

УДК 619:578.831.1:615.373

**РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА****Драгутъ С.С., Стегний Б.Т., Стегний А.Б.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, Украина

*В публикации приведена методика постановки реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) для диагностики болезни Ньюкасла, а также примеры ее использования в сравнении с реакцией задержки гемагглютинации (РЗГА) и непрямой методом иммуноферментного анализа (ИФА).*

*Method of indirect hemagglutination test for Newcastle disease diagnostics is presented in the paper. Examples of its application in comparison with hemagglutination inhibition test and indirect method of immune-enzyme analysis are given in the article.*

**Введение.** Согласно рекомендациям Международного эпизоотического бюро (МЭБ), для проведения диагностических и мониторинговых серологических исследований птицы в отношении инфекционных болезней используют иммуноферментный анализ (ИФА); в том числе болезней, вызываемых гемагглютинирующими возбудителями, - также и реакцию задержки гемагглютинации (РЗГА). Но ряд вирусов, адсорбируясь на эритроцитах, не вызывают их склеивания. Гемагглютинация в данном случае наступает лишь при смешивании предварительно «нагруженных» вирусом (антигеном) эритроцитов со специфической к нему сывороткой. Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя гемагглютинат.

Данный метод гемагглютинации является своеобразной модификацией реакции агглютинации и известен как реакция непрямой гемагглютинации. Впервые эту реакцию разработали А.К. Кравченко и М.И. Соколов (1945 г.) для выявления антигенов бактерий. С вирусными антигенами РНГА в 1946 г. описали Берет и Андерсен. Дальнейшее развитие метод получил после работ Бойдена (1951 г.), который предложил использовать эритроциты, обработанные таннином. РНГА в последнее время широко распространена благодаря высокой чувствительности, экспрессивности и простоте постановки; ее используют для серодиагностики бактериальных и вирусных заболеваний как в гуманной, так и в ветеринарной медицине.

Известно, что большинство специфических антител относится к классам Ig G и Ig M, которые синтезируются в разное время инфекционного процесса. При этом Ig M антитела относятся к «ранним», и тесты, используемые для их выявления, применяют для ранней диагностики. Антитела класса Ig G синтезируются позже и сохраняются дольше. При многих инфекциях из иммунологических методов наиболее чувствительны и информативны в отношении выявления вирусспецифических антител (Ig M и Ig G) в сыворотках крови РНГА и ИФА.

Чувствительность иммуноферментного метода превышает чувствительность метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и связывания комплемента (РСК) в 15, 40 и 1600 раз, соответственно. Иммуноферментным методом могут определяться вещества (антитела), если их концентрация в смеси составляет лишь  $10^{-10}$  г/л [1]. Однако этот метод требует использования специального оборудования и компьютерной программы, дорогостоящих материалов (или коммерческих тест-систем) и соответствующей подготовки исполнителей.

Возможность РНГА, находящейся на уровне с реакцией нейтрализации (РН), составляет 0,02 мкг антител (Ig M и Ig G) [2]. К тому же РНГА более чувствительна к детекции Ig M, чем РН [3]. А по данным S. Lefkowitz и др., для детекции антител к аденовирусу РНГА в 10 и 100 раз чувствительнее теста нейтрализации [4]. Помимо высокой чувствительности, данный метод прост в исполнении, не требует специального оборудования и дорогостоящих реактивов. Учет реакции проводится визуально.

**Материалы и методы.** В РНГА использовали препарат «Антиген эритроцитарный для диагностики хвороби Ньюкасла», который представляет собой 10 % суспензию таннизированных эритроцитов барана в глицеринизированном (0,5 %) физиологическом растворе (ГФР), на которых адсорбирован вирус БН (производства ООО «НИП «Ветеринарная медицина», г. Харьков). В процессе хранения препарат образует две фракции: осадок (эритроциты) и прозрачную надосадочную жидкость (ГФР).

Постановку реакции проводили в V- и U-образных 96-луночных планшетах для иммунологических реакций. Во все лунки горизонтальных рядов вносили по 0,025 см<sup>3</sup> ГФР. В первые лунки рядов А...Г в таком же объеме вкрапляли исследуемые пробы сывороток крови, которые для освобождения от термолабильных ингибиторов предварительно прогревали в водяной бане при температуре (57±1) °С в течение 30 минут. В лунки рядов F (1) и G (1) вносили, соответственно, позитивную и негативную сыворотки крови птицы, которая содержала вирусспецифические антитела к вирусу БН и безантительную.

