

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З
ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ
ЕКСПЕРТИЗИ**



**ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ
ВІРУСОЛОГІЧНИМИ ТА СЕРОЛОГІЧНИМИ
МЕТОДАМИ**
Методичні рекомендації

КИЇВ – 2025

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від «27» березня 2025 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол №15 від «19» червня 2025 р.).

Розробники: Дрожже Ж.М., Дедок Л.А., Рудой О.В., Сушко М.І., Радзиховський М.Л., Мандигра С.С., Уховський В.В., Піщанський О.В.

Рецензенти:

Романько М. Є. – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач науково-дослідного відділу організації наукової та міжнародної роботи Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів.

Виговська Л. М. – доктор ветеринарних наук, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Ложкіна О. В. – кандидат ветеринарних наук, завідувач науково-дослідного патоморфологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Діагностика грипу птиці вірусологічними та серологічними методами: метод. рекомендації. (2025). Дрожже Ж. М., Дедок Л. А., Рудой О. В., Сушко М. І., Радзиховський М. Л., Мандигра С. С., Уховський В. В., Піщанський О. В.; Київ: ДНДІЛДВСЕ, 2025; 29 с.

Методичні рекомендації призначені для лікарів ветеринарної медицини, фахівців державних лабораторій Держпродспоживслужби, діагностичних лабораторій, науково-дослідних установ та спеціалістів ветеринарної медицини.

У методичних рекомендаціях описано вимоги до відбору зразків патологічного матеріалу та сироваток крові, методи досліджень, виділення та ідентифікації збудника грипу типу А.

ЗМІСТ

СПИСОК ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1 ВІДБІР ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ	7
2 СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ, ЧУТЛИВІСТЬ МЕТОДІВ ТА КРИТЕРІЇ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ	9
2.1 Схематичний огляд діагностичних кроків для підтвердження ПГ	10
2.2 Чутливість методів та критерії їхнього застосування для діагностики грипу птиці	12
3 ВИДІЛЕННЯ ВІРУСІВ ГРИПУ ПТИЦІ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ ТА ЙОГО ІДЕНТИФІКАЦІЯ	13
3.1 Необхідне обладнання та розхідні матеріали	13
3.2 Реактиви	14
3.3 Приготування суспензії курячих еритроцитів	15
3.4 Підготовка патологічного матеріалу для дослідження	15
3.5 Зараження курячих ембріонів	15
3.6 Визначення гемаглютинуючої активності вірусу в РГА	17
3.7 Ідентифікація виділеного вірусу в РЗГА	18
3.8 Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА)	19
3.9 Облік результатів	20
4 ВИЗНАЧЕННЯ ІНТРАВЕНОЗНОГО ІНДЕКСУ ПАТОГЕННОСТІ ЗБУДНИКА ГРИПУ ПТИЦІ	20
4.1 Необхідне обладнання та витратні матеріали	20
4.2 Методи визначення інтравенозного індексу патогенності (ІП) грипу птиці	21
5 СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ	22
5.1 Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА)	23
5.2 Необхідне обладнання, реактиви та розхідні матеріали	23
5.3 Підготовка сироваток крові для дослідження	24
5.4 Визначення гемаглютинуючого титру вірусу в РГА	24
5.5 Розрахунок та контроль робочої дози антигену	25
5.6 Визначення титру антитіл в пробах сироваток крові в реакції затримки гемаглютинації	26
5.7 Облік та інтерпретація результатів	26
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	27
ДОДАТОК	28

ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

ВГП – вірус грипу птиці;

ВНХ – вірус ньюкаслської хвороби;

ВППП – високо патогенний грип птиці;

ВСП – вільні від специфічних патогенів;

ВСП-КЕ – вільні від специфічних патогенів курячі ембріони;

ГАО – гемаглютинуюча одиниця;

ІП – інтравенозний індекс патогенності;

ІФА – імуноферментний аналіз;

КЕ – курячі ембріони;

КЕР – контроль еритроцитів;

КРДА – контроль робочої дози антигену;

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон;

НППП – низько патогенний грип птиці;

РГА – реакція гемаглютинації;

РДП – реакція дифузної преципітації;

РЗГА – реакція затримки гемаглютинації

РНК – рибонуклеїнова кислота;

ФБР – фосфатно-буферний розчин.

ВСТУП

Грип птиці – контагіозна вірусна інфекція птахів, яка характеризується загальним пригніченням, набряками, ураженням органів дихання, шлунково-кишкового тракту і перебігає у вигляді епізоотій та ензоотій.

Хворобу у птиці викликають віруси, що належать до родини *Orthomyxoviridae* і віднесені до роду *Alphainfluenzavirus* (вірус типу А). Віруси грипу А на основі гемаглютинінового антигену (Н) розділені на 16 субтипів. Крім антигену (Н), у вірусів грипу є один із дев'яти нейрамінідазних антигенів (N).

Збудники пташиного грипу поділяються на віруси, що викликають високопатогенний (ВПП) та низькопатогенний (НПП) пташиний грип. На сьогодні до високопатогенних ізолятів грипу відносять ВПП підтипів H5 та H7 або будь-який вірус грипу типу А з індексом інтравенозної патогенності більше ніж 1,2 чи таким, що викликає загибель курчат віком 4–8 тижнів понад 75 %, або має амінокислотну послідовність у місці розщеплення гемаглютиніну, яка сумісна з високопатогенним вірусом грипу птиці. До низькопатогенного грипу птиці відносять інфекцію птиці, викликану ВПП типу А, субтипів H5 та H7, але які не потрапляють під визначення ВПП.

