

УДК 619:578.831.1:615.373

РЕАКЦІЯ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ

Драгуть С.С., Стегній Б.Т., Стегній А.Б.

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

Згідно з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) для проведення діагностичних та моніторингових серологічних досліджень птиці щодо інфекційних хвороб наразі використовують імуноферментний аналіз (ІФА) або реакцію затримки гемаглютинації (РЗГА). Але у ряду збудників, що адсорбуються на еритроцитах, відсутні гемаглютинуючі властивості. У цьому разі гемаглютинація настає лише при змішуванні попередньо «навантажених» вірусом (антигеном) еритроцитів зі специфічною до нього сироваткою.

Даний метод гемаглютинації відомий як реакція непрямой гемаглютинації (РНГА). Уперше цю реакцію розробили А.К. Кравченко та М.І. Соколов (1945 р.) для виявлення антигенів бактерій. РНГА з вірусними антигенами у 1946 р. описали Берет і Андерсен. Подальший розвиток метод отримав після праць Бойдена (1951 р.), який запропонував використовувати еритроцити, оброблені таніном. Суть РНГА полягає в адсорбції вірусних антигенів на поверхні еритроцитів та подальшої їх аглютинації гомологічними до антигену антитілами. Ця реакція специфічна і навіть чутливіша за інші серологічні тести. Її використовують при бактеріальних та вірусних захворюваннях як у гуманній, так і у ветеринарній медицині.

Відомо, що більшість специфічних антитіл відносяться до класів Ig G та Ig M, які синтезуються у різний час інфекційного процесу. При цьому Ig M антитіла відносять до «ранніх», і тести, що використовують для їх виявлення, застосовують для ранньої діагностики. Антитіла класу Ig G синтезуються пізніше та зберігаються довше. З імунологічних методів при багатьох інфекційних хворобах найбільш чутливі та інформативні щодо виявлення (відповідно, визначення) вірусспецифічних антитіл (Ig M та Ig G) у сироватках крові вважають РНГА та ІФА.

Чутливість імуноферментного методу перевищує чутливість методу флюоресцюючих антитіл, РНГА та реакції зв'язування комплементу у 15, 40 та 1600 разів відповідно. За імуноферментного методу можуть визначитися антитіла, якщо їх концентрація становить лише 10^{-10} г/л [1]. Проте цей метод потребує використання спеціального обладнання та програми, коштовних матеріалів (або комерційних наборів) та відповідну підготовку виконавців.

Спроможність методу РНГА, який знаходиться на рівні з реакцією нейтралізації, становить 0,02 мкг антитіл [2]. Тобто, метод РНГА високочутливий, простий у виконанні, облік реакції проводиться візуально.

Матеріали і методи. Проведення реакції передбачає використання еритроцитарного антигену (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»), який являє собою 10 % суспензію танізованих еритроцитів баранів у гліцеринізованому (0,5 %) фізіологічному розчині, на яких адсорбований вірус ньюкаслської хвороби (НХ). В процесі зберігання препарат утворює дві фракції: осад (еритроцити) і прозору надосадову рідину (гліцеринізований фізіологічний розчин, ГФР).

Постановку РНГА здійснювали в V- та U- образних 96-лунокових планшетах для імунологічних реакцій у загальному об'ємі 0,05 см³. Готували дворазові розведення дослідних сироваток. Для цього в усі лунки горизонтальних рядів вносили по 0,025 см³ ГФР (рН 7,3±0,1). У перші лунки рядів в такому самому об'ємі додавали дослідні зразки сироваток крові, які з метою видалення термолабільних інгібіторів попередньо обробляли прогріванням у бані водяній за температури 57°C протягом 30 хвилин з подальшим одноразовим заморожуванням, а також позитивну, що містила вірусспецифічні антитіла до вірусу НХ (позитивний контроль), та негативну (безантитільну) сироватки крові. Початкове розведення сироваток 1:2. Далі їх розтитровували, видаляючи з останньої лунки 0,025 см³. В усі лунки планшетів у рівному об'ємі додавали антиген у робочому розведенні (1,5 см³ нативного еритроцитарного антигену після збовтування до отримання гомогенної суспензії розводили у 8,5 см³ ГФР). Для контролю антигену на відсутність спонтанної аглютинації у лунки планшетів (не менше, ніж по 4) вносили ГФР у об'ємі 0,025 см³ та рівний об'єм антигену в робочому розведенні. Планшети витримували за температури (22±2)°C протягом (40-60) хвилин.

Облік реакції проводили після осідання еритроцитів на дно лунок у вигляді гудзика (крапки) у контролі антигену.

За титр вважали останнє розведення сироваток, де спостерігали гемаглютинацію, тобто осідання еритроцитів на дно лунок у вигляді парасольки з рівними або зубчастими краями.

