

КОМІСІЙНІ ВИПРОБУВАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ «НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ В РЕАКЦІЇ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ»

**Стегній Б. Т., Музика Д. В., Ткаченко С. В., Рула О. М.,
Стегній А. Б., Колесник О. С., Вовк С. І.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: semen270181@gmail.com

Напненко О. О.

Державний науково-контрольний інститут
біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ, Україна

У статті наведена інформація щодо проведення раунду комісійних випробувань компонентів тест-системи «Набір для визначення антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби в реакції затримки гемаглютинації». При тестуванні зашифрованих антигену та сироваток з раніше охарактеризованими та референтними зразками вони виявилися активними та специфічними, що відповідає вимогам ТУУ на зазначений препарат. Так, позитивний антиген мав активність в реакції гемаглютинації 1:256, реагував лише з позитивною до вірусу ньюкаслської хвороби сироваткою та не затримував аглютинацію у присутності референтних до вірусу грипу підтипів H5 та H7 сироваток. У присутності позитивних сироваток до вірусу ньюкаслської хвороби у зашифрованому вигляді позитивний антиген відповідного вірусу затримував аглютинацію еритроцитів півня в розведеннях 1:256–1:512

Ключові слова: антиген, ньюкаслська хвороба, грип птиці, реакція затримки гемаглютинації, тест-система

Ньюкаслська хвороба або псевдочума — це висококонтагіозна вірусна хвороба птиці, яка характеризується ураженням органів дихання та травлення, а також порушеннями у роботі центральної нервової системи. З середини минулого століття це захворювання набуло широкого розповсюдження у багатьох європейських країнах. Ньюкаслська хвороба (НХ) поширена на всіх континентах і належить до особливо небезпечних.

Збудником НХ є РНК-вмісний вірус з роду *Avulavirus* родини Paramixoviridae. Виявлені штами вірусу є імунологічно однорідними, однак їхня патогенність (здатність спричинити захворювання у чутливих організмів) значно відрізняється, що впливає на ступінь прояву хвороби та її епізоотологічні особливості. При першому занесенні збудника до господарства захворюваність може охоплювати до 100 % поголів'я та закінчуватися загибеллю до 60–90 % птиці.

У природних умовах НХ частіше за все реєструють у птиці з ряду курячих, тобто у курей, індичок, цесарок тощо. Однак у природі також реєструють випадки інфікування дикої птиці, наприклад голубів та горобців, які можуть переносити збудника захворювання на значні відстані та сприяти перезараженню домашніх птахів. За даними деяких дослідників [1–4], до хвороби також певною мірою чутлива водоплавна птиця, як домашня, так і дика. До того ж, птиця різних порід і віку має різну чутливість до вірусу. Так, молоді індичата більш чутливі до збудника, ніж дорослі індички. Це уможлиблює випадки контакту хворого молодняка зі здоровою дорослою птицею без її зараження. У літературі також зустрічається опис зараження вірусом НХ людини [5, 6]. Таке зараження може бути при нехтуванні правилами гігієни під час роботи на птахопідприємствах серед персоналу. Клінічними проявами хвороби у людей є кон'юнктивіти, лімфаденіти, генералізовані симптоми.

При діагностиці НХ застосовують комплексний підхід з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних ознак і патологоанатомічних змін, а також результатів лабораторних досліджень із виділенням вірусу. Виділення вірусу проводять шляхом інфікування курячих ембріонів і дослідженням у реакції аглютинації (РГА) їх навколоплідної рідини, яку отримують після охолодження та розтину. Для серологічної ідентифікації виділеного ізоляту вірусу та визначення

наявності антитіл у сироватках крові та жовтках яєць використовують реакцію затримки гемаглютинації (РЗГА).

Диференціювати ньюкаслську хворобу необхідно від курячого грипу, інфекційного ларинготрахеїту та інфекційного бронхіту, а також пастерельозу й мікоплазмозу. Подібний прояв захворювання також характерний для ураження спірохетами. Серед незаразних причин слід розглядати можливі отруєння.