До грипу сприйнятлива домашня птиця, синантропні та дикі перелітні птахи (індики, качки, гуси, кури, страуси, цесарки, перепели, буревісники, фазани, горобці, лебеді, чайки та інші). Дикі птахи, особливо мігруюча водоплавна птиця, являються природним резервуаром вірусів грипу.

Інкубаційний період захворювання триває 1–7 днів. В окремих випадках – від декількох годин і більше 7 діб.

Клінічні ознаки грипу птиці є мінливими і залежать від вірулентності вірусу, виду птиці, віку, статі, супутніх хвороб, навколишнього середовища тощо. Клінічні ознаки різноманітні від слабо виражених до гострого перебігу з високою смертністю без прояву будь-яких симптомів, або з мінімальними

ознаками депресії, відсутністю апетиту, раптовою загибеллю великої кількості птиці у стаді.

У разі виявлення у птиці клінічних ознак чи патологічних змін, характерних для грипу птиці, відбирають зразки патологічних матеріалів для лабораторних досліджень від стада птиці, яке підозрюється у зараженні.

1. ВІДБІР ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

При підозрі на грип птиці в лабораторію направляють свіжі трупи або хвору птицю. Від загиблої птиці під час проведення патолого-анатомічного розтину відбирають зразки внутрішніх органів: головний мозок, трахею, легені, селезінку, печінку, нирки. Зразки кишечника відбирають в окремий контейнер.

Від живої птиці відбирають трахеальні і клоакальні мазки. Для відбору зразка з трахеї необхідно ввести стерильний зонд з ватним тампоном в трахею (через ротоглотку) і обережно потерти об стінки трахеї. Для відбору зразка з клоаки: ввести стерильний зонд з ватним тампоном в отвір і обережно потерти об стінки клоаки. На тампоні повинні залишитися сліди вмістимого кишечника.

Кров відбирають з підкрильцевої вени за допомогою шприца з голкою. Відбирають не менше 1 мл крові, при цьому кількість відібраної крові не повинна перевищувати 3 % від маси тіла птиці.

Зразки патологічного матеріалу поміщають в фосфатно-буферний розчин (ФБР) з антибіотиками (після додавання антибіотиків до ФБР важливо перевірити значення рН та за необхідності довести його до 7,0–7,4). Для прикладу, для зразків тканин та трахеальних мазків можна застосувати такі антибіотики: пеніцилін (2000 Од/мл), стрептоміцин (2 мг/мл), гентаміцин (50 мкг/мл), мікостатін (1000 Од/мл). Для клоакальних мазків та зразків фекалій концентрацію антибіотиків можна збільшити в п'ять разів.

Якщо кількість птиці, що підозрюється у захворюванні, дозволяє – відбирається «стандартний» набір зразків для досліджень.

Стандартний набір зразків для вірусологічних досліджень становить мінімум п'ять хворих/мертвих птахів, якщо є, та/або як мінімум 20 трахеальних/орофарингеальних та 20 клоачних мазків. Слід брати трупи птахів, які щойно померли, або ті, що були тяжко хворими або агонізували і були гуманно вбиті. Зразки легень, трахеї, селезінки, нирки, печінки, серця об'єднуються в один пул.

Стандартний набір зразків для серологічних досліджень становить – мінімум 20 зразків крові.

Відбір матеріалу проводять з дотриманням правил біобезпеки, не допускають потрапляння будь-якої кількості інфікованого матеріалу в зовнішнє середовище.

Відібраний патологічний матеріал поміщають в термос з льодом і направляють до лабораторії протягом 24 год.

В лабораторії роботу з інфікованим матеріалом проводять у спеціальному приміщенні (боксі), обладнаному передбоксником для зміни одягу та індивідуальних засобів захисту.

Зразки патологічного матеріалу та сироваток, що надійшли в лабораторію, звіряють з описом.

Якщо матеріал пересилався з порушенням температурного режиму, пошкодженою упаковкою та контамінованим матеріалом його визнають як зіпсований та знешкоджують будь-якими можливими методами, відповідно складають акти.

2. СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ, ЧУТЛИВІСТЬ МЕТОДІВ ТА КРИТЕРІЇ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

До лабораторних досліджень на грип відносять:

- виділення вірусу на курячих ембріонах з наступною його ідентифікацією;
- полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР);
- визначення інтравенозного індексу патогенності;
- серологічну діагностику; тести, доступні для виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу типу А такі як ІФА, РДП, РЗГА.

Наявність вірусу грипу А може бути підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зворотної транскрипції в режимі реального часу. (RT-PCR з алантоїсних рідин). Виділення збудника грипу в культурі клітин (КК) було замінено, за певних обставин, прямим виявленням у зразках одного або декількох сегментів геному грипу А за допомогою RT-PCR в реальному часі або іншим перевіреним молекулярним методом.