При негативній реакції еритроцити осідали на дно лунок у вигляді гудзика (крапки). Титр негативної сироватки не перевищував 1:2.

Діагностичний титр 1:8 (3 log₂).

Для реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) в якості антигену використовували стерильну інактивовану вірусутримуючу екстраембріональну рідину курячих ембріонів, інфікованих вірусом НХ, штаму Ла-Сота, з інфекційністю та гемаглютинуючою активністю в реакції гемаглютинації (РГА) відповідно 8 lg EID_{50/см³} та 9 log₂. РГА та РЗГА проводили згідно вимог МЕБ.

У дослідженнях імуноферментним методом використовували комерційну тест-систему для виявлення специфічних антитіл до вірусу НХ виробництва ФДУ ВНДІЗТ (Росія).

Імунізацію птиці (півнів та індиків), сироватки яких досліджували в РНГА, РЗГА та ІФА, проводили за різних схем імунізації [3].

Результати досліджень. У ННЦ «ІЕКВМ» була розроблена технологія виготовлення еритроцитарних антигенів для діагностики реовірусної інфекції (ТУУ 10.07.09-90), інфекційної бурсальної хвороби (хвороби Гамборо) (ТУУ 46.15.232-97), аденовірусної інфекції першого серотипу (ТУУ 46.15.234-97) та інфекційного ларинготрахеїту (ТУУ 46.15.231-97), чинні настанови щодо застосування яких передбачають постановку реакції макро- або мікрометодом у об'ємі кожного з компонентів 0,2 (0,05) см³.

Для виявлення вірусспецифічних антитіл щодо НХ у птиці, імунізованої в період ембріонального розвитку, а також для вивчення імунної відповіді, зокрема формування материнського імунітету та в якості непрямий методу вірусологічного діагностичного дослідження нами відпрацьований мікрометод РНГА у об'ємі реагентів по 0,025 см³, який відрізняється від раніше затверджених методик меншими затратами на реактиви та зменшенням до мінімуму необхідної для дослідження кількості дослідних сироваток.

Далі викладені приклади використання РНГА для виявлення у птиці вірусспецифічних антитіл до збудника НХ.

Приклад 1.

У таблиці 1 наведені результати виявлення трансваріальних антитіл щодо вірусу НХ в сироватках крові молодняка птиці з птахогосподарства «Мирний» Луганської області від батьківського стада, вакцинованого проти даного захворювання.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

Таблиця 1 – Вивчення рівня напруженості імунітету НХ у молодняка птиці в РНГА

Кількість проб сироваток	Вік птиці (днів)	Середній титр, log ₂	Рівень напруженості імунітету, %
20	1	4,45 ± 0,3	95
19	11	1,42 ± 0,21	21
20	19	0	0

У 95 % добового молодняка, одержаного від вакцинованої птиці, виявляли материнські антитіла до вірусу ХН (на рівні 4,45±0,3 log₂). Далі цей показник серопозитивності до збудника НХ закономірно знижувався до 21 % у 11-добових курчат, а у птиці 19-добового віку вірусспецифічні антитіла були відсутні.

Приклад 2.

У таблицях 2-3 й 5 надані результати вивчення активності імунних сироваток крові дорослої птиці в РНГА, РЗГА та ІФА у порівняльному аспекті.

Таблиця 2 – Динаміка титрів вірусспецифічних антитіл у сироватках крові півнів при імунізації

Серологічні тести	Середній титр вірусспецифічних антитіл через днів		
	до імунізації	18 від початку імунізації	7 після другого введення антигену
РЗГА (log ₂)	5,00 ± 0,29	9,14 ± 0,29	10,78 ± 0,44
РНГА (log ₂)	1,67 ± 0,50	2,29 ± 1,00	3,88 ± 0,75
ІФА (титр)	1200 ± 88	12687 ± 284	15259 ± 340

Таблиця 3 – Динаміка титрів вірусспецифічних антитіл у сироватках крові індиків при імунізації

Серологічні тести	Середній титр вірусспецифічних антитіл через днів			
	до імунізації	7 після першого введення антигену	18 після другої інюляції антигену	7 після третього введення антигену
РЗГА (log ₂)	2,00 ± 0,67	9,33 ± 1,00	11,00 ± 0,67	11,33 ± 0,33
РНГА (log ₂)	1,00 ± 0,33	1,33 ± 0,67	2,50 ± 0,33	3,00 ± 0,67
ІФА (титр)	792 ± 25	3633 ± 145	5662 ± 176	7913 ± 224

Наведені дані свідчать про поступове наростання титру вірусспецифічних антитіл в сироватках крові птиці з кожним наступним циклом введення антигену. Динаміка антигемаглютининів (в РЗГА) та антитіл, специфічних до вірусу ХН (в ІФА та РНГА), схожа. При цьому при статистичній обробці отриманих результатів встановлений кореляційний зв'язок між середніми значеннями титрів специфічних до вірусу ХН антитіл в сироватках крові птиці в процесі імунізації, визначених в реакціях РЗГА, РНГА та ІФА (табл. 4).

