

УДК 619:616-07-097:616.98:579.843.95:636.5(477)

РОЗРОБКА ТА АПРОБАЦІЯ В УКРАЇНІ «НАБОРУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ (ХОЛЕРИ) ПТИЦІ В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ (РНГА)»

Плис В.М., Колбасіна Т.В.

Державна установа Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України, м. Дніпропетровськ, e-mail: dneprkvm@mail.ru

Стегній Б.Т., Обуховська О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Ушкалов В.О., Блоцька О.Ф., Виговська Л.М.

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

Короленко Л.С.

Головне управління ветеринарної медицини в Дніпропетровській області, м. Дніпропетровськ

Вовк С.І.

ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», м. Харків

У статті показано результати розробки та апробації «Набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації» і визначено його діагностичну і практичну цінність. Установлено, що компоненти набору відповідають нормам і вимогам ТУ У 24.4-00497087-0092:2009. Антиген антитільний еритроцитарний бактерії пастерельозу (холери) птиці та позитивна сироватка крові є активними і специфічними в РНГА, про що свідчать результати міжвідомчих комісійних випробувань. Розроблений, апробований і зареєстрований в установленому порядку «Набір...» може бути використаний з діагностичною метою в лабораторіях ветеринарної медицини різної відомчої приналежності.

Ключові слова: пастерельоз (холера) птиці, набір для діагностики пастерельозу (холери) птиці, реакція непрямой гемаглютинації, антиген, сироватки крові птиці, активність, специфічність.

Пастерельоз (холера, геморагічна септицемія) птиці – інфекційна хвороба, що уражує сільськогосподарську птицю всіх видів, диких перелітних і синантропних птахів, а також свійських і диких тварин, характеризується септицемією, геморагічним діатезом за зверхгострого та гострого перебігу [1, 2, 5]. Люди також хворіють на пастерельоз [1, 4, 5]. Назву хвороба отримала на честь Луї Пастера, який вперше в 1880 році виділив від курей збудника холери. На сьогодні пастерельоз (холера) птиці зареєстрований в багатьох країнах світу, завдає значних економічних збитків і відноситься до значущих інфекційних захворювань [1, 5, 6, 7]. Для галузі птахівництва в Україні пастерельоз (холера) становить серйозну загрозу [5].

Збудником пастерельозу (холери) птиці є бактерії родини *Pasteurellaceae*, роду *Pasteurella*, виду *Pasteurella multocida*, підвиду *multocida*. Холероподібні захворювання можуть спричинити також представники виду *Pasteurella multocida* підвидів *septica* та *gallicida*. Останній підвид найчастіше зустрічається серед водоплавної птиці [3, 5].

Pasteurella multocida – це нерухома, коротка, грамнегативна, овоїдна паличка (у мазках фарбується біполярно). У тканинах і крові мікроорганізм по морфології однорідний, в культурах – поліморфний. Поряд з овоїдами зустрічаються і кокоподібні форми. Бактерія має слабо виражені гемаглютинуючі властивості [1, 3, 5].

Основним джерелом інфекції є хвора на пастерельоз птиця, її виділення та трупи. Переносниками можуть бути гризуни, кровосисні комахи, дикі перелітні та синантропні птахи. У поширенні пастерельозу (холери) птиці важливе значення має пастерелоносійство серед клінічно здорової і, особливо, перехворілої птиці. Появі, а також значному поширенню хвороби, сприяє зниження резистентності птиці під дією поліетіологічних стрес-факторів [1, 3, 5, 12].

У промисловому птахівництві з високою концентрацією утримання різновікового поголів'я на обмеженій території та, особливо, в індивідуальному секторі, за умови утримання різновікової та різновидової птиці, пастерелоносійство має особливо важливе значення в епізоотологічному процесі. Ступінь і тривалість пастерелоносійства у стаді птиці залежить від перебігу хвороби, ефективності проведення профілактичних, лікувальних і ветеринарно-санітарних оздоровчих заходів. Важливу роль відіграє годівля, технологія та санітарна культура виробництва. Слід зазначити, що пастерелоносійство може складати до 100 % серед птахопоголів'я, тривати протягом 3–4 тижнів, подекуди – до кінця технологічно-господарського періоду використання птиці [1, 2, 5].