2.1 Схематичний огляд діагностичних кроків для підтвердження ПГ

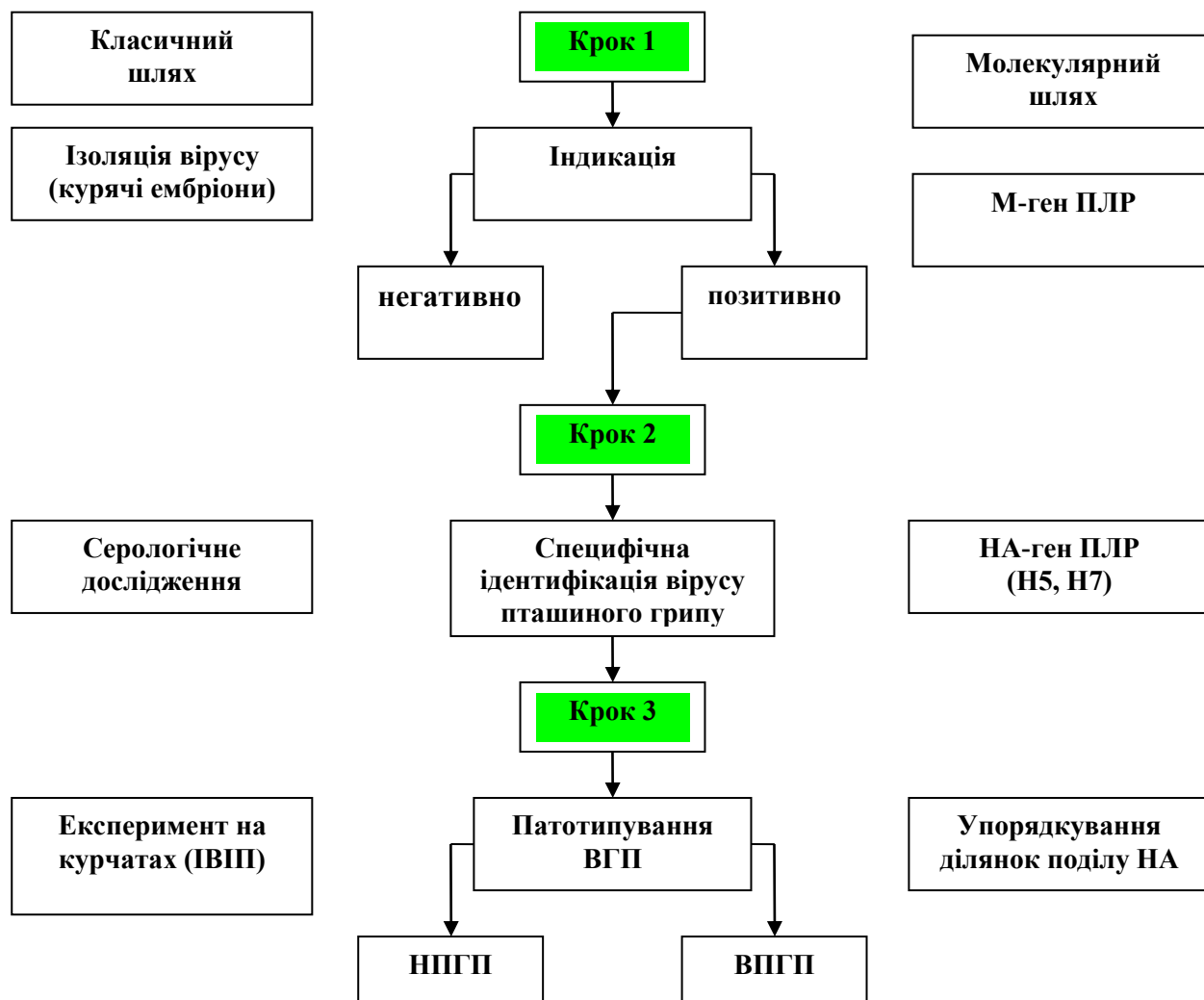
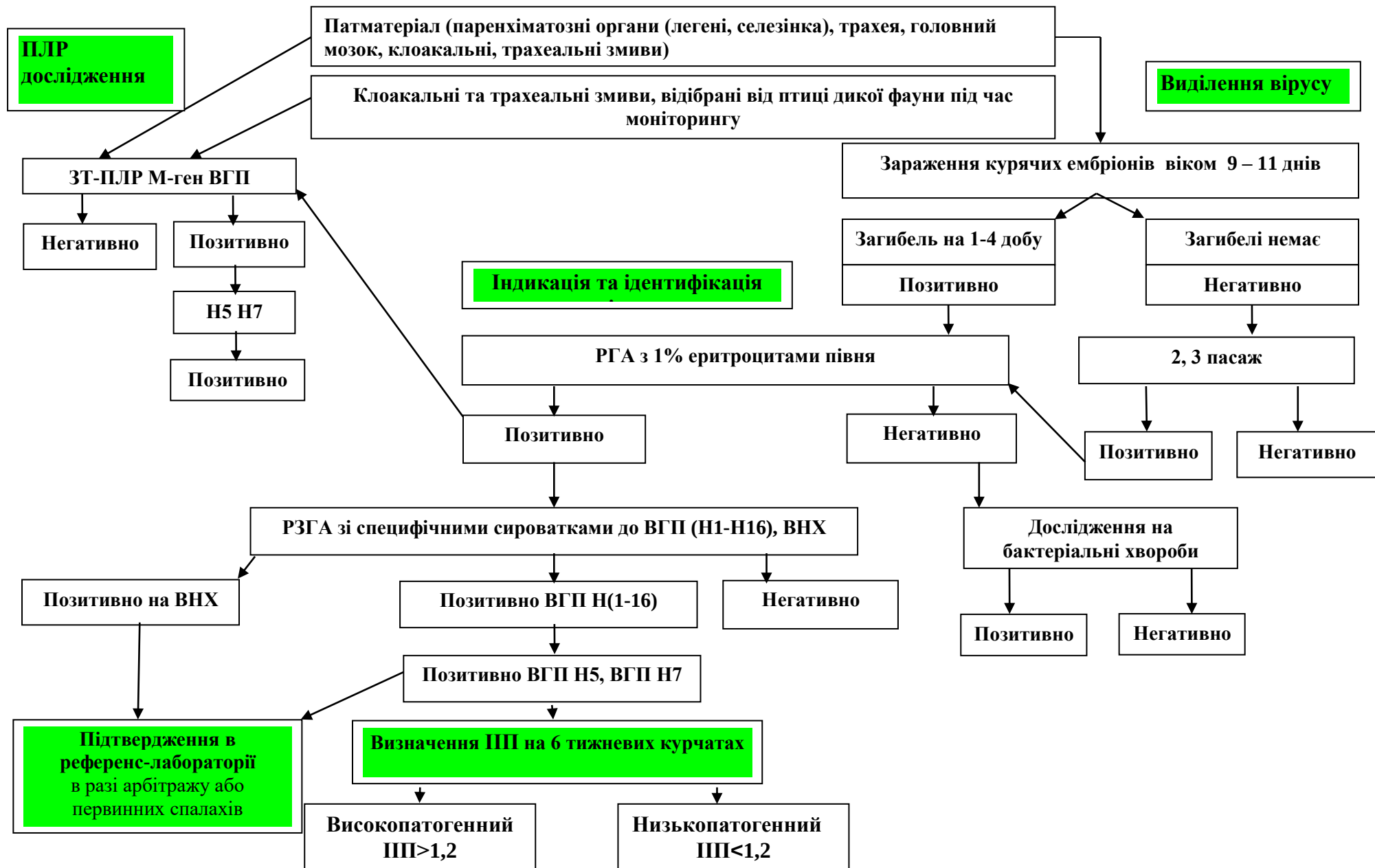


