



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71175 (13) A

(51) 7 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЕРИТРОЦИТАРНИЙ ДІАГНОСТИКУМ ДЛЯ РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ ПРИ НЕЙСЕРІОЗІ ПТИЦІ

1

2

(21) 20031110460

(22) 20.11.2003

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Наливайко Людмила Іванівна

(73) ІНСТИТУТ ПТАХІВНИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК(57) Еритроцитарний діагностикум для реакції не-
прямой гемаглютинації (РНГА), що складається з

формалізованих та сенсibilізованих еритроцитів барана, гіперімунної і нормальної сироваток крові кроля, який відрізняється тим, що використовують гіперімунну сироватку крові з титром не нижче 1:320, що одержують триразовою імунізацією дорослих кролів вагою не менше 3кг сумішшю інактивованої культури нейсерій з концентрацією 5млрд. мікробних клітин в 1мл, нормальну сироватку крові одержують від неімунізованих кролів.

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної медицини, а саме до діагностики нейсеріозу птиці.

Нейсеріоз відноситься до маловідомих бактеріальних захворювань водоплавної птиці, індиків та курей, що характеризується серозно-катаральним і фібринозно-некротичним запаленням слизової оболонки клоаки з утворенням ерозій або виразок на її поверхні.

Збудник хвороби - грам-негативні диплококи. Які відносяться до роду *Neisseria*.

Для діагностики ряду вірусних і бактеріальних захворювань. При вирішенні питань імуногенезу і вивченні антигенної структури збудника хвороби використовується реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), яка є специфічною і високочутливою.

Існує спосіб виявлення бактеріоносійства щодо сальмонели тифімуриум („Динамика титров антигену і тривалість бактеріоносительства при експериментальній сальмонеллезной інфекції у гусей", Витебський ветинститут, 1985г.). За допомогою РНГА вдалося визначити кількість бактеріоносійів, цей спосіб використовували при сальмонельозній інфекції.

Є еритроцитарний діагностикум, який використовують при пулорозі-тифі птиці (Патент Росії №2070055 от 1993.09.08, кл. А61К39/00) - це рішення може бути прототипом.

Цей діагностикум складається з формалізованих та сенсibilізованих еритроцитів барана, гіперімунної і нормальної сироваток крові, антигеном є бактеріальна маса збудника пулорозу. Це рішення неможливо використовувати як еритроцитарний діагностикум при нейсеріозі птиці.

В основу винаходу поставлено задачу розробити еритроцитарний діагностикум для реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), що складається з формалізованих та сенсibilізованих еритроцитів барана, гіперімунної та нормальної сироваток крові кроля. Використовують гіперімунну сироватку крові з титром не нижче 1:320, яка одержана триразовою імунізацією дорослих кролів вагою не нижче 3кг інактивованою культурою нейсерій з концентрацією 5млрд мікробних клітин в 1мл. Нормальну сироватку кролів одержують від неімунізованих кролів. Сироватки крові використовують для встановлення специфічності і високочутливості еритроцитарного діагностикума у реакції непрямой гемаглютинації при нейсеріозі птиці.

Еритроцитарний діагностикум для РНГА при нейсеріозі створюється таким чином.

Діагностикум складають з формалізованих та сенсibilізованих еритроцитів барана або півня, гіперімунної сироватки крові кроля з титром не нижче 1:320 і нормальної сироватки крові кроля.

Гіперімунну сироватку крові одержують шляхом триразової імунізації дорослих кролів вагою не менше 3кг сумішшю інактивованої культури нейсерій з концентрацією 5млрд мікробних клітин в 1мл. Нормальну сироватку крові одержують від неімунізованих кролів.

Активність сироваток визначають в РЕГА. Антигеном для сенсibilізації еритроцитів є суміш одностових культур нейсерій, ізольованих від хворих качок, гусей та індиків. Накопичення біомаси здійснюють шляхом центрифугування при 1000об/хв. протягом 5 хвилин. Надосадову рідину зливають, фільтрують і додають до формалізованих еритроцитів.

(13) A

(11) 71175

(19) UA

Приклад 1. Чутливість і специфічність еритроцитарного діагностичного визначали на експериментальних інфікованих гусях, качках, індиках і курях. Щоб уникнути неспецифічної реакції, дослідні сироватки перед постановкою реакції адсорбували формалізованими еритроцитами (не сенсibilізованими), і робили дворові розведення від 1:5 до 1:10240 у об'ємі 0,05мл, після чого до кожного розведення додавали одну краплю діагностичного.