Вірулентність пастерел, виділених від такої птиці, різна і може змінюватися в залежності від фізіологічного стану, характеру проведених санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів [5].

Найбільш важливу роль у загальному комплексі заходів з недопущення та ліквідації пастерельозу (холери) птиці відіграє його своєчасна профілактика та діагностика [2, 5].

Діагноз на пастерельоз птиці встановлюють на основі комплексу методів: анамнестичних, епізоотологічних, клінічних і патологоанатомічних. Для остаточного встановлення діагнозу обов'язковим є проведення бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу, постановка біологічної проби на лабораторних тваринах (білі миші та птиця). Кожен із методів діагностики має цінність лише в сукупності з іншими [3, 4, 5]. Класичні підходи в діагностиці пастерельозу (холери) птиці мають як позитивні моменти, так і недоліки [1, 5, 9, 11].

З метою своєчасного та повного виявлення пастерелоносіїв в неблагополучних і, особливо, у стадах із хронічним перебігом хвороби, необхідно використовувати результати, отримані при лабораторних серологічних дослідженнях проб крові [2, 4, 5, 8, 10].

Ось чому розробка сучасних, економічних і відносно швидких методів захиттєвої діагностики пастерельозу (холери) птиці, уніфікація та стандартизація відомих тестів, є важливим завданням для вирішення проблем у діагностиці пастерельозу птиці.

Мета роботи. Враховуючи відсутність в Україні як вітчизняного, так і зареєстрованого імпортного тест-набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці, була поставлена задача розробити «Набір для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації» та визначити його діагностичну та практичну цінність.

Матеріали та методи. Робота виконана на базі Дніпропетровської дослідної станції Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» в лабораторіях епізоотології бактеріальних і вірусних хвороб птиці, у наукових підрозділах Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ), ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина» (м. Харків), відділі з вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» і за сприяння та допомоги Головного управління ветеринарної медицини в Дніпропетровській області.

«Набір для діагностики пастерельозу (холери) птиці в РНГА» складається з наступних компонентів:

- один флакон нативного антигену антитільного еритроцитарного – 1,0 см³;
- один флакон ліофілізованої позитивної сироватки – специфічної до бактерії пастерельозу – 1,0 см³;
- один флакон ліофільно висушеної сироватки негативної – 1,0 см³;
- один флакон розчинника – 2,0 см³.

Для виготовлення антигену антитільного еритроцитарного використовували інактивовану бактеріальну культуру виробничого штаму пастерел № 1931, що використовувався для сенсibilізації стабілізованих еритроцитів птиці та барана.

В якості позитивної (специфічної до бактерії пастерельозу) сироватки в наборі використовували ліофільно висушену у флаконі гіперімунну сироватку, отриману від сільськогосподарської птиці з високими титрами специфічних антитіл до бактерії пастерельозу (холери) в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) в якості позитивного контролю специфічності.

В якості негативної (неспецифічної) сироватки крові в наборі використовували ліофільно висушену сироватку крові, отриману від сільськогосподарської птиці з господарств-постачальників, благополучних щодо пастерельозу (холери) птиці для використання у реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) в якості негативного контролю специфічності.

В якості розчинника для приготування розведень досліджуваних сироваток використовували фізіологічний розчин з рН 7,2–7,4.

Критерієм оцінки специфічної активності антигену бактерії пастерельозу (холери) птиці була його здатність давати позитивну реакцію з гомологічними сироватками крові та відсутність позитивної реакції з гетерологічними сироватками крові.