Метою цієї роботи було проведення комісійних випробувань тест-системи «Набір для визначення антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби в реакції затримки гемаглютинації» (серія № 1, контроль № 1, виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», дата виготовлення 2 липня 2019 року, придатний до 2 липня 2021 року), за участі фахівців Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) з метою реєстрації зазначеного препарату.

Матеріали і методи. Тест-система «Набір для визначення антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби в реакції затримки гемаглютинації» складається з наступних компонентів:

— антиген вірусу ньюкаслської хвороби, інактивований, ліофілізований, з активністю в РГА 1:512 (2 флакони);

— позитивний контроль з антитілами до вірусу ньюкаслської хвороби, ліофілізований, з активністю в РЗГА 1:512 (1 флакон);

— негативний контроль без антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби, ліофілізований (1 флакон);

— набір солей для виготовлення фосфатно-сольового буфера (натрій фосфорнокислий однозаміщений (1 флакон); натрій фосфорнокислий двоаміщений (1 флакон) і натрій хлористий (2 флакони);

— цитрат натрію — для виготовлення розчину для стабілізації еритроцитів півня (1 флакон).

Дослідження показників якості компонентів тест-системи проводили у відповідності до вимог нормативних документів на зазначений препарат, а саме: наявність вакууму у флаконах, які містять ліофілізовані компоненти тест-системи; активність антигену в РГА та специфічність, а також активність і специфічність позитивних контролів у РЗГА. Постановку реакцій гемаглютинації (РГА) і затримки гемаглютинації (РЗГА) проводили згідно з вимогами Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ) і згідно з листівкою-вкладкою до тест-системи по «стікаючій краплі». Також наголошено на тому, що отримані значення активності антигенів і сироваток можуть коливатися $\pm 2 \log_2$ в різні сторони (згідно з вимогами МЕБ).

Зазначені дослідження проводили у відділі біотехнології та контролю вірусних препаратів ДНКІБШМ (м. Київ).

З метою проведення комісійних випробувань розробником препарату та фахівцями ДНКІБШМ надано наступні раніше охарактеризовані та референтні матеріали, які в зашифрованому вигляді використовували для проведення досліджень:

— антиген вірусу грипу А підтипу Н5 препарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 у реакції затримки гемаглютинації» серія № 3, контроль № 3, інактивований, ліофілізований з активністю в РГА 1:256;

— антиген вірусу грипу А підтипу Н7 препарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 у реакції затримки гемаглютинації» серія № 3, контроль № 3, інактивований, ліофілізований з активністю в РГА 1:256;

— антиген вірусу ньюкаслської хвороби, нативний, виробництва ДНКІБШМ з активністю в РГА 1:1 024;

— позитивний контроль з антитілами до вірусу грипу А підтипу Н5 препарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 у реакції затримки гемаглютинації» серія № 3, контроль № 3, ліофілізований, з активністю в РЗГА 1:256;

— позитивний контроль з антитілами до вірусу грипу А підтипу Н7 препарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 в реакції затримки гемаглютинації» серія № 3, контроль № 3, ліофілізований, з активністю в РЗГА 1:1 024;

— позитивна сироватка крові курей з антитілами до вірусу ньюкаслської хвороби, інактивована, ліофілізована, виробництва ДНКІБШМ, з активністю в РЗГА 1:128;

— екстракт жовтка яєць з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ННЦ «ІЕКВМ») з активністю в РЗГА 1:512;

— референтна сироватка крові до вірусу грипу А підтипу H5N3 виробництва Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Італія з активністю в РЗГА 1:1 024;

— референтна сироватка крові до вірусу грипу А підтипу H7N7 виробництва OIE Avian Influenza and Newcastle Disease Reference Laboratory, Велика Британія з активністю в РЗГА 1:1 024.

Результати досліджень. Згідно з наданою співробітниками ДНКІБШМ схемою досліджень, розробникам тест-системи надано 8 зашифрованих антигенів з номерами від 1 до 8. На першому етапі необхідно було визначити їх активність в РГА.

Отримані результати активності антигенів наведено в табл. 1.

