investigations of mass and indexes of chicken immunity organs are determined the features of vaccine action against chicken infectious bronchitis after intertracheal and intramuscular injection. It has been established that on sixth day after vaccination occurred decrease of mass and indexes of spleen mass and thymus at both methods of vaccination. But on tenth day it has been observed their activation with following low decrease of mass indexes of thymus and bursa of Fabricius on twentieth day and expressed repeated increase mass and index of mass on thirtieth day when positive difference between indexes in vaccinated and control birds in all studied organs has been attained the maximal value when high increase on 2-5 times of live weight and index of organ's mass has been attained in all third studied immunity organs.

УДК 619:616.98:578.833.31:616-076

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ

Дорош Ю.О.¹

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

На основі аналізу джерел літератури підібрано оптимальну схему конструювання за умов мало бюджетного фінансування вітчизняної тест-системи ELISA для серомоніторингу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC), з використанням ізоляту «ВД-8» збудника PPCC, розмноженого в альвеолярних макрофагах свині.

На сьогоднішній день метод ELISA введено у перелік стандартних діагностичних методів МEB і він широко використовується у національних програмах боротьби з інфекційними хворобами свиней у багатьох країнах. Однією з таких хвороб є репродуктивно-респіраторний синд-

¹ Науковий керівник — Бузун А.І., канд. вет. наук, доцент

ром свиней (PPCC). За даними Prairie Swine Center (2006), кожен спалах PPCC у США призводить до втрати 600 \$ на голову.

Репродуктивно-респіраторний синдром свиней – це висококонтагіозне захворювання свиней, яке проявляється порушеннями репродуктивної функції у свиноматок, а також респіраторними розладами у підсвинків, переважно групи дорощування. Захворювання, викликане цим вірусом, характеризується порушенням функції відтворення у свиноматок, пізніми абортами (90 – 109 день поросності), передчасними опоросами (110 – 112 день), народженням мертвих, муміфікованих і нежиттєздатних порослят у свиноматок; загибеллю новонароджених та ураженням органів дихання у порослят всіх вікових груп.

У 2006 році за результатами моніторингових досліджень в товарних свиногосподарствах на території України 9 з 11 областей, а в 2007 році – 7 з 12 областей зареєстровано як серопозитивні щодо вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней [1]. В Україні діагностичних засобів власного виробництва не розроблено, У той же час, основою протиепізоотичних заходів при PPCC є постійне серологічне контролювання оздоровлюваного свиногоголів'я, зокрема методом ELISA [2].

Мета роботи – провести аналіз біотехнологічних підходів до конструювання тест-систем ELISA, що на сьогодні використовуються для діагностики PPCC та вибрати найбільш доступний за умов мало бюджетного фінансування НДР.

Спочатку, при постановці ІФА, в якості антигену, використовувалась надосадова рідина з клітинами альвеолярних макрофагів заражених вірусом PPCC. Непрямий метод ІФА використовувався для встановлення зв'язування антигену (іммобілізованого в лунках планшету) з антитілом (досліджуваної сироватки). В реакції використовували стандартний кон'югат та субстрат. Облік реакції проводився із розрахунку оптичної щільності контрольної та досліджуваних сироваток.

За останнє десятиріччя, у зв'язку з результатами науково-практичних розробок, технології виробництва ІФА-систем значно змінились. За цей час моноклональні антитіла замінили поліклональні (як у випадку виявлення антигенів, так і при виділенні антитіл, де вони використовуються як кон'югати або для адсорбції антигену). Також досягненням можна вважати те, що в якості компонентів використовуються рекомбінантні антигени, які мають імунохімічні властивості нативних білків [3]. Крім того, зараз використовуються стандартизовані мікропанелі, стабільні реагенти та високочутливі субстратні суміші, а облік результатів реакції автоматизовано.

Для виявлення наявності антитіл до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней в сироватці крові на сьогодні використовуються вдосконалені комерційні набори ІФА: HerdChek PRRS ELISA, HerdChek PRRS 2XR Antibody Test Kit (IDEXX, Westbrook, ME, США), CIVTEST PRRS (HIPRA, Іспанія), INGEZIM PRRS Europa, INGEZIM PRRS America (Ingenasa, Іспанія), в яких використовуються рекомбінантні та/або культуральні антигени двох генотипів збудника PPCC. Найчастіше користуються тест-системою IDEXX виробництва США, яка вважається золотим стандартом.

Результати ELISA при РРСС використовуються для: 1) діагностики захворювання (на різних стадіях), 2) моніторингу розповсюдження інфекції, 3) встановлення імунного статусу, 4) моніторингу проведених заходів, щодо звільнення від хвороби в господарствах. Метод ELISA частіше використовують для отримання кількісного та швидкого результату, але він не є кращим для титрування антитіл в сироватці.