Схема лабораторної діагностики грипу птиці



2.2 Чутливість методів та критерії їхнього застосування для діагностики грипу птиці (табл. 1)

Таблиця 1

Методи діагностики грипу птиці

(за рекомендаціями Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // WOAH.

Методи	Підтвердження статусу господарства вільного від інфекції	Моніторинг від зараження до поширення	Застосування в період політики викорінення	Підтвердження клінічних випадків	Нагляд при поширенні інфекції	Підтвердження імунного статусу після вакцинацій
Ідентифікація агента						
Вірус ізоляція на курячих ембріонах	+	+++	+	+++	+	-
Антиген детекція	+	+	+	+	+	-
RT-PCR	++	+++	++	+++	++	-
Визначення імунної відповіді						
AGID (РДП)	+(грип типу А)	+(грип типу А)	++(грип типу А)	+(у перехворілих)	++(грип типу А)	++(грип типу А)
HI (РЗГА)	+++ (H5 або H7)	++ (H5 або H7)	+++ (H5 або H7)	++ (у перехворілих)	+++ (H5 або H7)	+++ (H5 або H7)
ELISA (ІФА)	+	+	++	+(у перехворілих)	++	++

+++ рекомендований метод; ++ відповідний метод; + може використовуватися в де-яких ситуаціях, але вартість, надійність чи інші фактори суттєво обмежують його застосування; - не підходить для цієї мети.

RT-PCR - ланцюгова реакція полімеразної зворотної транскрипції; AGID – реакція дифузної преципітації; HI - тест на гальмування гемаглютинації; ELISA - імуоферментний аналіз.

3. ВИДІЛЕННЯ ВІРУСІВ ГРИПУ ПТИЦІ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

3.1 Необхідне обладнання та розхідні матеріали:

- Курячі ембріони, ВСП-КЕ або вільні від специфічних антитіл, віком 9–11 днів;
- Шафа біологічної безпеки (клас захисту II);
- Термостат з температурою нагрівання 37–38°C;
- Центрифуга на 3000 об/ хв;
- Подрібнювач тканин або ступка фарфорова;
- Овоскоп;
- Пінцет;
- Ножиці;
- Пробійник;
- Парафін;
- Шприці одноразові на 1мл, 20 мл;
- Фільтр шприцевий з Ø пор 0,45 мкм;
- Скло кварцеве стерильне, бите;
- Піпетки пастерівські;
- Пробірки центрифужні;
- Мікропланшет полістироловий 96-ти лунковий з V-подібним дном;
- Одно- та багатоканальні дозатори.

3.2 Реактиви:

- набір антигенів (гемаглютиніни H1–H16) та сироваток (специфічних до гемаглютинінів H1–H16) для діагностики грипу птиці в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА);
- набір антигену та специфічної сироватки для виявлення антитіл до збудника Ньюкаслської хвороби в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА);
- 0,1М фосфатно-буферний розчин (ФБР) з рН 7,0–7,2 або 0,9% NaCl з рН 7,2;
- антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин);
- 5 % спиртовий розчин йоду;

- 1 % суспензія еритроцитів півня;
- 5 % розчин лимоннокислого натрію або розчин Альсівера;
- дезінфікуючий розчин.

3.3 Приготування суспензії курячих еритроцитів

Для отримання еритроцитів використовують ВСП-курчат або курей, які не мають антитіл до вірусу грипу птиці. Кров відбирають з підкрильцевої вени у пробірку з 5 % розчином лимоннокислого натрію з додаванням фізіологічного розчину або у розчин Альсівера у співвідношенні 1:2.