Активність та специфічність антигену та сироваток визначали мікрометодом. Постановку реакції непрямой гемаглютинації здійснювали у відповідності до настанови по застосуванню з використанням імунологічних планшетів з V подібним дном. Оцінку активності гомологічного антигену та сироваток проводили шляхом їх титрування в РНГА. Специфічність антигену пастерельозу штаму № 1931 визначали з використанням гетерологічних і гомологічних сироваток крові.

Активність рідкого нативного антигену антитільного еритроцитарного бактерії пастерельозу (холери) птиці визначали в РНГА. Спочатку вносили гліцеринізований фізіологічний розчин у імунологічні планшети з

V- подібним дном. Потім готували послідовні дворазові розведення позитивної та негативної сироваток від 1:2 до 1:256. Після цього в усі лунки додавали по дві краплі (0,2 см³) нативного антитільного еритроцитарного антигену в 10 %-вій концентрації, панелі обережно струшували і залишали за кімнатної температури на 60 хвилин, після чого обліковували результати реакції. Облік результатів проводили протягом 30 хвилин після завершення реакції в контролях.

Позитивною вважали реакцію, в якій спостерігалась аглютинація антитільного еритроцитарного антигену в розведенні 1:8 і вище при утворенні осаду еритроцитів у вигляді «парасольки» з рівними або обмеженими кільцем краями.

Титр позитивної специфічної сироватки до бактерії пастерельозу (холери) птиці був 1:16 і вище.

Негативною вважали реакцію при відсутності аглютинації та випадінні антитільного еритроцитарного антигену у вигляді крапки (ґудзика) в центрі дна лунки, або у випадках коли титр сироватки мав значення не вище 1:8.

Техніка постановки РНГА. Для постановки РНГА готували подвійне розведення досліджуваних сироваток від 1:2 і вище. Для цього в ряд лунок панелі вносили об'єм 0,05 або 0,2 см³ гліцеринізованого фізіологічного розчину рН 7,2, потім в першу лунку вносили об'єм досліджуваної сироватки, старанно піпетували вмістиме і переносили об'єм у другу лунку, потім у третю і т. д. З останньої лунки титрований об'єм вилучали в дезінфекційний розчин. Після цього в кожну лунку вносили об'єм антигену в робочому розведенні (1:5). Панелі витримували за температури (20–24)°С протягом 40–60 хвилин.

Приготування робочого розведення антигену:

Нативний антиген в об'ємі 1,5 см³ розчиняли у 8,5 см³ фізіологічного розчину рН 7,2, що містить 0,5 % гліцерину (х.ч.).

Облік реакції:

Реакцію враховували в тому випадку, якщо контроль – фізіологічний розчин з 0,5 % гліцерину та рівний об'єм антигену в робочому розведенні протягом 60 хвилин осідав на дні лунки у вигляді ґудзика (крапки).

Позитивна реакція з досліджуваними сироватками характеризувалася появою осаду еритроцитів у вигляді «парасольки» на дні лунки з рівними або зубчастими краями. Негативна реакція з досліджуваними сироватками характеризувалася випаданням еритроцитів у вигляді ґудзика (крапки) на дні лунки.

Діагностичним титром вважали 1:8.

Визначення активності позитивної (специфічної) сироватки крові. Активність позитивної (специфічної до бактерії пастерельозу птиці) сироватки крові визначали шляхом її дослідження в РНГА. Активною вважали сироватку крові, яка мала титр специфічних антитіл в РНГА 1:256 і вище.

Визначення негативної (неспецифічної) сироватки крові. Активність негативної (неспецифічної) сироватки крові визначали шляхом постановки РНГА. Негативна (неспецифічна) сироватка крові в РНГА мала титр антитіл не більше 1:2.

Визначення якості розчинника (фізіологічного розчину). Розчинник являв собою прозору рідину без кольору, осаду та сторонніх домішок. При внесенні в лунки з розчинником рідкого антигену антитільного еритроцитарного спостерігалася негативна реакція непрямой гемаглютинації, а саме: осад еритроцитів мав вигляд чіткої крапки.

