



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39117** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
**G01N 33/00**  
**A61D 7/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ ЩОДО ГРИПУ ПТИЦІ

1

(21) u200809201

(22) 14.07.2008

(24) 10.02.2009

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) БІЛЯВЦЕВА ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА, UA, ВО-  
РОТИЛОВА НАДІЯ ГРИГОРІВНА, UA

(73) КРИМСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ НАЦІОНА-  
ЛЬНОГО НАУКОВОГО ЦЕНТРУ "ІНСТИТУТ ЕКС-  
ПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ  
МЕДИЦИНИ", UA

2

(57) Спосіб контролю епізootичної ситуації щодо грипу птиці серед промислового та свійського поголів'я птахів, який **відрізняється** тим, що для дослідження використовують екстракти жовтків яєць в реакції затримки гемаглютинації з тест-набором "АвіФлу-Тест" виробництва Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини".

Спосіб відноситься до біології, біотехнології, ветеринарної вірусології, епізоотології. Може бути використаний при епізоотологічному (серологічному) моніторингу промислового і свійського птахопоголов'я щодо грипу птиць.

Рівень техніки. 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[4].

Відомо, що для проведення серологічного моніторингу птахопоголов'я можна використовувати сироватку крові з метою виявлення специфічних антигенів та визначення рівня напруженості імунітету після щеплення або серопозитивності у невакцинованої птиці. Екстракти яєць теж містять антиген, тому доцільніше досліджувати саме їх. При цьому суттєво полегшується процес відбору матеріалу.

Аналогом є спосіб отримання екстрактів жовтків яєць від диких птахів [1]. Для виготовлення екстрактів використовують свіжовідкладені яйця або яйця на початковій стадії насиджування. Обережно розбивають шкаралупу та ретельно відокремлюють жовток від білку. Після цього жовток змішують із фізіологічним розчином рН 7,2-7,4 у співвідношенні 1:2. Суміш інтенсивно шутелюють протягом 10-15 хвилин і екстракти центрифугують при 2500-3000об/хв. від 10 до 15 хвилин. Рідину, що утворилася над осадом, відбирають у скляні або пластикові пробірки та використовують у по-

дальших дослідях. Отримані таким чином екстракти мають жовте забарвлення різної інтенсивності - від світло-жовтого до жовтогарячого (в залежності від забарвлення жовтків). Ці екстракти можна зберігати у холодильнику при +2+8°C протягом 3-4 днів. Вони не придатні для зберігання у замороженому стані [1].

Найближчий аналог. Спосіб отримання екстрактів базується на використанні хлороформу. Після відокремлення жовтка від білку, жовток змішують із фізіологічним розчином рН 7,2-7,4 у співвідношенні 1:1, ретельно перемішують протягом 5-10 хвилин, потім до одержаної суміші додають рівний об'єм хлороформу, струшують до утворення стійкої емульсії 3-5 хвилин, і центрифугують при 2500-3000об/хв. Рідину, що утворилася над осадом, відбирають і використовують в імунологічних реакціях. Одержані екстракти прозорі, мають жовтувате забарвлення, або не мають його зовсім. Такі екстракти можна зберігати як при температурі +2+8°C протягом 3-4 днів, так і довгостроково у замороженому стані при -20°C [1].

Задачею досліджень було проведення серологічного моніторингу серед промислового та свійського птахопоголов'я АР Крим шляхом дослідження жовтків яєць в реакції затримки гемаглютинації з антигеном грипу А H5N1 виробництва Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини" [3].

Поставлену задачу досягають шляхом відбору яєць від птиці промислового та свійського утримання із подальшим приготуванням екстрактів

(19) **UA** (11) **39117** (13) **U**

жовтків яєць і дослідженням на присутність антитіл до вірусу грипу.

Методика отримання екстрактів жовтків яєць.

Апаратура, матеріали і реактиви.

Для проведення досліду застосовують:

- центрифугу з частотою обертів 3000об/хв.;
- центрифужні стакани ємністю 50см<sup>3</sup>;
- колби конічні скляні ємністю 100см<sup>3</sup> за ГОСТ 1770-74;

- пробірки скляні ємністю 10, 15, 20см<sup>3</sup> за ГОСТ 25336-82;

- піпетки пастеровські 1, 2, 5 і 10см<sup>3</sup> за ГОСТ 20292-74;

- натрій хлористий за ГОСТ 4233-77 0,87% розчин (фізіологічний з рН 7,2-7,4);

- хлороформ;

- магнітну мішалку.

Підготовка досліду.

Відбирають свіжі яйця від птиці промислового або свійського утримання знесені не пізніше 1-3 діб. Після відокремлення жовтка від білку, жовток змішують із фізіологічним розчином рН 7,2-7,4 у співвідношенні 1:1, ретельно перемішують протягом 5-10 хвилин на магнітній мішалці, потім до одержаної суміші додають рівний об'єм хлороформу, струшують до утворення стійкої емульсії 5 хвилин, і центрифугують при 3000об/хв. 15 хвилин. Рідину, що утворилася над осадом, відбирають і досліджують в реакції затримки гемаглютинації з антигеном грипу птиць H5N1.