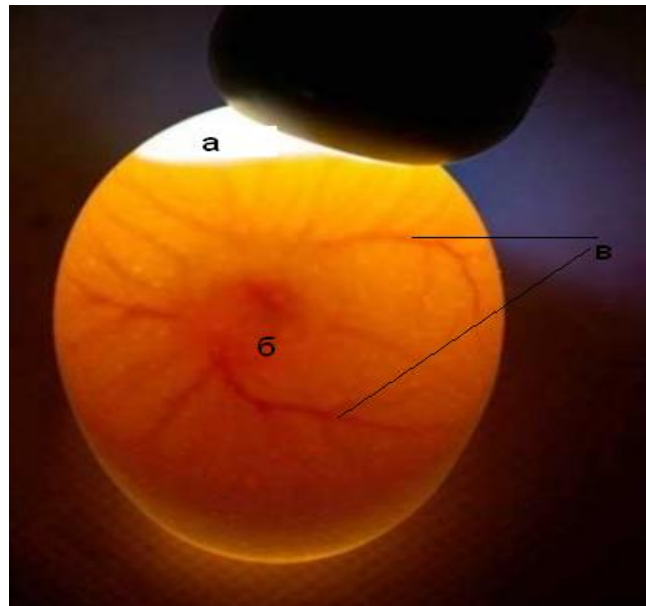
Еритроцити тричі відмивають, від вказаних розчинів, ФБР або ізотонічним розчином натрію хлористого (фізіологічним розчином) шляхом центрифугування протягом 10 хв за 800 g (1500 об/хв). Після кожного відмивання надосадову рідину обережно видаляють, а осад еритроцитів заливають ФБР або ізотонічним розчином натрію хлористого, ресуспендують і центрифугують. В колбу на 100 мл відміряють 99 мл ФБР і додають 1 мл осаду відмитих курячих еритроцитів. Отриману 1 % суспензію курячих еритроцитів зберігають в холодильнику $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ до появи ознак гемолізу.

3.4 Підготовка патологічного матеріалу для дослідження

Патматеріал гомогенізують в стерильному ФБР (або фізіологічному розчині) за допомогою подрібнювача тканин або фарфорової ступки з битим кварцовим склом. Готують 10–20 % суспензію. Стерильною пастерівською піпеткою відбирають гомогенат в стерильну центрифужну пробірку і центрифугують за 1000 g (1500–2000) об/хв) протягом 20 хв. Відбирають надосадову рідину в стерильну пробірку і обробляють антибіотиками (пеніцилін 500 ОД/мл, стрептоміцин 500 мг/мл) або пропускають через шприцевий фільтр з $\varnothing$ пор 0,45 мкм. Витримують 60 хв за кімнатної температури та роблять посів на МПБ для визначення стерильності.

3.5 Зараження курячих ембріонів

Перед зараженням проводять попередню овоскопію ембріонів, відмічають межу пуги і місце знаходження ембріону (рис. 1) Шкаралупу зі сторони пуги та місце проколу фламбують. Роблять отвір в ділянці між кровоносними судинами, відступаючи 5 мм від краю пуги, і за допомогою шприцу інокулюють в алантоїсну порожнину 0,2 мл досліджуваного матеріалу (на одне дослідження заражають не менше 5 курячих ембріонів) (рис. 2).



**Рис. 1 Овоскопія курячого ембріону: а – повітряна камера (пуга);
б – ембріон; в – кровоносні судини**

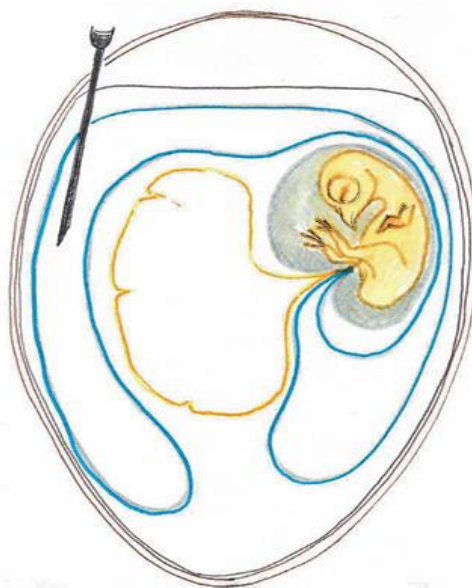


Рис. 2. Зараження курячого ембріону в алантоїсну порожнину

Отвір в шкаралупі заливають парафіном. Заражені і контрольні (не заражені) ембріони інкубують в термостаті за температури $+(35-37)^{\circ}\text{C}$ протягом 4–7 діб.

Протягом всього періоду інкубації проводять овоскопію ембріонів 2 рази на добу вранці та ввечері (ембріони, які загинули, зберігають в холодильнику до закінчення строку інкубації решти ембріонів, після чого їх досліджують разом з живими, охолодженими ембріонами). Після закінчення інкубації усі ембріони охолоджують за температури $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 12–18 годин і проводять розтин.

Перед розтином шкаралупу над пугою дезінфікують 5 % спиртовим розчином йоду і фламбуванням. Відбирають екстраембріональну алантоїсно-амніотичну рідину в стерильні пробірки від кожного ембріону окремо (рис. 3).

Проби екстраембріональної рідини, відібрані з кожного ембріона, досліджують індивідуально на наявність в них вірусу шляхом постановки РГА або іншими доступними типоспецифічними тестами на грип А, наприклад ІФА антиген або ПЛР.