Результати досліджень. Результати перевірки компонентів «Набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації» за своїми органолептичними, фізико-хімічними та біологічними властивостями наведені в таблицях 1, 2 і 3.

Таблиця 1 – Антиген антитільний еритроцитарний

Найменування показника	Характеристика та норми	Висновок про відповідність
Зовнішній вигляд	Гомогенна суспензія темно-червоного або коричневого кольору, яка в процесі зберігання утворює дві фракції: осад (еритроцити) і прозора надосадова рідина (фізіологічний гліцеринізований розчин, рН 7,2–7,4)	Відповідає
Наявність сторонніх домішок, плісняви, пластівців, осаду, що розбивається, порушення герметичності та тріщин флаконів	Не допускається	Відповідає
Стабільність суспензії	Повинна бути стабільною	Відповідає
Щільність закупорки флаконів	Закупорка повинна бути щільною	Відповідає
Контроль водневих іонів	7,3± 1,0	Відповідає
Активність антигену (титр у РНГА, не нижчий)	1:8	Відповідає
Специфічність антигену (титр у РНГА з нормальною і гетерологічною сироватками, не вище)	1:2	Відповідає
Контамінація бактеріальною та грибною мікрофлорою	Не допускається	Відповідає
Контамінація мікоплазмами	Не допускається	Відповідає
Контамінація сторонніми вірусами	Не допускається	Відповідає

Таблиця 2 – Позитивна (специфічна) і негативна (неспецифічна) сироватки крові

Найменування показника	Характеристика та норми	Висновок про відповідність
Зовнішній вигляд	Суша аморфна маса у вигляді таблетки жовтого або коричневого кольору	Відповідає
Наявність сторонніх домішок, плісняви, пластівців, осаду що розбивається, порушення герметичності та тріщин флаконів	Не допускається	Відповідає
Визначення наявності вакууму у флаконі	Фіолетово-блакитне світіння, яке супроводжується характерним потріскуванням за випробування апаратом Д'Арсонваль	Відповідає
Масова частка вологи, % не більше	3,0	Відповідає
Щільність закупорки флаконів	Закупорка повинна бути щільною	Відповідає
Сироватка негативна (контроль на відсутність специфічних антитіл до пастерельозу птиці)	Не допускається	Відповідає
Специфічна активність (титр у РНГА, не нижчий)	1:8	Відповідає
Специфічність (титр у РНГА з нормальною та гетерологічною сироватками, не вище)	1:2	Відповідає
Контамінація бактеріальною та грибною мікрофлорою	Не допускається	Відповідає
Контамінація мікоплазмами	Не допускається	Відповідає
Контамінація сторонніми вірусами	Не допускається	Відповідає

Таблиця 3 – Розчинник (фізіологічний розчин)

Найменування показника	Характеристика та норми	Висновок про відповідність
Зовнішній вигляд	Прозора рідина без осаду та запаху	Відповідає
Наявність сторонніх домішок, плісняви, пластівців, осаду що розбивається, порушення герметичності та тріщин флаконів	Не допускається	Відповідає
Щільність закупорки флаконів	Закупорка повинна бути щільною	Відповідає
Контроль водневих іонів	7,3±1,0	Відповідає
Контамінація бактеріальною та грибною мікрофлорою	Не допускається	Відповідає

Одержані результати перевірки компонентів «Набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації» за своїми органолептичними, фізико-хімічними та біологічними властивостями відповідали вимогам ТУ У 24.4-00497087-0092:2009.

Результати активності та специфічності антигену антитільного еритроцитарного у реакції непрямой гемаглютинації з вакцинними антигенами пастерельозу (холери) птиці (*Pasteurella multocida* № 1931), ньюкаслської хвороби (штам «Ла-Сота»), інфекційного бронхіту (штам «Gallivac IB 88») і хвороби Гамборо (штам «Hirpa GM 97») наведені у таблиці 4.