Ряд вчених займався вдосконаленням та розробкою тест-систем ELISA при РРСС. Наприклад, Кукушкін С.А. (Всеросійський НДІ захисту тварин, м. Володимир) у своїй дисертаційній роботі використовував не лише комерційні тест-системи, а й власного виготовлення [4]. Для виділення та культивування вірусу РРСС використовувалися перещеплювана культура клітин MARC-145 та альвеолярні макрофаги свиней (АМС). Матеріалом для виділення вірусу були кров та суспензія з легень; підшелепні, бронхіальні, середостінні лімфатичні вузли; селезінка, а також нирки від хворих поросят. Все це було використано для зараження культури клітин та свиней. Для контролю зараження свиней проводились дослідження в ІФА (на виявлення антитіл) та ПЦР. Автор дослідив технологічні параметри власної тест-системи ELISA на зразках як постінфекційних, так і поствакцинальних сироваток крові. Було встановлено, що для виділення вірусу РРСС найкраще використовувати культуру АМС отриману від заражених поросят з подальшим зараженням нормальної культури макрофагів.

У дисертаційній роботі Гаврилової В.Л. [5] використовували комерційні тест-системи для перевірки специфічності сироваток крові тварин: фірми «IDEXX» (США) та проводили постановку реакції за методикою ФГУ «Федерального центру охорони здоров'я тварин» (Російська Федерація). Для культивування вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней використовувались: альвеолярні макрофаги свині, перещеплювана культура клітин нирки ембріону зеленої мавпи Vero та перещеплювана культура клітин нирки ембріона макаки-резус MA-104 (та її клон MARC-145).

Для отримання специфічних сироваток до вірусу РРСС проводили імунізацію тварин препаратами, що містили антигени вірусу. Контроль активності сироваток проводили зокрема методом ІФА.

Бунькова Н.И. (Всеросійський інститут ветеринарної вірусології та мікробіології, м. Покров) в рамках дисертаційної роботи займалась розробкою методів імуногістохімічного аналізу для виявлення специфічних імуноглобулінів класу М проти збудника РРСС в сироватках крові інфікованих свиней [6]. Цей метод, на відміну від традиційного ELISA, дає можливість досліджувати хворобу на ранній стадії. Автор також зробила висновок, що перещеплювана культура клітин альвеолярних макрофагів свиней (АМС) найбільш придатна для культивування вірусу РРСС. У роботі використовувались проби органів аборт плодів, мертвих поросят та сироватки від свиней різних груп промислових свиного господарств. Для отримання діагностичних антисироваток використовували кролів. З діагностичних препаратів були використані: набір діагностичних препаратів для лабораторної діагностики репродуктивно-респіраторного

синдрому свиней методом гістохімічного варіанту імуоферментного аналізу, діагностичний набір реагентів для виявлення антитіл до вірусу РРСС імуоферментним методом («РРСС-Серотест», НАРВАК), а також антисвинині імуоглобуліни (виробництва ГНУ ВНІПВВІМ). Всі серологічні реакції проводились згідно інструкцій по використанню відповідних наборів.

Богданова В.С. зі співавторами [7] отримала рекомбінантний нуклеокапсидний білок (rN) вірусу РРСС, який був очищений металоафінною хроматографією. Після перевірки якості очистки та імуоспецифічності отриманого білку він був використаний в якості антигену при розробці непрямого варіанту ІФА. Була відмічена висока специфічність та чутливість цієї реакції.

Фірма «НАРВАК» (РФ) в тест-системі ELISA «РРСС-Серотест» і фірма IDEXX (США) в тест-системі IDEXX HerdChek використовують у якості антигену для сенсibilізації планшетів рекомбінантний антиген rN вірусу РРСС, а в якості кон'югату - специфічні антитіла кролів до IgG свиней мічені пероксидазою хрому, хромогеном є тетраметилбензидин (ТМБ).

