

УДК: 619:616-076:578.826.1

РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ «НАБІР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ СИНДРОМУ ЗНИЖЕННЯ НЕСУЧОСТІ-76 В РЕАКЦІЯХ ІМУНОДИFUZІЇ ТА ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ»

Ткаченко¹ С.В., Стегній¹ Б.Т., Музика¹ Д.В., Бабкін² М.В., Барсук² А.М.

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків,

²Державний науково-контрольний інститут біології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Проведено розробку тест-системи «Набір для діагностики синдрому зниження несучості-76 в реакціях імунодифузії та затримки гемаглютинації». Виготовлено декілька дослідних серій набору, проведено комісійні дослідження та за їх результатами набір проходить реєстрацію на території України.

Аденовірусні інфекції у курей реєструють в багатьох країнах з розвиненим промисловим птахівництвом та завдають значної економічної шкоди [1; 2; 3; 4; 5].

Сучасна класифікація аденовірусів птиці передбачає їх розділення у чотири роди, з яких представники родів Aviadenovirus та Atadenovirus представляють небезпеку для птахівничих підприємств [6].

Вірус синдрому зниження несучості-76, який відноситься до роду Atadenovirus, викликає зниження продуктивності у курей різних кросів [1; 5; 3; 7], що призводить до значних економічних втрат.

Вищезазначена тенденція до збільшення ролі аденовірусів в інфекційній патології вітчизняного промислового птахівництва була основою для проведення дослідницьких робіт по створенню засобів діагностики синдрому зниження несучості-76.

Необхідність проведення досліджень по створенню тест-системи «Набір для діагностики синдрому зниження несучості-76 в реакціях імунодифузії та затримки гемаглютинації» обумовлена тим, що визначення імунного статусу та проведення епізоотологічного моніторингу потребує високої специфічності, чутливості та стандартності.

Для контролю напруженості імунітету, а також визначення епізоотичної ситуації в світі використовують реакції затримки гемаглютинації (РЗГА), імунодифузії (РІД), та імуноферментний аналіз. Враховуючи відсутність вітчизняної тест-системи для діагностики синдрому зниження несучості-76, нами були розпочаті дослідження щодо створення такого набору.

При розробці набору увагу було приділено наступним питанням: отримання високоактивного антигену вірусу, специфічної імунної сироватки та визначення оптимальної комплектації набору.

Матеріали і методи. Комісійні випробування тест-системи проводили згідно наказу Голови Державного комітету ветеринарної медицини України №96 від 9 серпня 2008 року та методики комісійних виробничих випробувань на базі лабораторії епізоотології хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків) та у вірусологічному відділі Державного

науково-контрольного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (м. Київ). Для проведення міжвідомчих комісійних виробничих випробувань була призначена комісія на чолі з директором Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів Ушкаловим В.О. у складі Бабкіна М.В., Троценко З.Р., Борсук А.М., Клименок О.М., Музика Д.В. та Ткаченко С.В. Випробування проводили за наступними параметрами та наступними методами:

❶ Визначення зовнішнього вигляду, кольору, наявності сторонніх домішок та тріщин флаконів.

Дослідження проводили візуально в пронизуючому світлі.

❷ Визначення герметичності упаковки, наявності вакууму в флаконах.

Дослідження з визначення герметичності упаковки проводили візуально при перевертанні флаконів. Наявність вакууму в флаконах визначали згідно з ГОСТ 28083 за допомогою апарату Д'Арсонваля.

❸ Визначення масової частки вологи.

Дослідження проводили згідно з ГОСТ 24061.

❹ Визначення розчинності.

Дослідження проводили шляхом розчинення вмісту флаконів рідиною для розчинення сухих компонентів набору об'ємом, вказаним на етикетці.

❺ Визначення стерильності.

Дослідження стерильності компонентів набору визначали згідно з ДСТУ 4483.

❻ Визначення повноти інактивації антигену.