При постановці РНГА ставили такі контролю:

- тонізовані і десенсибілізовані еритроцити барана або півня;
- гіперімунна сироватка кроля і сенсibilізовані еритроцити;
- нормальна сироватка кроля і сенсibilізовані еритроцити.

Результати реакції враховували за чотирьохбальною системою згідно форми осаду еритроцитів через 15 і 40 хвилин.

За титр сироватки приймали останнє її розведення, у якому була позитивна реакція в один плюс, тобто відбувалася аглютинація еритроцитів у вигляді "парасольки", що вкривала 1/3 дна лунки.

Приклад 2. Динаміку накопичення антитіл вивчали на експериментально інфікованій птиці. Встановлено, що через 10 днів після введення збудника титр антитіл досягав 10,0-11,0 log₂ і зберігався на такому рівні протягом двох місяців, після чого починав знижуватись до 3-4 log₂. У неінфікованих - титр антитіл не перевищував 2,0-3,0 log₂.

За діагностичний титр приймали титр сироватки крові, що дорівнював щонайменше 4,0 log₂.

Приклад 3. Діагностичний випробували у 42 птахофабриках України та Росії: Харківській, Донецькій, Запорізькій, Дніпропетровській, Черкаській, Білгородській областях та АР Крим. Досліджено понад 1293 проб сироваток крові від дорослих гусей, качок, індиків та курей різних порід та порід.

Найбільш чутливими до нейсеріозу виявились: гуси великої сірої породи (85%), качки української білої породи (100%), індики - крос "Хідон" (85%), кури - Hy-Line-White (85%) і Lohmann - Brown (71%).

Розповсюдження нейсеріозу може проходити як з проявом клінічних ознак, так і у латентній формі, що свідчить про приховане носійство інфекції.

У хворої птиці на початку племінного сезону були виявлені титри антитіл на рівні 6,0-7,0 log₂, які досягали піка (10,0-11,0 log₂) до кінця першого місяця продуктивності. На такому рівні вони зберігалися протягом 60 днів від початку захворювання.

У кінці племінного сезону титр антитіл становив 3,0-6,0 log₂.

Виявлення антитіл у сироватці крові на рівні 2,0-3,0 log₂ враховувалось як неспецифічне.

У благополучних щодо нейсеріозу птахогосподарствах, де у птахів клініка хвороби була відсутня, а у мазках-відбитках збудника хвороби не було ізольовано - титр антитіл у сироватці крові дорівнював 2,0 -3,0 log₂ (табл.).

Протягом 1997-2003 років за допомогою РНГА у курей кросів "Lohmann-Brown" і "Dominant" без наявності клінічних ознак хвороби були виявлені антитіла у сироватках крові до збудника нейсеріозу у титрах 5,0-8,0 log₂ і 5,0-7,0 log₂. Паралельно з фолікулів і крові серця, а також із жовтка яєць цих курей було ізольовано збудник нейсеріозу. Культура позитивно реагувала з гіперімунною сироваткою крові кроля у реакції аглютинації.

Результати проведених досліджень в умовах експерименту та виробничої перевірки свідчать, що еритроцитарний діагностичний для РНГА може бути використаний для проведення імуномоніторингу птиці щодо нейсеріозу та задоволення основним вимогам - специфічність і високочутливість.

Таблиця

№ п/п	Вид птиці, порода, крос	Кількість проб	Вік, дні	Титри антитіл (РНГА)	
				Log ₂	%
1	Гуси:				
	Велика сіра	120	360	3-5	85
	Італійська	51	360	4-5	70
	Велика біла	40	360	3-6	60
2	Горьківська	55	360	2-4	60
	Качки:				
	"Темп"	50	360	3	90
	"Благоварський"	145	270-540	2-5	20
3	"Українська біла"	80	360	7-9	100
	Дикі - „крява"	10	280	2-5	30
	Індики:				
	"Хідон"	475	240	5-8	85
4	Біла широкогруда	120	260	1	0
	Кури:				
	"Dominant"	40	270	5-7	70
	"Lohmann-Brown"	47	200-360	3-6	71
5	"Hy-Line-White"	40	120-170	5-6	80
	Родоніт	20	500	4-8	60