

УДК 619:578.826.1:636.5

ВИПРОБУВАННЯ ТА АПРОБАЦІЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ «НАБІР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ АвіаДЕНОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ КУРЕЙ ПЕРШОГО СЕРОТИПУ В РЕАКЦІЇ ІМУНОДИФУЗІЇ»

Стегній Б.Т., Ткаченко С.В., Музика Д.В.

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

Борсук А.М.

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

Аденовіруси – група вірусів, які уражають людину, тварин багатьох видів, в тому числі і птахів.

Зараз у промисловому птахівництві аденовірусна інфекція набула особливого значення, що пов'язано з рядом причин. По-перше, у курей вони викликають гепатит з тільцями-включеннями, у індиків – геморагічний ентерит, у фазанів – вірусний гепатит та мармурову хворобу селезінки, у перепелів – бронхіт. По-друге, аденовіруси дуже часто виступають у ролі вторинного фактору при інших інфекційних захворюваннях [5], особливо при інфекційному бронхіті, мікоплазмозі та інших хворобах дихальної системи. По-третє, аденовіруси негативно впливають на несучість та якість яєць. Також вони заважають у використанні ембріонів для репродукції інших вірусів, що пов'язано з вертикальною передачею аденовірусів. Аденовіруси дуже широко розповсюджені в США, Канаді, Німеччині, Швеції, Франції, Угорщині, Італії, Югославії, Чехії, Північній Ірландії, Південній Ірландії, Японії, Кореї, Індії, Єгипті, Австралії, Англії.[1, 2, 3]

Зараз у роді *Aviadenovirus* розрізняють 2 групи аденовірусів птахів. До першої групи входять 12 серотипів аденовірусів курей та іншої птиці, які мають загальний групспецифічний преципітуючий антиген. До другої групи віднесені віруси геморагічного ентериту індичок, хвороби мармурової селезінки курей та фазанів із групспецифічним антигеном, який відрізняється від таких першої групи.[4, 1, 2]

Серологічні дослідження показали, що CELO-інфекція може бути у індиків, фазанів, дроздів, лебедів, папуг, качок та інших видів диких птахів, але основний хазяїн – кури. Вірус CELO, ізольований від фазанів, був ускладнюючим фактором при виникненні респіраторної хвороби серед цих птахів. Також вірус CELO ізольовано від цесарок з проявами панкреатиту.

Таким чином, проблема аденовірусної інфекції курей є актуальним питанням, що потребує значної уваги. Тому за мету нашої роботи було поставлено провести комісійні випробування та апробацію розробленої нами тест-системи для діагностики аденовірусної інфекції курей.

Матеріали і методи. Комісійні випробування тест-системи проводили згідно наказу Голови Державного комітету ветеринарної медицини України №97 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 Державного науково-контрольного інституту біології і штамів мікроорганізмів (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., Борсука А.М., Клименок О.М., Музика Д.В. та Ткаченко С.В. Випробування проводили за наступними параметрами та наступними методами:

1. Визначення зовнішнього вигляду, кольору, наявності сторонніх домішок та тріщин флаконів.
Дослідження проводили візуально в пронизуючому світлі.
2. 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.
3. Визначення масової частки вологи.
Дослідження проводили згідно з ГОСТ 24061.
4. Визначення розчинності.
Дослідження проводили шляхом розчинення вмісту флаконів рідиною для розчинення сухих компонентів набору об'ємом, вказаним на етикетці.
5. Визначення стерильності.
Дослідження стерильності компонентів набору визначали згідно з ДСТУ 4483.
6. Визначення повноти інактивації антигену.
Досліджуваний позитивний антиген вводили в алантоїсну порожнину по 0,2 см³ 8-10-ти курячим ембріонам 9-10-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°C, 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.
7. Визначення активності та специфічності позитивного та негативного антигенів.
Дослідження активності антигенів проводили в реакції імунодифузії (РІД). Постановку реакцій проводили згідно рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ).
8. Визначення специфічності проводили в РІД, постановку здійснювали згідно вимогам МЕБ.
9. Визначення активності та специфічності позитивної та негативної сироваток.
Дослідження проводили в РІД, постановку яких здійснювали згідно з вимогами МЕБ.

Результати дослідження. Накопичення авіадеповірусу проводили на курячих ембріонах. У якості позитивного антигену використовували хоріон-алантоїсну рідину, відібрану від інфікованих ембріонів. Інактивацію інфекційних властивостей вірусу проводили формальдегідом за розробленою нами методикою.

При проведенні 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, що відповідає ТУ У.

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

Масова частка вологи була в межах 2-3 %.

Повна розчинність сухих компонентів спостерігалася за 3 хвилини.

При дослідженні виявили, що усі компоненти були стерильними.