Таблиця 4 – Кореляційний зв'язок між рівнем вірусспецифічних антитіл, визначених в РНГА, РЗГА та ІФА

Серологічні реакції	Коефіцієнт кореляції між рівнем антитіл (r)	
	Півні	Індики
РЗГА та РНГА	0,900	0,828
ІФА та РЗГА	0,995	0,910
ІФА та РНГА	0,853	0,964

Наведені дані вказують на наявність високого рівня кореляції за коефіцієнтом *r* між рівнем вірусспецифічних антитіл при їх виявленні в зазначених реакціях.

За вивчення активності одержаних імунних сироваток встановили, що середні титри антитіл в сироватках індиків дорівнювали (11,33±0,33) log₂ в РЗГА, (3,00±0,67) log₂ в РНГА, (7913±224) в ІФА; в сироватках півнів – відповідно (10,78±0,44) і (3,88±0,75) log₂ та (15259±340).

Результати визначення активності імунних щодо НХ сироваток крові птиці в серологічних реакціях (в Іg) представлені в таблиці 5.

Таблиця 5 – Визначення активності імунних щодо НХ сироваток крові птиці в серологічних реакціях

Вид птиці	Середній титр антитіл в реакціях, Іg		
	РЗГА	РНГА	ІФА
Індики	3,41 ± 0,10	0,9 ± 0,20	12,79 ± 2,35
Півні	3,25 ± 0,13	1,17 ± 0,23	24,67 ± 2,55

Середній титр антитіл проти гемаглютининів вірусу ХН в РЗГА в сироватках півнів нижчий, ніж в сироватках індиків – (3,25±0,13) проти (3,41±0,10) Іg. Рівень віруснейтралізуючих антитіл за РНГА, навпаки, підвищений і становить (1,17±0,23) Іg у півнів та (0,9±0,20) Іg у індиків. В ІФА середній титр вірусспецифічних антитіл у півнів також значно відрізняється порівняно з індіками, а саме підвищений майже у 2 рази. Відмінність цих значень обумовлена застосуванням різних схем імунізації птиці.

Висновки. Високочутлива й проста у виконанні РНГА не входить до методів, які рекомендує МЕБ для проведення серологічних досліджень щодо НХ, але її використання при контролюванні пасивної та активної імунізації птиці, а також в якості

серологічного діагностичного методу поряд з ІФА та РЗГА є доцільним. В V-образних планшетах у порівнянні з круглодонними планшетами реакція виразніша та більш чітка, відповідно, забезпечує точніший візуально облікований результат.

Список літератури

1. Сюрин, В.Н., Белоусова, Р.В., Фомина, Н.В. Ветеринарная вирусология. – М.: Колос, 1984. – 376 с. 2. Дяченко, Н.С. Пассивная гемагглютинация и ее применение в вирусологии. – К.: Наукова думка, 1979. – 147 с. 3. Вивчення динаміки рівня антитіл при гіперімунізації птиці та кролів вірусом хвороби Ньюкасла / С.С. Драгуть, М.Ю. Стегній, В.О. Бреславець. А.Б. Стегній // Вісник аграрних наук. – 2008, № 8. – С. 63-66.

INDIRECT HEMAGGLUTINATION TEST FOR NEWCASTLE DISEASE DIAGNOSTICS

Dragut S.S., Stegnyy B.T., Stegnyy A.B.

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

Method of indirect hemagglutination test for Newcastle disease diagnostics is presented in the paper. Examples of its application in comparison with hemagglutination inhibition test and indirect method of immune-enzyme analysis are given in the article.

УДК 619:616.98:578.825.1:616-085.371

НЕСПРИЯТЛИВІ ЧИННИКИ ВАКЦИНОПРОФІЛАКТИКИ ХВОРОБИ МАРЕКА

Заремба О.В., Стегній Б.Т., Ткаченко С.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Мета. При впровадженні розробленої вакцини бівалентної культуральної проти хвороби Марека (ХМ) в птахогосподарстві, в якому і раніше впродовж 4 років застосовували дану вакцину, ми виявили раніше невідомий несприятливий чинник вакцинопрофілактики ХМ. Його аналіз і став метою нашої роботи.

Факторами, що збільшують ризики виникнення загибелі від вірусних захворювань вакцинованого птахопоголів'я можуть бути невідповідні умови утримання птиці, а також чинники, пов'язані з фізіологічним станом організму, якістю вакцини й умовами її застосування та зберігання. Велике значення в одержанні ефективної вакцинації мають санітарно-гігієнічні умови середовища, в яких утримується птиця, особливо в перші тижні життя [7, 8, 11].