Досліджуваний позитивний антиген вводили в алантоїсну порожнину по 0,2 см³ 8-10-ти качиним ембріонам 11-ти добової інкубації. Трьом ембріонам, які використовують як контрольні, вводили аналогічну дозу стерильного фізіологічного розчину. Ембріони інкубували за температури +37,5°C. Кожну добу ембріони овоскопували, відбирали мертві. Смерть ембріонів в першу добу після зараження вважали неспецифічною. Через 5 діб інкубації ембріони охолоджували за температури +4 °С, після чого їх розтинали. Для наступного пасажу використовували об'єднану алантоїсну рідину від 3-5 ембріонів. Нею заражали ембріони 2-го пасажу так саме, як було описано вище. Третій пасаж проводили аналогічно.

❼ Визначення активності та специфічності позитивного та негативного антигенів.

Дослідження активності антигенів проводили в РІД та гемаглютинації (РГА). Постановку реакцій проводили згідно рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ).

Дослідження специфічності проводили в РІД та РЗГА, постановку яких здійснювали згідно вимогам МЕБ.

❽ Визначення активності та специфічності позитивної та негативної сироваток.

Дослідження проводили в РІД та РЗГА, постановку яких здійснювали згідно з вимогами МЕБ.

Результати дослідження. Накопичення вірусу синдрому зниження нечучості-76 ми проводили на качиних ембріонах. У якості позитивного

антигену використовували гомогенат хоріон-алантоїсних оболонок інфікованих ембріонів. Інактивацію інфекційних властивостей вірусу проводили формальдегідом за розробленою нами методикою [7].

За результатами комісійних випробувань були отримані нижченаведені результати.

Усі флакони з набору мали відповідне маркування, на них було зазначено: назву підприємства-виготовлювача, адресу та його товарний знак, найменування тест-системи, назву компоненту, номер серії та контролю, термін зберігання, позначення ТУ. Сторонніх домішок, тріщин флаконів не виявлено.

У флаконах під дією апарату Д'Арсонваль з'являлося фіолетово-синє світіння, яке супроводжувалося характерним потріскуванням.

Масова частка вологи була в межах 2-3%.

Повна розчинність сухих компонентів спостерігалася за 3 хвилини.

При дослідженні виявили, що усі компоненти були стерильними.

Повнота інактивації вірусу характеризувалася відсутністю патологоанатомічних змін і загибелі ембріонів протягом 3-х пасажів, а також відсутністю у алантоїсній рідині гемаглютининів (негативна реакція гемаглютинації з алантоїсною рідиною) на кожному з трьох пасажів.

Результати визначення активності та специфічності позитивного та негативного антигенів наведено в таблицях 1, 2 та 3.

Таблиця 1 – Дослідження активності в РГА та РІД позитивного антигену вірусу синдрому зниження несучості-76

активність в РГА	1:256
активність в РІД	1:64

Таблиця 2 – Дослідження специфічності в РЗГА позитивного та негативного антигенів вірусу синдрому зниження несучості-76

<i>Використані сироватки</i>	<i>позитивний антиген</i>	<i>негативний антиген</i>
1	2	3
сироватка крові коня	0	0
сироватка крові крупної рогатої худоби, нативна	0	0
сироватка крові крупної рогатої худоби, ембріональна	0	0
сироватка крові куриці, позитивна до нью-каслської хвороби	0	0
сироватка крові кроля, позитивна до геморагічної хвороби кролів	0	0
сироватка крові, позитивна до вірусу синдрому зниження несучості-76	1:512	0
сироватка крові курей, позитивна до вірусу грипу А підтипу H5 (VLADIA042-Har-InfH5, референтна, виробництва Голландія)	1:32	0

Продовження таблиці 2

1	2	3
сироватка крові курей, позитивна до вірусу грипу А підтипу H5N3 зі штаму A/duck/It/775/04 (референтна, виробництва Італія)	0	0
сироватка крові курей, позитивна до вірусу грипу А підтипу H5N1 (виробництва ННЦ «ІЕКВМ», Україна)		
сироватка крові курей, позитивна до вірусу грипу А підтипу H7 (VLADIA042-Har-InfH7, референтна, виробництва Голландія)		