Таблиця 4 – Результати перевірки активності та специфічності антигену антитільного еритроцитарного (ААЕ) у РНГА

Контроль на самоаглютинацію	Титр у РНГА з вакцинними антигенами:			
	пастерельозу (холери) птиці, штам № 1931 ААЕ	ньюкаслської хвороби, штам «Ла-Сота»	інфекційного бронхіту, штам «Gallivac IB 88»	хвороби Гамборо, штам «Hirpa GM 97»
Сироватка специфічна до пастерельозу (холери) птиці - негативно	1:256	негативно	негативно	негативно
Сироватка не специфічна до пастерельозу - негативно	негативно	1:512	не досліджували	не досліджували

Одержані результати оцінки специфічної активності антигену антитільного еритроцитарного бактерії пастерельозу (холери) птиці свідчили про здатність давати позитивну реакцію з гомологічними сироватками крові та відсутність позитивної реакції з гетерологічними сироватками крові.

Результати активності та специфічності сироваток крові у реакції непрямой гемаглютинації з антигеном антитільним еритроцитарним наведені в таблиці 5.

Таблиця 5 – Результати перевірки активності та специфічності сироваток крові у РНГА

Досліджувані сироватки крові:	Титр у РНГА з вакцинними антигенами (\log_2):			
	пастерельозу (холери) птиці, штам № 1931	нюкаслської хвороби, штам «Ла-Сота»	інфекційного бронхіту, штам «Gallivac IB 88»	хвороби Гамборо, штам «Hirpa GM 97»
Гіперімунна позитивна (специфічна) сироватка крові гусей до пастерельозу	1:256	негативно	негативно	негативно
Гіперімунна позитивна (специфічна) сироватка крові кролів до пастерельозу штамом № 1931	1:256	негативно	негативно	негативно
Неспецифічна (негативна) до пастерельозу (холери) птиці	негативно	не досліджували	не досліджували	не досліджували
Неспецифічна (негативна) ВРХ	негативно	не досліджували	не досліджували	не досліджували
Специфічна (позитивна) сироватка до вірусу НХ птиці	негативно	1:512	негативно	негативно
Польова від гусей № 1	1:1024	негативно	негативно	негативно
Польова від качок № 2	1:32	негативно	негативно	негативно
Польова від курей № 3	1:8	негативно	негативно	негативно

Результати таблиці 5 свідчать про те, що сироватки крові, позитивні (специфічні) до пастерельозу (холери) птиці, показують позитивну реакцію з гомологічним антигеном (антигеном пастерельозу у робочому розведенні) (титр антитіл 1:256 \log_2) і не показують позитивної реакції з гетерологічними специфічними антигенами вірусів: штам «Ла-Сота», штам «Gallivac IB 88» і штам «Hirpa GM 97».

Сироватки, негативні (неспецифічні) до пастерельозу (холери) птиці, не показують позитивної реакції.

Польові сироватки крові, відібрані від сільськогосподарської птиці з птахогосподарств та індивідуального сектору, при дослідженні на наявність антитіл до пастерельозу (холери) птиці з використанням «Набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації», дали позитивну (специфічну) реакцію в розведеннях 1:8–1:1024. Досліджені сироватки, позитивні до пастерельозу (холери) птиці та сироватки, негативні до пастерельозу, були високоспецифічними та достатньо активними. Дослідження проведені у повторах, при цьому були отримані ідентичні результати.

«Набір для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації» розроблено згідно ТУ У 24.4-00497087-0092:2009, апробовано, зареєстровано (Реєстраційне посвідчення ВВ-00228-06-10 від 06.07.2010 р.) та впроваджено у виробництво. Він може бути використаний у лабораторіях ветеринарної медицини різної відомчої приналежності з метою контролю епізоотичної ситуації щодо пастерельозу (холери) птиці, відстеження приросту титрів специфічних антитіл, оцінки ефективності специфічної профілактики пастерельозу (холери), визначення оптимальних термінів імунізації та реімунізації птиці, наявності пасивного імунітету до бактерії пастерельозу, ретроспективної діагностики, встановлення постінфекційного імунітету та визначення серологічного прогнозу.

