



УКРАЇНА

(19) UA (11) 21147 (13) U

(51) МПК (2006)

A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПОЗИТИВНОЇ КОНТРОЛЬНОЇ СИРОВАТКИ ДО ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

1

2

(21) 20040402989

(22) 22.04.2004

(24) 15.03.2007

(46) 15.03.2007, Бюл. № 3, 2007 р.

(72) Білявцева Олена Анатоліївна

(73) Кримська дослідна станція Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

(57) Спосіб отримання позитивної контрольної сироватки до вірусу інфекційного бронхіту курей

на 120-денних курчатах, що не мають антитіл до найбільш поширених збудників вірусних хвороб птахів (інфекційного бурситу, хвороби Гамборо, інфекційного ларинготрахеїту, віспи, рео- та аденовірусної хвороби), який **відрізняється** тим, що інфраорбітально вводять імунізуючий препарат - вакцинний штам вірусу інфекційного бронхіту курей по фону дії препарату супроводження.

Спосіб відноситься до біології, біотехнології, ветеринарної вірусології та імунології і може бути використаний при отриманні позитивних сироваток із наступним їх застосуванням у серологічній діагностиці інфекційного бронхіту.

Для оцінки здоров'я тварин поряд із епідеміологічними, клінічними та іншими діагностичними параметрами серологічні методи залишаються головними діагностичними тестами. Являється необхідністю складення підручника щодо застосування серологічних методів, розробки способів отримання еталонних сироваток для визначення антитіл. [4]

Відомі способи отримання позитивних сироваток до збудників вірусних хвороб птахів для серологічної діагностики.

1. Описано спосіб імунізації курчат проти віспи птахів. Для імунізації використовували курчат 6 недільного віку. Вірус штаму віспи курчат "Каліфорнія" вводили за допомогою аплікатора у перетинку крила у дозі  $10^5$  віспоутворюючих одиниць у см<sup>3</sup>. Імунізацію повторно проводили через 12 днів. Сироватку відбирали через 24 доби після закінчення імунізації. Сироватку використовували як позитивний контроль для ELISA (Eliza-enzyme-linked immunosorbent assay) при проведенні імуноферментного аналізу. [5]

2. Описано спосіб отримання специфічної сироватки до вірусу інфекційної бурсальної хвороби птахів (ІБХ).

Для імунізації використовували теличку живою вагою 200,0 кг. Вакцинний вірус ІБХ штам УМ-93,

розмножений на первинно-приписинізованій культурі фібробластів курячих ембріонів. Вірус викликав цитопатогенний ефект через 48 годин, накопичувався у титрі  $10^6$  ТЦД<sub>50/мл</sub>. Вірус утримуючий матеріал вводився телиці внутрішньовенно в об'ємі 200,0 мл тричі через кожні чотири доби. Сироватку досліджували на наявність антитіл в реакції непрямої гемаглютинації (РНГА) з еритроцитарним антигеном до вірусу ІБХ. На 21 добу після імунізації титр становив 1:128 [1].

3. Виробничі потреби в специфічній сироватці крові проти інфекційної бурсальної хвороби з титром 6-7 log<sub>2</sub> можуть бути забезпечені імунізацією бичків-донорів по розробленому регламенту: 4-5 ін'єкцій імунізуючою дозою вакцинного вірусу 5000 або 10000 ЕІД<sub>50/см<sup>3</sup></sub>, з інтервалом 3-7 днів. [2].

4. Для серологічної діагностики ІБХ запропоновано ряд тестів, що ґрунтуються на виявленні антитіл у хворих або перехворівших птахів: реакція нейтралізації (РН), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція непрямої гемаглютинації (РНГА), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА). Однак, найбільш чутливим являється метод імуноферментного аналізу (ІФА) (Eliza-enzyme-linked immunosorbent assay) [3].