Як видно з таблиць 1 та 2, активність позитивного антигену вірусу СЗН-76 в РГА складала $8 \log_2$ (в розведенні 1:256) та $6 \log_2$ в РІД (в розведенні 1:64). Специфічна сироватка до вірусу СЗН-76 специфічно затримувала аглютинацію еритроцитів в розведенні 1:512. Затримка аглютинації також спостерігалась з сироваткою крові курей, позитивною до вірусу грипу А підтипу H5 (VLADIA 042-Har-InfH5, референтна, виробництва Голландія), що могло свідчити про контамінацію позитивного антигену вірусу СЗН-76 вірусом грипу підтипу А. Але це не підтвердилося в наших наступних дослідженнях: затримка аглютинації з позитивною сироваткою до вірусу грипу А підтипу H5N3 зі штаму A/duck/It/775/04 (референтна, виробництва Італія) та сироваткою крові курей, позитивною до вірусу грипу А підтипу H5N1 (виробництва ННЦ «ІЕКВМ», Україна) була відсутньою.

Наступним етапом досліджень була перевірка активності та специфічності позитивної та негативної сироваток. Результати наведені в таблицях 3 та 4.

Таблиця 3 – Дослідження активності та специфічності в РЗГА та РІД позитивної до вірусу синдрому зниження несучості-76 сироватки

<i>Використані антигени</i>	<i>серологічні реакції, в яких проводили визначення</i>	
	<i>РЗГА</i>	<i>РІД</i>
антиген вірусу ньюкаслської хвороби	0	0
антиген вірусу геморагічної хвороби кролів	0	0
антиген вірусу синдрому зниження несучості-76	1:512	1:64

Таблиця 4 – Дослідження активності та специфічності в РЗГА та РІД негативної до вірусу синдрому зниження несучості-76 сироватки

<i>Використані антигени</i>	<i>серологічні реакції, в яких проводили визначення</i>	
	<i>РЗГА</i>	<i>РІД</i>
антиген вірусу ньюкасл-ської хвороби	0	0
антиген вірусу геморагічної хвороби кролів	0	0
антиген вірусу синдрому зниження несучості-76	0	0

Як видно з таблиць 3 та 4, лише позитивна до вірусу СЗН-76 сироватка володіла активністю в РЗГА в кінцевому розведенні 1:16384 та в РІД 1:64.

Таким чином, за результатами проведених комісійних випробувань було встановлено, що компоненти випробовуваної тест-системи повністю відповідають вимогам ТУ У 24.4-00497087-039.

Висновки. 1. Тест-система «Набір для діагностики синдрому зниження несучості-76 в реакціях імунодифузії та затримки гемаглютинації», виробництва ННЦ «ІЕКВМ» за показниками: зовнішній вигляд, колір, наявність сторонніх домішок та тріщин флаконів, герметичність упаковки, наявність вакууму в флаконах, масова частка вологи, розчинність, стерильність, повнота інактивації антигену, активність та специфічність позитивного та негативного антигенів, активність та специфічність позитивної та негативної сироваток повністю відповідає вимогам ТУ У 24.4-00497087-039.

2. Позитивні компоненти тест-системи специфічні та активні, що дозволяє виявити антитіла до вірусу синдрому зниження несучості-76.

3. Тест-система «Набір для діагностики синдрому зниження несучості-76 в реакціях імунодифузії та затримки гемаглютинації», виробництва ННЦ «ІЕКВМ» може бути впроваджена в практику ветеринарної медицини.