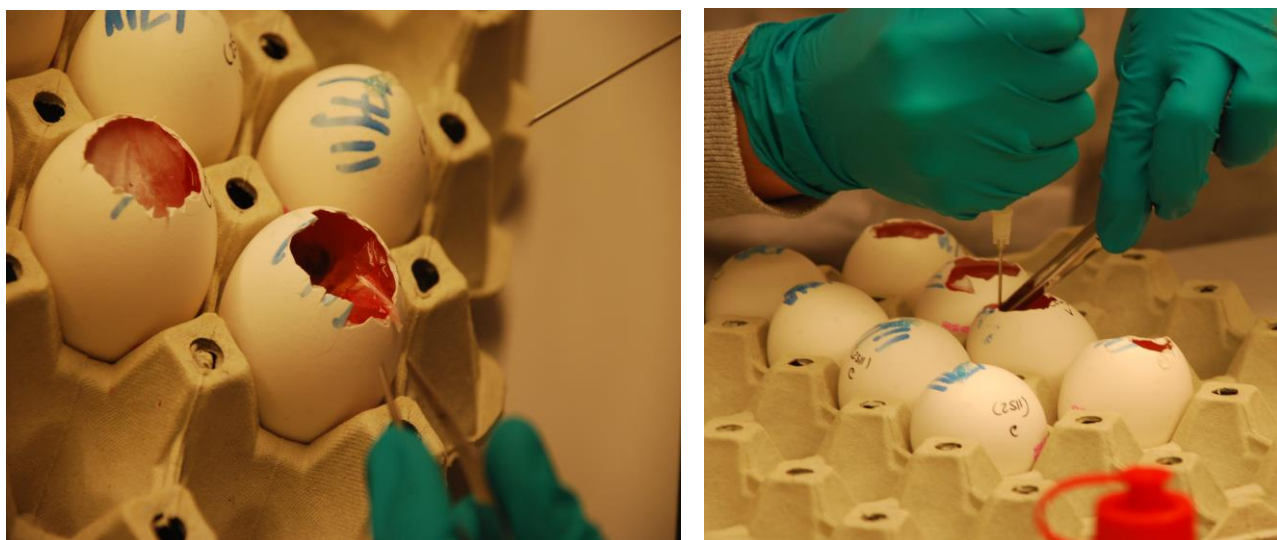


Рис. 3 Відбір алантоїсно-амніотичної рідини

Пробу досліджуваного матеріалу вважають негативною, якщо в двох послідовних пасажах не буде виявлено гемаглютинації еритроцитів і загибелі заражених ембріонів. При наявності гемаглютинації еритроцитів проводять ідентифікацію виділеного вірусу в РЗГА з використанням штамоспецифічних,

імунних до вірусу грипу птиці сироваток та сироватки, специфічної до ньюкаслської хвороби птиці.

3.6 Визначення гемаглютинуючої активності вірусу в РГА

Починаючи з другої лунки і до кінця ряду планшету вносять у об'ємі 25 мкл ФБР. У першу та другу лунки мікропланшету вносять 25 мкл екстраембріональної рідини від кожного ембріону окремим наконечником. Готують двократні розведення алантоїсної рідини. З останньої лунки 25 мкл видаляють в дезрозчин. В кожну лунку з досліджуваною екстраембріональною рідиною вносять 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів курей і залишають за кімнатної температури +(20–22°C) на 30–40 хв. Паралельно ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (25 мкл фізрозчину + 25 мкл суспензії еритроцитів) (рис. 5).

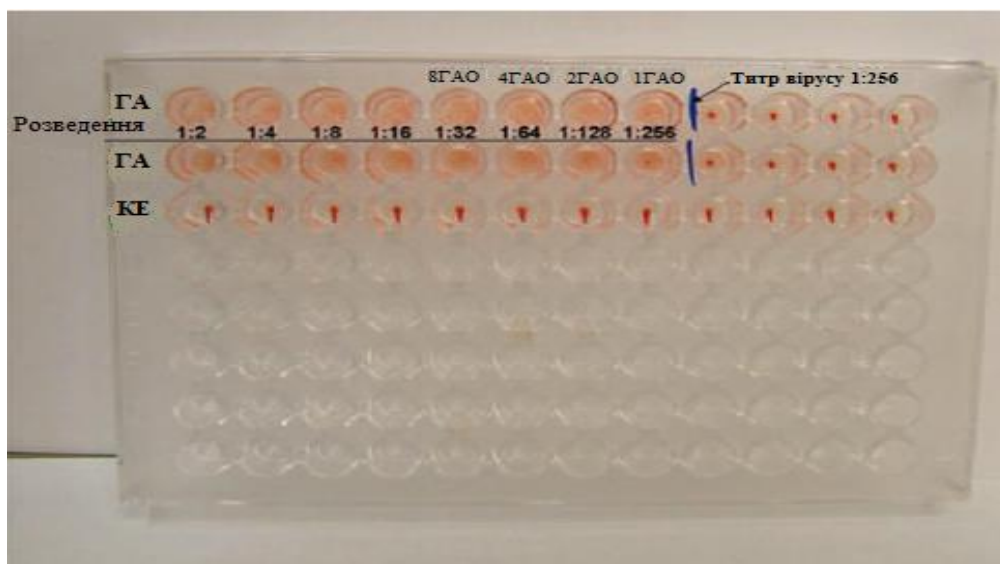


Рис. 5. Реакція гемаглютинації (РГА).

Реакцію оцінюють візуально після повного осідання еритроцитів в контрольних лунках. РГА вважають позитивною за наявності на дні лунки осаду еритроцитів у вигляді «парасольки», негативною – у вигляді «гудзика».