Прототип. Описано спосіб отримання позитивної сироватки до вірусу хвороби Ньюкасла (ВХН). Як антиген використовували вакцинний живий мезогенний штам "Комаров ВХН-К". Штам розмножували в алантоїсній порожнині 10-11 денних курячих ембріонів (КЕ), отриманих від стад, вільних від інфекції ВХН. Зразки жовтків, що були відібрані з

(13) U

(11) 21147

(19) UA

яєць, тестували на присутність антитіл до ВХН в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Всі зразки були негативними. Від охолоджених ембріонів після їх загибелі або на 4 добу після інюкуляції ВХН відбирали алантоїсну рідину і використовували як джерело вірусу після визначення титру гемаглютининів та інфекційного титру. Курчатам 2,5 недільного віку, вільних від антитіл до ВХН інюкулювали інтраокулярно  $0,1\text{см}^3$  просвітленої алантоїсної рідини ( $\log_4 \text{ЕІD}_{50}$ ) ВХН-К. Титри сироватки в РЗГА проти ВХН-К були в межах 1:256-1:512 із 4 гемаглютинуючими одиницями вакцинного вірусу. Позитивну сироватку використовували для ідентифікації інших ізолятів ВХН [6].

Метою наших досліджень була розробка способів отримання діагностичної позитивної контрольної сироватки до вірусу інфекційного бронхіту для використання як контрольної при проведенні серологічних досліджень, зокрема в РИГА і ІФА.

Поставлена ціль 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.

Методика виготовлення позитивної специфічної сироватки до вірусу інфекційного бронхіту курей.

Підготовка штаму для імунізації. У роботі використовують вакцинний штам вірусу інфекційного бронхіту курей Massachusetts H-120, який застосовують у птаківництві для профілактичних щеплень птиці. Штам зберігається у ліофільному стані. Перед застосуванням вміст флакону із вакцинним вірусом розчинюють у  $10\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину рН7,2. Потім проводять послідовні десятикратні розведення вірусу на фізіологічному розчині від  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ . Для імунізації курчат беруть розведення вірусу  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ .

Продукцентами позитивної сироватки були 120 денні курчата кросу "Шевер-579", які утримувались в умовах ізолятору Кримської дослідної станції із однодобового віку. В досліді було використано 30 голів курчат. Попередньо курчат було двічі досліджено в 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 двічі з негативним результатом.

Схема імунізації. Імунізацію проводили шляхом інфраорбітального введення вірус утримуючого матеріалу по  $0,2\text{см}^3$  у розведеннях  $10^{-6}$  –  $10^{-7}$ .

Інюкуляцію проводили тричі з інтервалом одна доба між ін'єкціями та повторно за тією ж схемою на фоні застосування препарату супроводження. Через 21 добу після останнього введення курчат знекровлювали і отримували сироватку крові.

Визначення активності та специфічності отриманих сироваток. Активність і специфічність сироваток визначали в реакції непрямой гемаглютинації, яку ставили мікрометодом, користуючись мікротитратором Такачі, і методом імуноферментного аналізу, користуючись системою Біочек або Айдекс.

Порядок дослідження сироваток в РНГА.

Матеріали та реактиви:

- фізіологічний розчин рН7,2, який містить 0,5% гліцерину (хч);
- дистильована вода;
- еритроцитарний антиген до вірусу інфекційного бронхіту;
- піпетки мірні на  $1,0$ - $2,5\text{см}^3$ ;
- плексиглазові панелі або апарат Такачі із панелями V. Петлями на  $0,05\text{см}^3$ .

Для постановки РНГА готували двократні розведення сироватки, що досліджували, в розведенні від 1:2 та вище. Для цього в ряд лунок панелі розливали по  $0,05\text{см}^3$  гліцеринізованого фізіологічного розчину рН7,2, потім у першу лунку вносили по  $0,05\text{см}^3$  досліджуваної сироватки, ретельно пипетували вміст та переносили в другу лунку, потім в третю і т. інш.. Із останньої лунки рідину, що титрується видаляли у дезрозчин. Після цього в кожну лунку вносили по  $0,05\text{см}^3$  антигену в робочому розведенні (1,5%). Панелі витримували при  $T\ 20$ - $24^\circ\text{C}$  протягом 25-30 хвилин.