Сыворотки титровали методом последовательных двукратных разведений, удаляя с последней лунки 0,025 см<sup>3</sup> в дезраствор. Во все лунки планшета в равном объеме добавляли антиген в рабочем разведении (1,5 см<sup>3</sup> нативного эритроцитарного антигена после взбалтывания до получения гомогенной суспензии коричневого цвета разводили в 8,5 см<sup>3</sup> ГФР, pH 7,2±0,2).

Учет реакции проводили после выдерживания планшета при температуре 18-20 °С в течение 1-2 часов; при температуре 37 °С – через 30-60 минут.

За титр принимали последнее разведение сывороток, где наблюдали гемагглютинацию, то есть оседание эритроцитов на дно лунок планшетов в виде зонтика с ровными или зубчатыми краями и отсутствие стекания эритроцитов при наклоне планшета.

Титр позитивной сыворотки составлял 3 log<sub>2</sub>; титр негативной сыворотки – не превышал 1 log<sub>2</sub>. В контроле антигена на отсутствие спонтанной агглютинации (Н 1-12) эритроциты оседали на дно лунок в виде пуговки или компактного диска с четким ровным краем, а при наклоне планшетов – стекали.

Диагностический титр - 3 log<sub>2</sub>.

Реакция протекала быстрее, а также точнее был учет результатов при использовании V-образных планшетов по сравнению с круглодонными.

Для реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) использовали стерильную инактивированную вирусосодержащую экстраэмбриональную жидкость куриных эмбрионов, зараженных вирусом болезни Ньюкасла, штаммом «Ла-Сота» с инфекционной дозой и гемагглютинирующей активностью (в реакции гемагглютинации, РГА), соответственно,  $8 \lg \text{EID}_{50/\text{см}^3}$  и  $9 \log_2$ . РГА и РЗГА проводили согласно требованиям МЭБ.

В исследовании иммуноферментным методом использовали коммерческую тест-систему для выявления специфических антител к вирусу болезни Ньюкасла производства ВНИИЗЖ (Россия).

Гипериммунизацию птицы (петухов и индюков), сыворотки которых исследовали в РНГА, РЗГА и ИФА, проводили с помощью разных схем иммунизации [5].

**Результаты исследований.** Для выявления вирусспецифических антител к возбудителю болезни Ньюкасла (БН) у птицы, иммунизированной в период эмбрионального развития, а также для изучения иммунного ответа, в том числе формирования материнского иммунитета, и в качестве непрямого метода вирусологического диагностического исследования нами отработана методика РНГА, основанная на адсорбции вирусных антигенов на поверхности эритроцитов и дальнейшей их агглютинации гомологичными к антигену антителами. Далее изложены примеры использования РНГА для выявления у птицы вирусспецифических антител к возбудителю БН.

**Пример 1.** В таблице 1 приведены результаты выявления в РНГА трансвариальных антител к вирусу БН в сыворотках крови молодняка птицы из птицеводства «Мирный» Луганской области от родительского стада, вакцинированного против данного заболевания.

Таблица 1 - Изучение уровня напряженности иммунитета к вирусу болезни Ньюкасла у молодняка птицы

Количество проб сывороток	Возраст птицы, сутки	Разведения сывороток	Средний титр, $\log_2$	Уровень напряженности иммунитета, %
20	1	От 1:2 до 1:128	$4,45 \pm 0,30$	95
19	11	От 0 до 1:16	$1,42 \pm 0,21$	21
20	19	От 0 до 1:2	0	0

У 95 % суточного молодняка, полученного от вакцинированной птицы, выявляли материнские антитела к вирусу БН (на уровне  $4,45 \pm 0,30 \log_2$ ). Далее этот показатель снижался до 21 % у 11-суточных цыплят, а у птицы 19-суточного возраста вирусспецифические антитела отсутствовали.

**Пример 2.** В таблицах 2-3 показаны результаты изучения активности гипериммунных сывороток крови взрослой птицы (петухов и индюков) к вирусу БН в сравнении с реакцией задержки гемагглютинации (РЗГА) и иммуноферментным анализом (ИФА).