Посилаючись на дані літератури і враховуючи матеріальні можливості для конструювання тест-системи ELISA-РРСС в наших умовах, за основу ми обрали біотехнологічний підхід використання для сенсibilізації полістиролових планшетів цільновіріонного антигену вірусу РРСС штаму «ВД-08», виділеного з інфікованих альвеолярних макрофагів підсисних поросят. Штам виділено в одному зі свиного господарств на Півдні України (Кримська АР, Бузун А.І., Стегній Б.Т. та ін., 2008). Разом з співавторами з ННЦ «ІЕКВМ» (Бузун А.І., Заремба О.В.) цільновіріонний антиген очищали та концентрували за допомогою хроматографії та преципітації (спосіб патентується). У якості кон'югату були придатні імуопероксидазні антитіла, як виробництва ННЦ «ІЕКВМ» так і Інституту вірусології АМН ім. Івановського (Москва, РФ). Референтними були позитивні (n=3) та негативні сироватки (n=2) з наборів «РРСС-Серотест» (фірма «НАРВАК», РФ) та IDEXX HerdChek (фірма IDEXX, США), а досліджуваними були сироватки свиней (n=47), люб'язно надані обласною державною лабораторією після планового їх скринінгу на РРСС за допомоги тест-системи «РРСС-Серотест». Була встановлена придатність цільновіріонного антигену збудника РРСС, виділеного з АМС для конструювання тест-системи ELISA-РРСС за умов мало бюджетного фінансування НДР (стаття друкується).

Висновки. 1. Для проведення протиепізоотичних заходів проти РРСС в Україні, гостро, постає проблема конструювання вітчизняної тест-системи ELISA, яка б забезпечила доступність проведення масових діагностичних та профілактичних заходів.

2. Встановлено, що з різних методичних підходів, використаних у відомих тест-системах ELISA, оптимальним за умов мало бюджетного фінансування робіт з конструювання вітчизняної тест-системи, є метод приготування вірусного антигену з заражених збудником РРСС штаму «ВД-08» альвеолярних макрофагів свині.

Список літератури

1. Гаврасьева Н.В. Диагностика репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC) [Текст] / Н.В. Гаврасьева // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту: зб. наук. праць. – Б. Церква, год. – Вип. 48. – С. 142 – 144. 2. Хайке Э. Борьба с репродуктивно-респіраторным синдромом свиней [Текст] / Э. Хайке // Новое сельское хозяйство. – 2007. – № 5. – С. 128–131. 3. Алексеев К.П. Получение рекомбинантных нуклеокапсидных белков вируса репродуктивно-респіраторного синдрома свиней (PPCC) и их применение в качестве специфических компонентов диагностической тест-системы для определения антител к вирусу PPCC [Текст] : дис. ... канд. биол. наук / К.П. Алексеев. – М., 2004. – 130 с. 4. Кукушкин С.А. Разработка средств специфической профилактики репродуктивно-респіраторного синдрома свиней [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / С.А. Кукушкин. – М., 2009. – 34 с. 5. Гаврилова В.Л. Выделение и культивирование вируса репродуктивно-респіраторного синдрома свиней для изготовления диагностических и вакцинных препаратов [Текст] : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / В.Л. Гаврилова; [Федер. центр охраны здоровья животных]. – М., 2006. – 27 с. 6. Бунькова Н.И. Совершенствование и оценка средств и методов лабораторной диагностики репродуктивного и респіраторного синдрома свиней [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Н.И. Бунькова. – Покров, 2008. – 28 с. 7. Иммуноферментный метод выявления антител к вирусу репродуктивного и респіраторного синдрома свиней с применением рекомбинантного нуклеокапсидного белка [Текст] / В.С. Богданова [и др.] // Вопр. вирусологии. – 2007. – №2. – С. 43 – 46.

METHODICAL APPROACH TO DESIGN OF ELISA KIT FOR PORCINE REPRODUCTIVE-RESPIRATORY SYNDROME MONITORING

Dorosh J.A.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary
Medicine», Kharkiv

On the base of literary analysis collected optimal scheme of construction with low budget financing of native test-systems ELISA for PRRS monitoring purposes. The protocol of ELISA antigen of PRRS virus purification from alveolar macrophages is selected (isolate «ВД-8») and checked.

УДК: 619 616-07:616.15.49.55

КЛІНІЧНЕ ОБСТЕЖЕННЯ ТА МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СИСТЕМИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ОВЕЦЬ ЗА ОДНОЧАСНОГО ЩЕПЛЕННЯ ПРОТИ НЕКРОБАКТЕРІОЗУ І САЛЬМОНЕЛЬОЗУ ВАКЦИНОЮ «НЕКРОСАЛЬМ»

Жовнір О. М.¹

Інститут ветеринарної медицини НААНУ, м. Київ

Наведено результати клінічного обстеження та морфологічний стан системи периферичної крові овець за щеплення їх вакциною «Некросальм» проти некробактеріозу та сальмонельозу.

Встановлено, що загальний стан овець дослідної групи був в межах норми. У периферичній крові дослідної групи овець відмічено стабільне зростання кількісного вмісту еритроцитів, загальної кількості лейкоцитів, агранулоцитів, позитивну динаміку зростання показників вмісту гемоглобіну.

¹Науковий керівник – доктор вет. наук, професор В.П. Риженко