При перевірці повноти інактивації вірусу було відмічено відсутність патологоанатомічних змін і загибелі ембріонів протягом 3-х пасажів, а також відсутність у алантоїсній рідині преципітинів (негативна реакція імунодифузії з позитивною сироваткою) 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 та специфічності в РІД позитивного та негативного антигенів авіаденовірусу курей першого серотипу

<i>Використані сироватки</i>	<i>позитивний антиген виробництва ННЦ «ІЕКВМ»</i>	<i>негативний антиген виробництва ННЦ «ІЕКВМ»</i>
Референтна сироватка крові, позитивна до інфекційної бурсальної хвороби (виробництво GD R&D Diagnostics, Нідерланди)	0	0
Референтна сироватка крові, позитивна до авіаденовірусної інфекції курей першого серотипу (виробництва GD R&D Diagnostics, Нідерланди)	1:2	0
Сироватка крові курей, позитивна до вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва Дніпропетровської біофабрики)	0	0
Сироватка крові курей, позитивна до авіаденовірусу курей першого серотипу (виробництва ННЦ «ІЕКВМ»)	1:16	0
Сироватка крові курей, негативна до авіаденовірусу курей першого серотипу (виробництва ННЦ «ІЕКВМ»)	0	0

Як видно з таблиці 1, активність позитивного антигену авіаденовірусу курей першого серотипу склала 1:16 (4 log₂). Реакція з референтною сироваткою до авіаденовірусу курей характеризувалася наявністю смуг преципітацій в розведенні 1:2 (1 log₂). З позитивними сироватками до інфекційної бурсальної хвороби та ньюкаслської хвороби, а також з негативною сироваткою до авіаденовірусної інфекції курей реакція була негативною. Також не відмічали наявності специфічних ліній преципітації між негативним антигеном та досліджуваними сироватками.

Наступним етапом досліджень була перевірка активності та специфічності позитивної та негативної сироваток. Результати наведені в таблицях 2 та 3.

Таблиця 2 – Дослідження активності та специфічності в РІД позитивної до авіаденовірусу курей першого серотипу сироватки

<i>Використані антигени</i>	<i>Активність позитивної сироватки з набору в РІД</i>
Антиген позитивний вірусу ньюкаслської хвороби	0
Антиген позитивний авіаденовірусної інфекції курей	1:16

Таблиця 3 – Дослідження активності та специфічності в РІД негативної до авіаденовірусу курей першого серотипу сироватки

<i>Використані антигени</i>	<i>Активність негативної сироватки з набору в РІД</i>
Антиген позитивний вірусу ньюкаслської хвороби	0
Антиген позитивний авіаденовірусу курей першого серотипу	0

Як видно з таблиць 2 та 3, лише позитивна до аденовірусу сироватка володіла активністю в РІД в кінцевому розведенні 1:16.

Апробацію тест-системи проводили шляхом дослідження сироваток крові з різних регіонів України за допомогою компонентів набору згідно з інструкцією до набору.

Таблиця 4 – Кількість позитивних сироваток при проведенні дослідженні в реакції імунодифузії

<i>Регіон, з якого надійшли проби сироваток</i>	<i>Кількість позитивних сироваток, %</i>
Хмельницька область	8
Луганська область	20
АР Крим	76
АР Крим	34
Київська область	27

У двох випадках (АР Крим) циркуляцію в птахогосподарстві аденовірусу підтверджено проведенням полімеразно-ланцюгової реакції та виявленням геному аденовірусу.

Таким чином, за результатами проведених комісійних випробувань було встановлено, що компоненти випробовуваної тест-системи повністю відповідають вимогам ТУ У 24.4-00497087-038.

Висновки:

1. Співробітниками ННЦ «ІЕКВМ» розроблено технологію виготовлення тест-системи «Набір для діагностики авіаденовірусної інфекції курей першого серотипу в реакції імунодифузії».

2. Тест-система «Набір для діагностики авіаденовірусної інфекції курей першого серотипу в реакції імунодифузії», 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, актив-

ність та специфічність позитивного та негативного антигенів, активність та специфічність позитивної та негативної сироваток повністю відповідає вимогами ТУ У 24.4-00497087-038.

3. Позитивні компоненти тест-системи специфічні та активні, що дозволяє виявляти антитіла до авіаденовірусу курей першого серотипу.