Порядок дослідження сироваток в РЗГА.

Матеріали та реактиви:

- фосфатно-сольовий буфер (ФСБ);
- дистильована вода;
- тест-система "АвіФлуТест H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>" для виявлення антитіл до вірусу грипу підтипу H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>;
- піпетки мірні на 1,0-2,5см<sup>3</sup>;
- плексиглазові панелі або апарат Такачі із панелями V. Петлями на 0,05см<sup>3</sup>;
- натрій лимоннокислий 3-заміщений за ГОСТ 22280-76,5% розчин;
- еритроцити півнів у фізіологічному розчині, 1% завись; готуються наступним чином: кров беруть у півнів або курей у віці старше 6 місяців з підкрильцевої вени колбу з фізіологічним розчином у рівних об'ємах з 5% розчином лимоннокислого натру. Одержану кров відмивають фізіологічним розчином, осаджують центрифугуванням з частотою обертів 1500об/хв впродовж 15 хвилин. З осаду відмитих еритроцитів готують 1% суспензію на фізіологічному розчині [2].

Постановка РЗГА проходить у декілька етапів:

1. Постановка реакції гемаглютинації (РГА).

Для постановки РГА готують двократні розведення антигенів (H1-H14) від 1:2 до 1:4096. Для цього в усі лунки планшета з V-подібною формою дна розливають ФСБ в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. У першу лунку вносять рівний об'єм антигену, трьохкратно пипетують і переносять по 0,025см<sup>3</sup> у другу лунку і т.д. Із останньої лунки рідину, що титрується видаляють у дезрозчин. Після цього в кожну лунку вносять ФСБ в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>, а потім 1% суспензію еритроцитів курей в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. Планшет обережно струшують і залишають на 20-30 хвилин при кімнатній температурі (20-25°C).

Облік реакції: Проводять по наявності гемаглютинації (парасольки) або її відсутності (гудзика). За титр антигену приймають його найбільше розведення, в якому чітко виражена гемаглютинація (осідання еритроцитів у вигляді "парасольки"). Титр гемаглютинуючої активності не повинен бути нижче 1:32.

2. Приготування робочої дози антигенів (4 ГАО): Робочу дозу антигену готують з урахуванням активності антигену (титру) визначеному в РГА. Для цього антиген розводять ФСБ у стільки разів, скільки одержують поділенням його титру на 4. Наприклад, якщо титр антигену визначений у РГА, становить 1:128, для реакції його беруть у розведенні 1:32 (128:4=32).

Робочу дозу антигену готують безпосередньо в день постановки реакції з обов'язковим її контролем (4 ГАО). Для цього у 4 лунки планшета вносять ФСБ в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. У першу лунку додають рівний об'єм робочого розведення антигену (4 ГАО) і після трикратного піпетування 0,025см<sup>3</sup> переносять у другу, третю лунку, а з четвертої видаляють після піпетування 0,025см<sup>3</sup> рідини в дезінфікуючий розчин. Після цього в кожну лунку додають 1% суспензію еритроцитів курей в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. При правильному визначенні робочої дози антигену у 1 і 2 лунку, які містять 2 і 1 ГАО, відповідно, повинна бути повна аглютинація еритроцитів (осад у вигляді "парасольки"). У третій та четвертій лунках аглютинація повинна бути відсутня (осад має вигляд "гудзика").

3. Постановка РЗГА: в усі лунки V-подібного планшета вносять ФСБ в об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. У перші лунки додають рівний об'єм піддослідних екстрактів яєць, трьохкратно пипетують і роблять послідовні двократні розведення (від 1:2 до 1:4096). Далі в усі лунки планшета вносять антиген у робочому розведенні в об'ємі 0,025см<sup>3</sup> та витримують при кімнатній температурі 20°C протягом 40 хвилин, після чого додають 1% суспензію еритроцитів курей у об'ємі 0,025см<sup>3</sup>. Планшет обережно струшують і для осадження еритроцитів залишають на 20-30 хвилин при кімнатній температурі (20-25°C), після чого проводять облік реакції. Одночасно ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (1% суспензія еритроцитів + ФСБ у рівних об'ємах по 0,025см<sup>3</sup>). Аглютинація повинна бути відсутня.

Облік реакції: Результат дослідження є позитивним, якщо титр антитіл у екстрактів яєць становить 3,0 log (1:8) і вище.

Проведено дослід з екстрактами яєць від птиці.

Результат приведено у таблиці.

Таблиця

Вид утримання птиці	Наявність щеплення	Титр антитіл в екстрактах яєць
Промислова	"АвіФлуВак"	1:8-1:16
Свійська	Не щеплена	0

Літературні джерела, прийняті до уваги при експертизі.

1. Музика Д.В., Стегній Б.Т. Методичні рекомендації. Епізоотологічний моніторинг та діагностика інфекційних хвороб диких птахів. - Харків. - 2006р.

2. ГОСТ 25581-91 "Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики гриппа птиц".

3. Зареєстровано в Україні від 06 червня 2007 рок. № реєстрації 274314030107.

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