Приготування робочого розчину антигену. Нативний антиген в об'ємі  $1,5\text{см}^3$  розчиняли у  $8,5\text{см}^3$  фізіологічного розчину рН7,2, який містить 0,5% гліцерину (хч).

Облік реакції проводять візуально: у контролі якості антигену - фізіологічний розчин з 0,5% гліцерину та однаковий об'єм антигену у робочому розведенні протягом 30 хвилин на дні лунки утворює осад у вигляді пункту (крапки).

Позитивна реакція із досліджуваними сироватками характеризується появою осаду еритроцитів у вигляді парасольки на дні лунки із рівними або зубчастими краями.

Негативна реакція із досліджуваними сироватками характеризується випадінням еритроцитів у вигляді пункту (крапки) на дні лунки.

При дослідженні сироватки в РНГА з еритроцитарним діагностиком інфекційного бронхіту ІЕКВМ середній титр становив  $7-8\log_2$  (розведення сироватки 1:128-1:256).

Порядок дослідження сироваток методом імуноферментного аналізу(ІФА).

Використовували набір для визначення антитіл до вірусу інфекційного бронхіту, виробництва Всеросійського науково-дослідного інституту захисту тварин. Суть методу полягає у виявленні комплексу антиген-антитіло, сорбованого на поверхні лунок полістеролового планшету. Специфічний комплекс антиген-антитіло взаємодіє із антивидовим імунопероксидазним кон'югатом проти IgG курей та викликає розклад субстрату, фарбуючи вміст лунок планшету.

Сироватки досліджували згідно настанови по застосуванню набору для визначення антитіл до вірусу інфекційного бронхіту. Облік результатів аналізу проводили через 10-15 хвилин після внесення субстрату візуально - за інтенсивністю фарбування вмісту лунок планшету та інструментально, користуючись системою Біочек або Айдекс, шляхом оцінки значень оптичної густини досліджуваних та контрольних сироваток. Кінцевим розведенням досліджуваної сироватки вважали останнє її розведення, у якому оптична густина перебільшувала негативний контроль у 2,0 - 2,1 рази.

При дослідженні отриманих позитивних сироваток крові методом імуноферментного аналізу встановлено, що величина оптичної густини перебільшувала 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.(акт випробувальних досліджень додається).

При отриманні сироватки у титрах 1:128-1:256 і вище в РНГА та з оптичною густиною відносно нормальних сироваток не менше 2,5 і граничним титром не менше 1:800 в імуноферментному аналізі, сироватки вважали високо активними, птицю знекровлювали з подальшим відокремленням сироватки.

Літературні джерела, прийняті до уваги при експертизі.

1. Белявцева О.А. Вивчення антитіло утворення до вірусу інфекційної бур сальної хвороби в організмі великої рогатої худоби. //Ветеринарна медицина України.-1999- № 2, с. 18-19.

2. 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.

3. Сюрин В.Н., А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, н,в,Фомина Вирусные болезни птиц. ВНИ-ТИБП, М., 1998, с. 183-196.

4. Wright H., En-Min Zhou. Development in international standartization. //Vet. Smmunol. And immunopathol. - 1999.- 72 № 1-2 - p. 243-248/.

5. Singh, T.J.Kim, D.N.Tripathy - Re-emergag fowlpox: evaluation of isolation of isolates from vaccinated flocks.// Avian Pathology - 2000-29, 449-445/.

6. Sreenivasa M. Rao, G. Dhinakar Raj, and B. Murali Manohar/ An in vitro and in vivo evaluation of the vrulence of Newcastle disease virus and vaccines for the chicken reproductive tract/ Avian Pathology (2002), 31, 507-513/.