Список літератури

1. Baxendale, W. Egg drop syndrome [Text] / W. Baxendale. – Vet Rec. – 1978. – Vol. 102. – P. 285-286.
2. Бакулин, В. А. Патоморфогенез и дифференциальная диагностика болезни Гамборо, аденовирусной инфекции и других иммунодепрессивных болезней птиц [Текст] / В. А. Бакулин. – Архив ветеринарных наук. Т. 1 (48). – С-Пб.: Ломоносов. – 1998. 322 с.
3. Коровин, Р.Н. Аденовирусные инфекции сельскохозяйственной птицы [Текст] / Р.Н. Коровин, И.К. Рождественский; – Л.: Агропромиздат, – 1990. – 31 с.
4. Фомина, Н. В. Аденовирусная инфекция животных [Текст] / Н. В. Фомина. – М.: „Колос“, 1995. – т.2. – 193 с.
5. Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland [Text] / J. B. McFerran [et al.] Family Adenoviridae, Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego – 2000., Calif. 227-238 p.
6. Zanella, A. Egg drop syndrome (EDS-76): ethiopathogenesis, immunology and control of the disease [Text] / A. Zanella, G. Poli, A. Diponato, A. Nigrelli // Clin Vet. – 1987. 103, Vol. 7. – P. 459-469.
7. Ткаченко, С. В. Разработка средств лабораторной диагностики синдрома снижения яйценоскости-76 [Текст] / С.В. Ткаченко, В.В., Герман, А.И. Бузун // Вет. медицина. – 2006. №87. – 364-371.

THE DEVELOPMENT OF TEST-SYSTEM «THE KIT FOR DIAGNOSIS OF EGG DROP SYNDROME-76 IN REACTION OF AGID AND HIT»

Tkachenko¹ S.V., Stegny¹ B.T., Muzyka¹ D.V., Babkin² M.V., Barsuk² A.M.
¹National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

²State Scientific Control Institute of Biotechnology and Microorganism Strains, Kyiv

The development of test-system «The kit for diagnosis of egg drop syndrome-76 in reaction of AGID and HIT» are carried out. Several experimental series of the kit are prepared. Commission investigations are conducted. By their results, the kit registers on the territory of Ukraine.

УДК 616.313:636.2

АНАЛІЗ ПРИЧИН ВИНИКНЕННЯ ВИРАЗКОВОЇ ХВОРОБИ ЯЗИКА У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Ульянко Н.С.

Полтавська державна аграрна академія

Виразкові дефекти язика у бугайців виникають як наслідок порушення годівлі (структура раціону, згодовування кислих кормів), на фоні ослаблення резистентності організму, що є одним із пускових механізмів патології шлунково-кишкового тракту.

У роботі висвітлені поширеність, окремі питання етіології, клінічних та патоморфологічних ознак захворювання.

Завдання досліджень. У числі багатьох захворювань, які властиві усім тваринам, найбільш розповсюджені незаразні хвороби. Як наслідок знижується продуктивність та зростає загибель тварин. Відомо, що від незаразної патології господарства зазнають значно більшого збитку, ніж від інших захворювань [3]. Особливі труднощі виникають взимку, тому що у раціоні переважають недоброякісні грубі корми, які важко піддаються первинній обробці у ротовій порожнині. Це призводить до травмування слизової оболонки рота, у тому числі й язика. Як наслідок, розвивається виразкова хвороба язика, яка ще більш ускладнює перебіг патологічного процесу і сприяє розвитку різноманітних ускладнень (абомазит, ентерит, гепатити тощо) [6, 7].

Серед незаразних хвороб тварин нашу увагу привернула виразкова хвороба язика у великої рогатої худоби. Це захворювання є досить розповсюдженим в Україні. Не дивлячись на це, в науковій літературі немає достатнього пояснення етіології даної патології, що створює значні труднощі у виборі науково-обґрунтованих мір з профілактики.

У той саме час відмічено, що продуктивність у великої рогатої худоби з виразкою язика знижується порівняно з клінічно здоровими тваринами у тих саме господарствах [7]. Причини, які лежать в їхній основі досі маловідомі.