Таблица 2 – Динамика уровня антител к вирусу БН в сыворотках крови иммунизированных петухов

Серологические методы	Средний титр вирусспецифических антител в РЗГА и РНГА, $\log_2$ ; ИФА			
	До иммунизации	Через 18 суток после первой иммунизации	Через 6 суток после второй иммунизации	Через 7 суток после второй иммунизации
РЗГА	$5,00 \pm 0,29$	$9,14 \pm 0,29$	$10,38 \pm 0,25$	$10,78 \pm 0,44$
РНГА	$1,67 \pm 0,50$	$2,29 \pm 1,00$	$3,44 \pm 0,75$	$3,88 \pm 0,75$
ИФА	$1200 \pm 88$	$12687 \pm 284$	$14841 \pm 402$	$15259 \pm 340$

Таблица 3 – Динамика уровня антител к вирусу БН в сыворотках крови иммунизированных индюков

	Средний титр вирусспецифических антител в РЗГА и РНГА, $\log_2$ ; ИФА			
	До иммунизации	Через 7 суток после первой иммунизации	Через 18 суток после второй иммунизации	Через 7 суток после третьей иммунизации
РЗГА	$2,00 \pm 0,67$	$9,33 \pm 1,00$	$11,00 \pm 0,67$	$11,33 \pm 0,33$
РНГА	$1,00 \pm 0,33$	$1,33 \pm 0,67$	$2,50 \pm 0,33$	$3,00 \pm 0,67$
ИФА	$792 \pm 25$	$3633 \pm 145$	$5662 \pm 176$	$7913 \pm 224$

Представленные результаты свидетельствуют о постепенном нарастании титров вирусспецифических антител в сыворотках крови птицы с каждым последующим циклом введения антигена, который включал внутримышечную или внутривенную инъекцию вирусного материала. Динамика уровня антител, специфических к вирусу БН (в РНГА, ИФА), антигемагглютининов (в РЗГА), согласно результатам исследований, сходна.

При статистической обработке полученных результатов установлена корреляционная связь между средними значениями вирусспецифических к возбудителю БН антител в сыворотках крови птицы в процессе иммунизации, выявленных в реакциях РЗГА, РНГА и ИФА (табл. 4).

Таблица 4 – Корреляционная связь между уровнями антител, вирусспецифических к возбудителю БН, в сыворотках крови птицы

Серологические методы	Кoeffициент корреляции между уровнями антител, r	
	петухи	индюки
РЗГА и РНГА	0,900	0,828
ИФА и РЗГА	0,995	0,910
ИФА и РНГА	0,853	0,964

Представленные в таблице данные указывают на наличие высокой корреляционной связи между уровнями специфических к вирусу БН антител при их выявлении указанными серологическими методами.

Изучением активности полученных гипериммунных сывороток установлено, что средние титры антител у индюков составляли  $11,33 \pm 0,33 \log_2$  в РЗГА;  $3,00 \pm 0,67 \log_2$  в РНГА и  $7913 \pm 224$  в ИФА; у петухов – соответственно,  $10,78 \pm 0,44$ ;  $3,88 \pm 0,75 \log_2$  и  $15259 \pm 340$ .

**Заключение.** На основе полученных данных можно сделать вывод, что хотя реакция непрямой гемагглютинации не входит в число методов, рекомендуемых МЭБ для проведения серологических исследований в отношении болезни Ньюкасла, но при контролировании пассивной и активной иммунизации птицы, а также в качестве непрямого диагностического метода, наряду с иммуноферментным анализом и реакцией задержки гемагглютинации, ее использование целесообразно.

**Литература.** 1. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. *Ветеринарная вирусология*. – М.: Колос, 1984. – 376 с. 2. Дяченко Н.С. *Пассивная гемагглютинация и ее применение в вирусологии*. – К.: Наукова думка, 1979. – 147 с. 3. Gough P.M., Dierks R.E. *Passive Haemagglutination Test for Antibodies Against Rabie Virus //Bull. World Health Org.* – 1971. - Vol. 45. - P. 741-745. 4. *Adenovirus antibody measured by the passive hemagglutination test / S.S. Lefkowitz, J.A. Williams, B.E. Howard, M.M. Sigel // J. Bacteriol.* – 1966/ - Vol. 91. – P.205-212. 5. *Вивчення динаміки рівня антитіл при гіперімуназації птиці та кролів вірусом хвороби Ньюкасла / С.С. Драгуць, М.Ю. Стегній, В.О. Бреславець. А.Б. Стегній // Вісник аграрних наук.* – 2008, № 8. – С. 63-66.

