

ОТРИМАННЯ ІМУННИХ СИРОВАТОК ДО ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦЬ

Воротілова Н.Г. – аспірант*

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Для оцінки здоров'я тварин поряд із епідеміологічними, клінічними та іншими діагностичними параметрами серологічні методи залишаються головними діагностичними тестами. Є необхідністю складення підручника щодо застосування серологічних методів, розробки способів отримання еталонних сироваток для контролю серологічних реакцій [8].

Описано спосіб імунізації курчат проти віспи птахів. Для імунізації використовують курчат 6-тижневого віку. Вірус штаму віспи курчат “Каліфорнія” вводять за допомогою аплікатора у перетинку крила у дозі 10^5 віспоутворюючих одиниць у см^3 . Імунізацію повторно проводять через 12 діб. Сироватку відбирають через 24 доби після закінчення імунізації. Сироватку використовують як позитивний контроль для ELISA (Eliza-enzyme – linked immunosorbent assay) при проведенні імуноферментного аналізу (ІФА) [6].

Відомо два способи отримання специфічної сироватки до вірусу інфекційної бурсальної хвороби птахів (ІБХ) з використанням телички, яку імунізують вакцинним вірусом ПБ штаму УМ-93 [1] та з використанням биків-донорів, яких імунізують за розробленим регламентом [3].

Спосіб отримання позитивної контрольної сироватки до вірусу інфекційного бронхіту курей досягається шляхом імунізації 120 денних курчат, вільних від специфічних антитіл до найбільш поширених вірусних хвороб птахів, вакцинним штамом вірусу інфекційного бронхіту курей на фоні дії препарату супроводження [2].

Описано спосіб отримання позитивної сироватки до вірусу хвороби Ньюкасла (ВХН). Цей спосіб був нам прототипом у виготовленні позитивної контрольної сироватки до грипу птиць. Як антиген використовують вакцинний живий мезогенний штам “Комаров ВХН-К”. Штам розмножують в алантоїсній порожнині 10-11 денних курячих зародків (КЗ), отриманих від стад, вільних від інфекції ВХН. Зразки жовтків, що відбирають з яєць, тестують на присутність антитіл до ВХН в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Всі зразки - негативні. Від охолоджених зародків після їх загибелі або на 4 добу після інокуляції ВХН відбирають алантоїсну рідину і використовують як джерело вірусу після визначення титру гемаглютининів та інфекційного титру. Курчатам 2,5 недільного віку, вільних від антитіл до ВХН інокулюють інтраокулярно $0,1 \text{ см}^3$ просвітленої алантоїсної рідини ($\log_4 \text{EID}_{50}$) ВХН-К. Титри сироватки в РЗГА проти ВХН-К становлять в межах 1:256-1:512 із 4 гемаглютинуючими одиницями вакцинного вірусу. Позитивну сироватку використовують для ідентифікації інших ізолятів ВХН [7].

* Науковий керівник – Білявцева О.А., канд.вет.наук

Метою наших досліджень була розробка способу отримання діагностичної позитивної контрольної сироватки до вірусу грипу птахів для використання при проведенні серологічних досліджень, зокрема в РЗГА і ІФА.

Поставлена мета досягається шляхом імунізації сорокадобових курчат, вільних від специфічних антитіл до найбільш поширених вірусних хвороб птахів, вакцинним інактивованим штамом вірусу грипу птахів.

Методика виготовлення позитивної специфічної сироватки до вірусу грипу птахів.

Підготовка штаму для імунізації. У роботі використовували експериментальну серію інактивованої вакцини «АвіФлуВак ІЕКВМ» (серія

№2,3,6 дата виготовлення 2006) [4,5]. Препарат знаходиться в емульгованому стані. Продуцентом позитивної сироватки була сорокадوبова птиця кросу «Шевер- 579».

Птиця з однодобового віку утримувалася в умовах ізолятору Кримської дослідної станції ННЦ «ІЕКВМ». В досліді використано 220 голів. Попередньо курчат двічі досліджували в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) на наявність специфічних антитіл до вірусів інфекційного бурситу і бронхіту, хвороби Ньюкасла, інфекційного ларинготрахеїту, рео- та адено- вірусної хвороби, віспи, хвороби Марека, інфекційної анемії та енцефаломієліту. В РЗГА - на наявність специфічних антитіл до грипу птахів. Двічі отримували негативний результат.