Основним споживачем набору є лабораторії ветеринарної медицини різної відомчої приналежності.

Висновки: 1. За результатами перевірки встановлено, що компоненти набору за своїми органолептичними, фізико-хімічними та біологічними властивостями відповідають нормам і вимогам ТУ У 24.4-00497087-0092:2009.

2. Антиген антитільний еритроцитарний бактерії пастерельозу (холери) птиці є активним і специфічним у РНГА, про що свідчить здатність давати позитивну реакцію з гомологічними сироватками крові (титр антитіл 1:256 \log_2) і відсутність позитивної реакції з гетерологічними сироватками крові.

3. Позитивні (специфічні) до пастерельозу (холери) птиці сироватки крові показують позитивну реакцію з гомологічним антигеном (антигеном пастерельозу в робочому розведенні) і відсутність позитивної реакції з гетерологічними специфічними антигенами вірусів: штам «Ла-Сота», штам «Gallivac IB 88» і штам «Hirpa GM 97».

4. Польові сироватки крові, які відібрані від сільськогосподарської птиці з птахогосподарств та індивідуального сектору, з використанням «Набору для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації», дали позитивну (специфічну) реакцію в розведеннях 1:8–1:1024 \log_2 .

5. Розроблено згідно ТУ У 24.4-00497087-0092:2009, апробовано, зареєстровано (реєстраційне посвідчення ВВ-00228-06-10 від 06.07.2010 р.) та впроваджено у виробництво «Набір для діагностики пастерельозу (холери) птиці в реакції непрямой гемаглютинації», який може бути використаний у лабораторіях ветеринарної медицини різної відомчої приналежності з метою контролю епізоотичної ситуації щодо пастерельозу (холери) птиці, оцінки ефективності специфічної профілактики, визначення оптимальних термінів імунізації та ревакцинації птиці, наявності пасивного імунітету до бактерії пастерельозу, ретроспективної діагностики, встановлення постінфекційного імунітету та визначення прогнозу.

Список літератури

1. Буткин, Е.И. Пастереллез (холера) птиц [Текст] / Е.И. Буткин. — М.: КОЛОС, 1972. — 98 — 103 с.
2. Хвороби птиці [Текст]: навчальний посібник / А.В. Березовський [та ін.]. К.: ДІА, 2012. — С. 7 — 8.
3. Довідник з хвороб птиці [Текст] / В.В. Герман [та ін.]; під ред. В.В. Германа — Х.: Фоліо, 2002. — С. 10 — 16.
4. Корнієнко Л.Є. Інфекційні хвороби птиці [Текст] / Л.Є. Корнієнко, Л.І. Наливайко, В.В. Недосєков [і ін.]; під заг. ред. Л.Є. Корнієнка. — Херсон.: Гринь Д.С., 2012. — С. 81 — 96.
5. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц [Текст] / Б.У.Кэлнек [и др.]; под. общ. ред. Б.У. Кэлнека [и др.] — М: Аквариум, 2003. — С. 169—188.
6. Методичні рекомендації з діагностики, профілактики та заходів боротьби з пастерельозом (холерою) птиці [Текст] / Б.Т. Стегній [та ін.]. — Дніпропетровськ, — 2009. — С. 4 — 39.
7. Baba, T. and Y. Bito. 1966. Studies on the toxin of *Pasteurella multocida*. Jpn J Bacteriol 21:711 — 714.
8. Carter, G.R. 1955. Studies *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. Am Vet Res 16:481 — 484.
9. Gershman, M., J.F. Witter, H.E. Spencer and A. Kalvaitis. 1964. Epizootic of fowl cholera in the common eider duck. J Wildl Manage 28:587—589.
10. Hebbleston, K.L., J.E. Gallagher and P.A. Rebers. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis 16:925 — 936.
11. Hebbleston, K.L., P.A. Rebers, and G. Wessman. 1975. Fowl cholera: immunologic and serologic response in turkeys to live *Pasteurella multocida* vaccine administered in the drinking water. Poult Sci 54:217 — 221.
12. Rimler, R.B. 1984. Comparisons of serologic responses of white leghorn and New Hampshire red chickens to purified lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*. Avian Dis 28:984 — 989.