УДК 619:579.852.11:615.33:638.1

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ PAENIBACILLUS ALVEI К АНТИБИОТИКАМ

Дунец Е.Н.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Определение терапевтической эффективности антибактериальных средств в условиях in vitro позволяет быстро и правильно выбрать препарат для проведения лечебных мероприятий на пчелопасеках, неблагополучных по европейскому гнильцу, вызванному Paenibacillus alvei. В работе использовали 10 антибактериальных дисков, содержащих различные антибиотики. Наилучшим эффектом в отношении P. alvei обладал тилозин, диаметр зоны задержки роста возбудителя болезни составил в среднем  $47,2 \pm 3,43$  мм.*

*The use of disks with different antibacterial substances allows a fast and correct selection of the drug for preventive measures on bee-keeping farms affected with European Faulbrut caused by Paenibacillus alvei. During the experimental work 10 antibacterial disks have been used. The best result was shown by Tilozin, the diameter zone of the growth inhibition being about  $47,2 \pm 3,43$  mm.*

**Введение.** В последние годы среди заболеваний пчелосемей наибольшую актуальность приобретают инфекционные болезни. Распространение возбудителей болезней связано со снижением иммунного статуса пчелиной семьи, бесконтрольным применением антибиотиков, недостаточным взятком в природе и др. Широкому распространению болезней на пасеках способствует появление клеща *Varroa jacobsoni* [3, 5, 9].

Бактериальные болезни пчелосемей, особенно гнильцовые, вызывают серьезные опасения у пчеловодов. В Республике Беларусь среди гнильцовых болезней лидирующее место по распространению занимает европейский гнилец. Возбудителями болезни могут быть несколько видов микроорганизмов, однако чаще всего в пчелосемье поражают бактерии *Paenibacillus alvei*.

Против возбудителей европейского гнильца существует большое разнообразие лекарственных препаратов [2, 5, 6]. Однако в связи с быстрой адаптацией микроорганизмов к некоторым из них необходимо изыскивать более эффективные лекарственные средства, в т. ч. и антибиотики.

Целью исследования данной работы явилось изучение чувствительности *Paenibacillus alvei* к различным антибактериальным средствам, нанесенным на диски.

Для исследования были выбраны антибактериальные средства, действующие на грамположительные микроорганизмы. Нами были исследованы следующие антибиотики: пенициллин, тетрациклин, неомицин, канамицин, ампициллин, полимиксин, левомецетин, энрофлоксацин, тилозин и стрептомицин.

Тетрациклина гидрохлорид (*Tetracyclini hydrochloridum*) представляет собой продукт жизнедеятельности стрептомицет – *Streptomyces aureofaciens*. Тетрациклина гидрохлорид действует бактериостатически на вне- и внутриклеточно расположенных возбудителей. Обладает широким противомикробным спектром действия, к нему чувствительны грамположительные и грамотрицательные виды микробов. Бактерицидное действие оказывает только при его высокой концентрации в организме. Молодые, быстро размножающиеся культуры микроорганизмов более чувствительны к действию препарата, чем находящиеся в фазе покоя.

Механизм антибактериального действия тетрациклинов связан с подавлением белкового синтеза – блокирует функции рибосом. С белками гемолимфы образует комплексы. Распределяется в организме неравномерно.

Устойчивость микроорганизмов к тетрациклину развивается медленно. Микробы, резистентные к одному из антибиотиков группы тетрациклинов, обладают перекрестной устойчивостью к другим этой же группы [10, 11].

Полимиксин (*Polymyxinum*) относится к антибиотическим соединениям, продуцируемым спорообразующими почвенными бактериями *Vac. polymixa*. Биологическая активность измеряется в ЕД. В 1 мг содержится 8 000 ЕД. К полимиксину чувствительны в основном грамотрицательные микроорганизмы. Медленно вызывает возникновение резистентных штаммов. Из организма выделяется медленно; распределяется неравномерно. Механизм противомикробного действия заключается в разрушении цитоплазматической мембраны бактерии.