Для одержання оптимального ефекту від вакцинації проти хвороби Марека (ХМ) враховують значно більшу кількість факторів, ніж перераховано, у зв'язку з недостатніми знаннями механізму імунітету при цій хворобі. У зниженні імунної реактивності певну роль відіграють постійно діючі стрес-фактори, число яких зростає в процесі інтенсифікації галузі [5, 6, 9].

Було доведено, що, крім якості вакцини, способу використання та ін., ефективність препарату залежить від інтервалу між його застосуванням і часом інфікування польовим вірусом щепленої птиці. Оскільки від моменту вакцинації до формування в організмі птиці надійного захисту проходить декілька діб, раннє зараження польовим вірусом призводить до важкої форми ХМ. Хоча вакцинація сприяє зменшенню захворюваності та смертності від ХМ, кількість інфікованого птахопоголів'я залишається значною. Більшість груп піддаються інфікуванню польовим вірусом на першому тижні життя, оскільки збудник захворювання постійно присутній у приміщенні [1, 2, 3, 4].

У той же час позитивні ефекти від вакцинації проти ХМ не слід переоцінювати. За її допомогою важко повністю оздоровити господарство, оскільки збудник з різним рівнем патогенності міститься в об'єктах довкілля, де добре зберігається, незважаючи на несприятливі умови [10].

Треба також враховувати сероваріантну належність вірусного фону при ХМ у птахогосподарствах збудника, що нерідко робить застосування імпортованих препаратів із різних комбінацій серотипів ВХМ необґрунтованим та неефективним, сприяючи лише додатковому інфікуванню птахопоголів'я новими серотипами ВХМ.

Матеріали і методи досліджень. Вакцина бівалентна культуральна ТУ У 24.4-00497087-015:2005 від 08.11.05 р., реєстраційне посвідчення №1314-04-0188-05 від 18 жовтня 2005 р. виробництва ННЦ «ІЕКВМ» готувалась згідно інструкції з виготовлення даного біопрепарату.

Отриману вакцину сировину двох виробничих штамів у клітинноз'язаному стані зберігали в замороженому стані за температури мінус 196°C у криогенних посудинах.

Для щеплення однодобових курчат було застосовано живу бівалентну культуральну вакцину проти хвороби Марека із вірусу герпесу курей другого серотипу, штам SBG (виготовлений 17.04.08), та вірусу герпесу индиків, штам FC-126 (виготовлений 11.02.08), суміш штамів готували безпосередньо перед застосуванням. Для цього ампули з вмістом виробничих штамів відтаювали на водяній бані за температури 36-38°C, розчиняли у флаконі з розчинником на вакцину, з розрахунку, щоб в 0,2 см³ об'ємної дози містилось по 1000 ФУО кожного виробничого штаму (SBG і FC-126). Вакцину вводили одноразово внутрішньом'язово, у внутрішню поверхню стегна. Було введено вакцину бівалентну культуральну проти хвороби Марека виробництва ННЦ «ІЕКВМ» однодобовим курчатом в інкубаторії птахогосподарства. Щеплення проводилось ін'єктором ІП-1 (напівавтоматичним). Для вакцинації використано 140 тисяч доз вакцини. Залишки доз вакцини та інструментарій були знезаражені кип'ятінням впродовж 30 хвилин.

З 2005 року вакциною бівалентною культуральною проти хвороби Марека у різних товарних птахогосподарствах було щеплено 345 тисяч курчат однодобового віку. Випадків захворювання серед щепленого птахопоголів'я не встановлено, що підтверджувало нешкідливість розробленого нами засобу специфічної профілактики хвороби Марека та високу імунотенну активність запропонованої вакцини.

У дослідженні з визначення напруженості імунітету до аденовірусної інфекції курей, який проведено в лабораторії вивчення вірусних хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ», використовували сироватку крові від птиці віком – 293 (група 1), 277 (група 2), 275 (група 3), 266 (група 4), 285 (група 5) діб по 10 проб від кожної групи. Повторне дослідження проводили через 28 діб. Наявність антитіл у сироватках крові до аденовірусної інфекції курей четвертого серотипу визначали в імуноферментному аналізі за допомогою тест-системи, виробництва ФДЗ ВНДІЗТ, до аденовірусної інфекції першого серотипу – в реакції імунодифузії (РІД). Постановку реакцій здійснювали згідно з методиками виробника зареєстрованих діагностиків.

Для проведення вірусологічних досліджень, з дотриманням умов стерильності, окремо від кожної курки відібрані імунокомпетентні внутрішні органи (селезінку, залозистий шлунок, серце, печінку).

Патологічний матеріал був відібраний від трупів птиці з метою перевірки на наявність у генетичному матеріалі вірусів птиці за допомогою ПЛР та виділення, за наявності, вірусу ХМ на культурі клітин.