За відсутності РГА екстраембріональну рідину в кількості 1 мл від кожного зараженого ембріону з'єднують і проводять додатковий пасаж на 9-11 добових курячих ембріонах. Якщо титри гемаглютининів в РГА низькі (менші, ніж 1:16), то проводять декілька додаткових пасажів.

При оцінці результату РГА визначають наявність або відсутність гемаглютинуючого вірусу та титр гемаглютинуючої активності. Зразки екстраембріональної рідини з високим титром гемаглютинуючої активності (більше ніж 1:16) використовують для ідентифікації вірусу в РЗГА.

3.7 Ідентифікація виділеного вірусу в РЗГА

Ідентифікація виділеного вірусу проводиться в РЗГА з використанням специфічних сироваток до ВГП (Н1–Н16) та ньюкаслської хвороби.

Після визначення титру дослідного вірусу в РГА його ідентифікують в РЗГА. Спочатку визначають робочу дозу вірусу (4 ГАО). Для визначення робочої дози граничний титр вірусу (1 ГАО) ділять на 4, наприклад: якщо 1 ГАО становить 1:64, то для отримання 4 ГАО потрібно $64:4 = 16$. Отже, для приготування робочого розведення вірусу, який містить 4 ГАО в 25 мкл, беруть 1 мл вихідного вірусу і додають 15 мл ФБР.

Перед постановкою головного досліду перевіряють правильність вибраної робочої дози. Для цього в 4 лунки планшету вносять по 25 мкл ФБР. В першу лунку вносять 25 мкл робочої дози вірусу, піпетують і переносять 25 мкл в другу лунку і т.д. З четвертої лунки 25 мкл розведеного вірусу видаляють в дезрозчин. Знову вносять в кожную лунку по 25 мкл ФБР та по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів. Паралельно ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (50 мкл ФБР + 25 мкл суспензії еритроцитів).

При правильному визначенні робочої дози в першій і другій лунках повинна бути повна аглютинація, в третій – часткова, в четвертій – аглютинація еритроцитів відсутня.

Підібрану робочу дозу вірусу використовують тільки протягом одного робочого дня.

3.8 Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА)

Дослідження слід проводити паралельно з використанням 16-ти специфічних сироваток до ВГП Н1-Н16 та ньюкаслської хвороби.

В ряд лунок вносять по 25 мкл ФБР. В першу лунку вносять по 25 мкл специфічної сироватки, суміш піпетують і переносять 25 мкл в третю лунку і т.д. Потім в лунки вносять по 25 мкл робочої дози вірусу (4 ГАО). Інкують 30 хв за кімнатної температури та додають в усі лунки по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів

Контролі реакції:

- контроль сироватки на ізоаглютинацію (25 мкл сироватки + 25 мкл ФБР + 25 мкл суспензії еритроцитів);
- контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (50 мкл фізрозчину + 25 мкл суспензії еритроцитів).

Реакцію оцінюють візуально після повного осідання еритроцитів в контрольних лунках.

3.9 Облік результатів

РЗГА вважають позитивною за наявності на дні лунки осаду еритроцитів у вигляді “гудзика” (затримка гемаглютинації), негативною – у вигляді “парасольки” (гемаглютинація).

Вірус вважають ідентифікованим, якщо в РЗГА специфічна сироватка реагує з дослідним антигеном в титрі не нижче одного розведення, встановленого з гомологічним антигеном. При цьому позитивна реакція дослідного вірусу з штамоспецифічними сироватками до інших вірусів і нормальною сироватками повинна бути відсутньою. При серологічній діагностиці високопатогенного грипу птиці бажано використовувати щонайменше дві сироватки з одним підтипом гемаглютиніну та різною нейрамінідазою (H5N1, H5N3, H7N7, H7N3) з метою уникнення перехресної реакції з іншими підтипами гемаглютиніну з гомологічною нейрамінідазою.

4. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТРАВЕНОЗНОГО ІНДЕКСУ ПАТОГЕННОСТІ ЗБУДНИКА ГРИПУ ПТИЦІ

4.1 Необхідне обладнання та витратні матеріали:

- Свіжа ВГП-утримуюча алантоїсна рідина від інфікованих КЕ з титром гемаглютинуючої активності $>1:16$ (2^4 ; $4\log_2$);
- ВСП-курчата або курчата вільні від антитіл до ВГП 4-8 тижневого віку;
- Бокс для зараження птиці;
- Шприці одноразові на 1мл;
- Стерильна вата;
- Спирт;
- Разові латексові рукавиці.

4.2 Методи визначення інтравенозного індексу патогенності (ІП) грипу птиці

Інтравенозний індекс патогенності (ІП) визначають 2-ма методами, що відрізняються дозою зараження піддослідної птиці:

Метод № 1: алантоїсну рідину розводять стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10 і заражають внутрішньовенно 8 курчат 4-8 тижневого віку в дозі 0,2 мл. Спостерігають за курчатами протягом 10 діб.

Облік результатів: збудник грипу птиці вважають високопатогенним, якщо він викликає загибель 8, 7 або 6 заражених курчат протягом 10 діб.

Метод № 2: для визначення ІП використовують алантоїсну рідину, яка має титр вірусу вищий, ніж 1:16 (2^4 ; $4\log_2$). Розводять алантоїсну рідину стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10 і заражають 10 курчат внутрішньовенно в дозі 0,1 мл. Проводять клінічний огляд курчат з інтервалом 24 год протягом 10 діб.