Схема імунізації. Імунізацію проводили шляхом внутрим'язового введення вірусутримуючого матеріалу у дозі 0,5 см³ з ревакцинацією через 21 добу за аналогією. Через місяць після ревакцинації курей знекровлювали і отримували сироватку крові.

Результати досліджень.

Визначення активності та специфічності отриманих сироваток.

Активність і специфічність сироваток визначали в реакції затримки гемаглютинації, яку ставили мікрометодом, користуючись мікротитратором Такачі, у результаті були отримані титри сироваток крові 1:128-1:512 і методом імуноферментного аналізу, користуючись системою Біочек. При дослідженні позитивних сироваток крові методом імуноферментного аналізу встановлено, що величина оптичної густини перебільшує оптичну густину негативних контрольних сироваток у два рази. Так, оптична густина досліджуваних сироваток становила 2,5-3,1. Встановлено граничний титр досліджуваних сироваток 1:800.

Отриману сироватку в кількості 150 см³ розфасовували у стерильні скляні флакони ємністю 5см³ та зберігали при -18⁰С в умовах холодильної камери «Норд». При дослідженні сироваток через 2, 3 та 6 місяців після її отримання встановлено, що її активність зберігалась на рівні 8Log₂.

Висновки

1.Отримана сироватка крові у титрах 1:128-1:512 в РЗГА з оптичною густиною відносно нормальних сироваток 2,5-3,1 і граничним титром 1:800 в ІФА є високоактивною і використовується для робочого контролю серологічних реакцій.

2. Серонегативні курчата 40-добового віку є чутливою моделлю для отримання специфічної контрольної сироватки до вірусу грипу птахів H5N1.

3. При зберіганні (-18⁰С протягом 6 місяців) позитивна сироватка крові залишалася активною.

Літературні джерела

1. **Белявцева О.А.** Вивчення антитілоутворення до вірусу інфекційної бур сальної хвороби в організмі великої рогатої худоби. //Ветеринарна медицина України.- 1999. - №2. - С. 18-19.
2. **Белявцева О.А.** Патент на корисну модель № 21147 МПК 61 К 39/00. Спосіб отримання позитивної контрольної сироватки до вірусу інфекційного бронхіту курей .15.03.7 Бюл №3
3. **Вербицький П.І.** Удосконалення заходів боротьби і профілактики інфекційної бур сальної хвороби в сучасних умовах ведення птахівництва України. Автореф.дис.на здоб.н.с. канд..вет.наук. – Х. – 2000.- С. 18.
4. **Стегній Б.Т., Бісюк І.Ю., Музика Д.В., Головка А.Т., Гадзевич Д.Б., Бузун А.І., Коваленко Л.В., Стегній М.Ю., Рула О.М., Майорова К.Ф., Болдирєв А.Д., Білявцева О.А.** Антигенні властивості інактивованої емульсованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак»// Міжвід. тематич. Збірник. Ветеринарна медицина.2006.- №87.-С.211-217.
5. Патент на корисну модель № 20245. Штам вірусу грипу «А (курка) Сиваш/02/06(H5N1)» для виготовлення біопрепаратів проти пташиного грипу. **Стегній Б.Т., Бузун А.І., Музика Д.В., Бабкін М.В., Бісюк І.Ю., Стегній М.Ю., Майорова К.Ф., Білявцева О.А**
6. **Singh, T.J.Kim, D.N.Tripathy** – Re-emerged fowl pox: evaluation of isolation of isolates from vaccinated flocks.//Avian Pathology – 2000-29, p.449-445
7. **Sreenivasa M. Rao, G. Dhinakar Raj, and B. Murali Manohar/** An in vitro and in vivo evaluation of the virulence of Newcastle disease virus and vaccines for the chicken reproductive tract/ Avian Pathology (2002), 31, p.507-513
8. **Wright H., En-Min Zhou.** Development in international standartization. //Vet. Smmunol. And immunopathol. – 1999. - 72 № 1-2 – p.243-248