"THE KIT FOR DIAGNOSIS OF POULTRY PASTEURELLOSIS (CHOLERA) IN REACTION OF INDIRECT HEMAGGLUTINATION (RIHA)". DEVELOPMENT, TESTING AND REGISTRATION IN UKRAINE

Plys V.N., Kolbasina T.V.

State Institute of the Steppe Zone Agriculture of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine, Dnepropetrovsk

Stegniy B.T., Obukhovskaya O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

Ushkalov V.O., Blotskaya O.F., Vygovskaya L.M.

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Microorganisms Strains, Kiev

Korolenko L.S.

General Directorate of Veterinary Medicine in Dnepropetrovsk region, Dnepropetrovsk

Vovk S.I.

LLC SRE "Veterinary Medicine", Kharkov

Purpose of the Work is to develop the "Kit for diagnosis of poultry pasteurellosis (cholera) in reaction of indirect hemagglutination (RIHA)" and also to examine its diagnostic and practical value.

Materials and Methods. We used the "Kit for diagnosis of poultry pasteurellosis (cholera) in reaction of indirect hemagglutination"; vaccine antigens: pasteurellosis strain number 1931, the Newcastle disease strain "La-Sota", infectious bronchitis strain «Gallivac IB 97», Gumboro disease strain «Hipra GM 97»; sera: positive (specific), negative (non-specific), field sera; immunological plates with V-shaped bottom. Research methods: serological, immunological, microbiological and statistics.

Results. The "Kit..." has been developed and tested, its diagnostic and practical value has been defined.

Conclusions. 1. Test results indicate that due to organoleptic, physical-chemical and biological properties the kit components meet the standards and requirements of TU U 24.4-00497087-0092:2009.

2. Antibody erythrocyte antigen of bacteria of poultry pasteurellosis (cholera) is active and specific in RIHA, as evidenced by a positive reaction with homologous sera (titer 1:256 log₂) and by absence of a positive reaction with heterologous sera.

3. Positive to poultry pasteurellosis (cholera) sera are characterized by a positive reaction with homologous antigen (pasteurellosis antigen in working dilution) and by the lack of positive response to heterologous specific antigens of viruses.

4. Field sera collected from poultry using the "Kit..." displayed positive (specific) reaction in dilutions 1:8-1256 (log₂).

5. The "Kit..." is designed accordingly to TU U 24.4-00497087-0092:2009, tested, registered (registration certificate BB-00228-06-10 dated 06.07.2010) and introduced into production. It can be used in laboratories of veterinary medicine of different departmental affiliation to control epizootic situation concerning poultry pasteurellosis (cholera), estimate the effectiveness of specific preventive maintenance, determine the optimal time for poultry immunization and revaccination, appearance of passive immunity to the pasteurellosis bacteria, as well as to make retrospective diagnosis, find post-infection immunity and forecast.

Keywords: poultry pasteurellosis (cholera), kit for diagnosis of poultry pasteurellosis (cholera), reaction of indirect hemagglutination, antigen, poultry serum, activity, specificity.

УДК 619:616.98:578.825.1:615.371:616-091:636.521.58

ВИЗНАЧЕННЯ НЕШКІДЛИВОСТІ ДОСЛІДНИХ ЗРАЗКІВ ТРЬОХВАЛЕНТНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ХВОРОБИ МАРЕКА

Стегній Б.Т., Стегній М.Ю., Состін Д.Д., Зайцев Д.С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У статті представлені результати досліджень з нешкідливості дослідних зразків трьохвалентної вакцини з використанням ізолятів вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11, 4/11, 5/11, які були випробовані на добових курчатах.