Таблиця 1 — Результати визначення активності антигенів у РГА

Номер антигену	Активність в РГА
антиген № 1	1:256
антиген № 2	1:128
антиген № 3	1:256
антиген № 4	1:1 024
антиген № 5	1:512
антиген № 6	1:128
антиген № 7	1:256
антиген № 8	1:128

Після цього з антигенів «1», «2», «3», «4», «7» та «8» необхідно було приготувати 4 гемаглютинуючі одиниці та дослідити з ними також зашифровані зразки (у залежності від вимог схеми досліджу — різну кількість). Результати РЗГА наведено в табл. 2–7.

Таблиця 2 — Результати визначення специфічності антигену «1»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:1 024
10	1:0
11	1:0
12	1:0
13	1:0
14	1:0
15	1:0
16	1:0
17	1:0
18	1:128
19	1:1 024
20	1:0

Таблиця 3 — Результати визначення специфічності антигену «2»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:0
10	1:1 024
11	1:0
12	1:0
13	1:0
14	1:0
15	1:512
16	1:128–1:256
17	1:0
18	1:512

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Таблиця 4 — Результати визначення специфічності антигену «3»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:0
10	1:0
11	1:256–1:512
12	1:128
13	1:0
14	1:0
18	1:0
19	1:0
20	1:256–1:512

Таблиця 5 — Результати визначення специфічності антигену «4»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:0
10	1:0
11	1:256–1:512
12	1:256
13	1:0
14	1:0
18	1:0
20	1:256

Таблиця 6 — Результати визначення специфічності антигену «7»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:0
10	1:1 024
11	1:0
12	1:0
13	1:0
14	1:0
15	1:256
16	н/д*
17	1:0
18	1:512
19	1:16
20	н/д*

Примітка: * — через нестачу сироватки реакцію не проводили.

Таблиця 7 — Результати визначення специфічності антигену «8»

№ зашифрованого зразка	Активність в РЗГА
9	1:2 048
10	1:0
11	1:0
12	1:0
13	1:0
14	1:0
15	1:0
16	н/д*
17	1:256
18	1:2 048

Примітка: * — через нестачу сироватки реакцію не проводили.

Після проведення зазначених досліджень зашифровані проби антигенів і сироваток були розшифровані (табл. 8–9).

Таблиця 8 — Розшифровка антигенів після проведених досліджень

Номер антигену	Вид антигену після розшифрування
Антиген № 1	Антиген вірусу грипу підтипу Н7 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Антиген № 2	Антиген вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») в розведенні 1:2
Антиген № 3	Антиген вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Антиген № 4	Антиген вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ДНКІБШМ)
Антиген № 5	Антиген вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ДНКІБШМ) в розведенні 1:2
Антиген № 6	Антиген вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») в розведенні 1:2
Антиген № 7	Антиген вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Антиген № 8	Антиген вірусу грипу підтипу Н7 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») в розведенні 1:2

Таблиця 9 — Розшифровка контролів, які мали антитіла до вірусу НХ, та без них

Номер контролю	Вид контролю після розшифрування
Контроль № 9	Позитивний контроль з антитілами до вірусу грипу підтипу Н7 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 10	Позитивний контроль з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 11	Позитивний контроль з антитілами до вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 12	Позитивна сироватка до вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ДНКІБШМ)
Контроль № 13	Негативний контроль без антитіл до вірусу грипу (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 14	Негативний контроль без антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 15	Позитивний контроль з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») в розведенні 1:2
Контроль № 16	Референтна сироватка з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5N3 (виробництва OIE, FAO and EU Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, м. Вейбридж, Велика Британія) розведена 1:8 дистильованою водою, прогріта за температури 56 °С та оброблена вуглекислим газом
Контроль № 17	Референтна сироватка з антитілами до вірусу грипу підтипу Н7N7 (виробництва OIE, FAO and EU Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, м. Вейбридж, Велика Британія) розведена 1:8 дистильованою водою, прогріта за температури 56 °С та оброблена вуглекислим газом
Контроль № 18	Суміш 1:1 позитивного контролю з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5 та позитивного контролю з антитілами до вірусу грипу підтипу Н7 (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»)
Контроль № 19	Екстракт жовтка яєць з антитілами до вірусу грипу підтипу Н5 (виробництва ННЦ «ІЕКВМ») в розведенні 1:10
Контроль № 20	Референтна сироватка до вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ДНКІБШМ) в розведенні 1:32