Список літератури

1. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных. / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина // Москва, ВНИТИБП, С. 928.
2. Коровин, Р.Н. Аденовирусные инфекции сельскохозяйственной птицы. / Р.Н. Коровин, И.К. Рождественский // Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1990. – С. 79.
3. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия / Н.В. Кожемяка, Ф.С. Кудрявцев, Г.А. Грошева // М.: Колос, 1982. – 303 с.
4. Бакулин, В.А. Патоморфогенез и дифференциальная диагностика болезни Гамборо, аденовирусной инфекции и других иммунодепрессивных болезней птиц. / В.А. Бакулин // (приложение к т. 1(48) «Архив ветеринарных наук»), Санкт-Петербург, Ломоносов, 1998, С. 322.
5. Dottori, M. Su alcuni episodi di adenovirosi in piccioni viaggiatori / M. Dottori, D. Gelmetti; A. Lavazza; S. Perini; C. Gambetti // Selez.veter., 1999. N 8/9, – P. 647-651

The development of test-system «The kit for diagnosis FOWL ADENOVIRUS INFECTION 1 SEROTYPE IN AGID»

Stegniy B.T., Tkachenko S.V., Muzyka D.V.

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

Borsuk A.M.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Microorganism Strains, Kyiv

The development of test-system «The kit for diagnosis of fowl adenovirus 1 serotype in reaction of AGID» 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 57.043;578.71

ЗНАЧЕНИЕ НАРУШЕНИЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ЦЕЛОСТНОСТИ ВИРУСОВ В МЕХАНИЗМЕ ИХ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ

Стегний М.Ю.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Важной задачей для понимания механизмов криоповреждения вирусов является выявление значения в этих процессах нарушения их ультраструктуры. Применение современных электронно-микроскопических методов позволяет оценить структурные нарушения морфологии вирионов, которые могут быть вызваны тем или другим фактором внешней среды [2]. Перестройки и повреждения ДНК или РНК вирусов могут быть причиной перерождения биологического материала с дальнейшей сменой его свойств. Одним из наиболее информативных методов выявления этих нарушений является электронно-микроскопический. Целью наших исследований было: оценить роль нарушений структурной целостности вирионов, в частности, вирусных оболочек и нуклеокапсида в механизме криоповреждений вирусов инфекционного бронхита кур (ИБК). Вирус ИБК относится к семейству коронавирусов рода коронавирус, обладает тропностью к эпителиальным клеткам дыхательных путей почек и репродуктивных органов цыплят и кур [3, 5]. Впервые этот вирус был выделен в США в 1936 году. Занимает важное место в инфекционной патологии птицы не только по причине потери поголовья в процессе острой вирусной инфекции, но и за счет снижения яйценоскости кур репродуктивного возраста [4].

Материал и методы исследований. Изучение ультраструктуры проводили методом негативного контрастирования препаратов вируса инфекционного бронхита кур (штамма Массачусетс), полученного из коллекции вирусов отдела изучения болезней птиц ННЦ «ИЭКВМ». Для выявления структурных изменений, вызванных замораживанием-оттаиванием применяли электронно-микроскопические методы исследований. Электронно-микроскопическим исследованиям подвергали размороженные образцы, которые замораживали и хранили криоконсервированными на протяжении от трех суток до 8 с лишним лет в условиях умеренно-низкой (-20°C), низкой (-70°C) и температуры жидкого азота (-196°C). Размораживание осуществляли медленно или в течение 1-2 минут на водяной бане при температуре 38-39°C. Для проведения электронно-микроскопических исследований методом негативного контрастирования были использованы медные сетчатые платформы, которые покрывали формваровой пленкой. Адсорбция вирусных частиц, предварительно очищенных в градиенте плотности сахарозы [1], на пленки-подложки проводилась в течение 3-5 минут. Контрастирование полученных вирусных препаратов осуществляли с помощью фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК) по общепринятой методике. Исследования были проведены на электронном микроскопе ПЭМ-125 с инструментальным увеличением 60-100 тысяч раз.

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопические исследования показали наличие большого количества округлых, эллиптических и полиморфных вирионов размером 90-160 нм в образцах, которые хранились от трех суток до трех с половиной месяцев при температурах минус 20°C и минус 70°C. При этом ультраструктура вирионов была представлена двуслойной липопротеидной оболочкой с булавовидными отростками размером до 20 нм, которые образуют подобие солнечной короны и нуклеокапсидом, составлявшим от 80 нм в диаметре (рис.1). Наличие вирусных частиц с поврежденной липопротеидной оболочкой составляло приблизительно 5-7 % от всего количества имевшихся вирионов.

Анализ электронограмм вирусов, которые хранились на протяжении 6 лет в вышеуказанных условиях, показал наличие полиморфных вирионов с хорошо представленной двуслойной липопротеидной оболочкой, но гликопротеидные отростки, которые формируют подобие солнечной короны, практически отсутствовали (рис.2). Встречались лишь единичные вирионы с сохранившейся короной из гликопротеинов, содержащих гемагглютининэстеразный протеин (HE). Следует отметить также возрастающее число (около 40 % от общего количества вирионов) позитивно контрастированных капсидов вирусных частиц в результате длительного, в течение 6 лет, хранения вирусных суспензий в условиях умеренно-низкой температуры (-20°C). В