Під час дослідів у вакцинованих курчат не було зафіксовано жодного випадку поствакцинальних ускладнень. Клінічні спостереження за щепленими курчатами свідчать про те, що експериментальні зразки вакцини є нешкідливими, застосування препарату не викликає негативних наслідків. А саме: у дослідних курчат не реєстрували набряки та абсцеси у місці введення, погіршення загального стану, відставання в рості та розвитку. Під час спостереження у курчат не було зареєстровано ніяких побічних реакцій та відхилень від фізіологічних норм, характерних для даного виду птиці.

Дослідні зразки вакцини можна вважати нешкідливими, тому що під час усього періоду спостереження всі дослідні курчата залишилися живими без будь-яких місцевих і симптоматичних проявів, спричинених вакциною. Патологоанатомічні зміни, характерні для хвороби Марека, під час розтину піддослідних курчат також не були зафіксовані.

Ключові слова: ізолят, вірус хвороби марека, контроль нешкідливості, однодобові курчата, вакцинопрофілактика, патологоанатомічні зміни.

Хвороба Марека (ХМ) – це лімфопроліферативна хвороба курей, яка спричиняється клітинно-асоційованим герпесвірусом [1, 8]. Захворювання проявляється у двох формах – у класичній паралітичній формі, з одночасним ураженням райдужної оболонки зіниць очей, і в гострій формі, з утворенням лімфоїдних пухлин у внутрішніх органах, шкірі, скелетних м'язах [11].

Вірус хвороби Марека (ВХМ) характеризується чітко вираженим тропізмом щодо Т-лімфоцитів, у яких тривалий час перебуває. Вірулентність збудника хвороби варіює в значних межах. Високовірулентні штами викликають гострий перебіг хвороби, менш вірулентні – класичну форму. В одному і тому ж поголів'ї тварин може циркулювати збудник різної вірулентності. Вірус володіє інтерференогенною, а також значною імуногеннодепресивною активністю, знижуючи загальну резистентність, імунобіологічну толерантність птиці, і підвищує її сприйнятливість до інших захворювань [2, 9, 10].

У природних умовах до хвороби Марека найчутливіші кури та індички. Можуть хворіти перепілки, фазани, качки, лебеді, голуби, канарки, куріпки, горлиці, горобці, щегли, майни [4, 5].

Хвороба Марека є поширеною та небезпечною інфекцією серед птахопоголів'я, збудник якої належить до списку В, згідно з класифікацією Міжнародного епізоотичного бюро (ОІЕ) [6]. Хвороба Марека реєструється практично в усіх країнах світу. Захворюваність птиці коливається від 25 до 60 % [7]. Збитки внаслідок перехворювання та загибелі птахопоголів'я у світі щорічно зростають та приблизно становлять 1 млрд американських доларів [6].

Засоби лікування захворювання не розроблені. Єдиним ефективним методом боротьби та профілактики хвороби Марека на сьогодні є обов'язкова вакцинація курчат у добовому віці [3].

Мета роботи – вивчити механізм дії дослідних зразків трьохвалентної вакцини на організм курчат і отримати достовірні дані щодо нешкідливості цих зразків.

Матеріали та методи. У 2011 році науковцями лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ» з патологічного матеріалу були виділені та ідентифіковані ізоляти вірусу хвороби Марека 1-го серотипу 3/11, 4/11, 5/11. Потім вони були адаптовані до клітин ФЕК і атенуйовані на первинній та перещеплюваній культурах клітин. Це ДНК-вмісні віруси, які відносяться до родини *Herpesviridae*, підродина *α -Herpesvirinae*, роду *Herpesvirus*. Не патогенні для людей, характеризуються виразною антигенною активністю. Атенуйовані ізоляти ВХМ 1-го серотипу перевірені на реверсію вірулентності та є ареверсибельні.