Висновки. За результатами проведених досліджень встановлено, що антиген вірусу ньюкаслської хвороби (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») високоактивний (активність в РГА складає 1:256) і специфічний (не реагує з позитивним контролем з антитілами до вірусу грипу підтипу H5, позитивним контролем з антитілами до вірусу грипу підтипу H7 і референтними сироватками до вірусу грипу підтипу H5N3 та H7N7. З позитивним контролем з антитілами до вірусу ньюкаслської хвороби реагує в розведенні 1:256–1:512. З референтною сироваткою до вірусу ньюкаслської хвороби затримує аглютинацію еритроцитів у розведенні 1:128).

Отримані результати дозволили винести позитивне рішення щодо реєстрації цього препарату на території України. На тест-систему отримане реєстраційне посвідчення та вона може використовуватися в наукових установах і лабораторіях ветеринарної медицини з метою контролювання епізоотичної ситуації щодо ньюкаслської хвороби.

Список літератури

1. Особо опасные болезни животных : список группы А по классификации Международного эпизоотического бюро : справочник / И. А. Бакулов, В. М. Котляров, А. С. Донченко [и др.]. — 2-е изд., перераб. и доп. — Покров ; Новосибирск, 2002. — 184 с.
2. Бирман, Б. Я. Эпизоотическая ситуация в мировом и отечественном птицеводстве и задачи по обеспечению эпизоотического благополучия птицеводства Белоруссии / Б. Я. Бирман, И. В. Насонов // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. — 2005. — № 2. — С. 2–4.
3. Изра, В. Н. Проблемы респираторных заболеваний в современном птицеводстве / В. Н. Изра, А. В. Борисов, В. В. Борисов // 1-й международный ветеринарный конгресс по птицеводству : материалы конгресса. — Москва, 2005. — С. 14–22.
4. Старов, С. К. Современные принципы профилактики ньюкаслской болезни птиц / С. К. Старов // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных : материалы международной конференции, посвященной 45 летию ФГУ ВНИИЗЖ. — Москва, 2003. — С. 284–289.
5. Papageorgion, C. Pouvoir immunisant du virus de Newcastle B 1 parvoil Intramusculaire chez les ponssins / C. Papageorgion // Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Compare Lyon. — 1965. — Vol. 67. — P. 173–174.
6. Alexander, D. E. The structural polypeptides of avian paramyxoviruses / D. E. Alexander, M. S. Collins // Arch. Virol. — 1981. — Vol. 67. — P. 309–323.

COMMISSION TESTING OF THE TEST SYSTEM “A KIT FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST”

Stegniy B. T., Muzyka D. V., Tkachenko S. V., Rula O. M., Stegnyy A. B., Kolesnyk O. S., Vovk S. I.
National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

Napnenko O. O.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Newcastle disease or pseudo-plague is a highly contagious viral bird disease, characterized by damage to the respiratory and digestive organs, as well as impaired central nervous system function. Since the middle of the last century, this disease has become widespread in many European countries. Newcastle disease is common in all continents and is especially dangerous. The article provides information on conducting a round of commission tests of the components of the test system “A Kit for Detection of Antibodies to Newcastle Disease Virus in Hemagglutination Inhibition Test”. When testing encrypted antigens and sera with previously characterized and referent samples, they were active and specific, meeting the requirements of the technical specifications of Ukraine for the specified drug. Thus, the positive antigen had activity in the hemagglutination test of 1:256, reacted only with positive to the Newcastle disease virus serum, and did not delay agglutination in the presence of referent to avian influenza virus subtypes H5 and H7 sera. In the presence of positive sera to the Newcastle disease virus in encrypted form, the positive antigen of the corresponding virus delayed the agglutination of the cock erythrocytes in dilutions 1:256–1:512. The results obtained allowed to make a positive decision on the registration of this preparation in the territory of Ukraine

Keywords: antigen, Newcastle disease, avian influenza, hemagglutination inhibition test, test system