Приклад підрахунку ІІІ

Стан здоров'я	День спостереження										Загальна кількість балів за станом здоров'я курчат впродовж 10 діб
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й	
	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	загальна к-ть балів	
здорове (0 балів)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$0 \times 0 = 0$
хворе (1 бал)	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0	$12 \times 1 = 12$
важко хворе (2 бала)	4	5	6	4	2	0	0	0	0	0	$21 \times 2 = 42$
загинуло (3 бала)	0	1	2	6	8	10	10	10	10	10	$67 \times 3 = 201$
Загальна кількість балів	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100

$$ВІПІЗГП = \frac{0 + 12 + 42 + 201}{100} = 2,55$$

Примітка: для всіх вірусів серотипів H5 і H7, які мають низьку патогенність на курчатах, необхідно визначити амінокислотну послідовність гемаглютиніну. Якщо послідовність подібна до тої, яка спостерігається в ізолятів високопатогенного збудника грипу птиці, то досліджуваний збудник грипу птиці вважають високопатогенним.

Кожне курча оцінюють за 4-х бальною шкалою від 0 до 3 (0 – курча без клінічних ознак; 1 – хворе курча; 2 – важко хворе курча; 3 – курча загинуло). Курча вважають хворим, якщо воно має одну із слідуючих клінічних ознак: ознаки ураження органів дихання, депресію, діарею, ціаноз оголених ділянок тіла, сережок, набряк голови, нервові розлади; важко хворим – якщо воно має декілька вище зазначених клінічних ознак. Якщо курча загинуло, його оцінюють балом «3», і в подальші дні також оцінюють балом «3».

Примітка: якщо курча надто хворе і не може їсти і пити, його гуманно забивають і оцінюють як загибле.

Облік результатів: збудник грипу птиці вважають високопатогенним, якщо ІІІ вищий, ніж 1,2, якщо нижче – низькопатогенним.

5. СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ

Дослідження сироваток крові птиці з метою виявлення антитіл до вірусу грипу птиці проводять у спеціалізованих лабораторіях. Сироватки крові досліджують методами ІФА, РДП та РЗГА.

Методи ІФА та РДП застосовують для виявлення антитіл до групових антигенів вірусу грипу А і у разі отримання позитивного результату потребують визначення підтипу в РЗГА щодо Н5 та Н7. Недолік РДП – тест специфічний, але з обмеженою чутливістю може бути використаний для оцінки епізоотичного статусу поголів'я птиці (курей, індичок). Цей тест не може бути використаний для досліджень сироваток крові водоплавної та інших видів птиці, оскільки водоплавні птахи не продукують преципітуючі антитіла.

Існує велика кількість комерційних наборів для проведення досліджень на виявлення антитіл у сироватках крові методом ІФА, включаючи непрямий метод, блокуючий або конкурентний метод з використанням моноклональних антитіл. Кожний такий набір повинен бути випробуваний і валідований виробником. Кожний набір для проведення досліджень методом ІФА супроводжується детальною настановою до застосування, яка є обов'язковою до виконання.

5.1 Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА)

РЗГА застосовують для визначення серотипу грипу за наявності специфічних антитіл (антитіл до гемаглютиніну). При серологічній діагностиці високопатогенного грипу птиці бажано використовувати щонайменше два антигени з одним підтипом гемаглютиніну та різною нейрамінідазою (H5N1, H5N3, H7N7, H7N3) з метою уникнення перехресної реакції з іншими підтипами гемаглютиніну з гомологічною нейрамінідазою.

5.2 Необхідне обладнання, реактиви та розхідні матеріали

- Набір антигенів (гемаглютиніни H1-H16) та сироваток (специфічних до гемаглютинінів H1-H16) для діагностики грипу птиці в реакції затримки гемаглютинації;
- – Центрифуга (800 g);
- – Водяна баня (58-60°C); апарат Кіппа;
- – Градуйований циліндр на 100 мл; колби на 50, 100 мл;
- – Пластикові, одноразові мікроплашки з „V” – подібним дном;
- – Одно- та багатоканальні дозатори зі змінними наконечниками;
- – Одноразові наконечники (5-200 мкл);
- – Ванночки для реактивів;
- – 0,1 М ФБР з рН 7,0-7,2 або 0,9 % розчин NaCl з рН 7,0– 7,2;
- 1 % суспензія еритроцитів півня;
- 2-3 % розчин лимоннокислого натрію;
- Крейда х/ч;
- Соляна кислота – 30 % розчин;
- Дезінфікуючий розчин;
- Дистильована вода.

5.3 Підготовка сироваток крові для дослідження

Кров відбирають з підкрильцевої вени або шляхом скарифікації гребня, збирають в стерильні пробірки, попередньо зволожені стерильним фізіологічним розчином. Згусток крові, що утворився, відділяють від стінок пробірки тонким металевим стержнем або пастерівською піпеткою і витримують за кімнатної температури +(19–25)°C протягом 12–18 годин або в термостаті (+37°C) 60 хв, а потім у холодильнику за температури +(2–8)°C впродовж 8–10 год. Відстояну сироватку зливають в чисті пробірки і прогрівають в водяній бані за температури +56°C впродовж 30 хв з метою видалення термолабільних інгібіторів. Сироватки крові курей дуже рідко дають неспецифічні реакції і тому не потребують ніякої додаткової обробки. Сироватки крові інших видів птиці можуть викликати

аглотинацію еритроцитів курей. Тому в разі виявлення такої особливості проводять додаткову обробку сироваток еритроцитами курей. Для цього 0,025 мл осаду еритроцитів додають до 0,5 мл сироватки, злегка струшують і лишають на 30 хв. Еритроцити осаджують центрифугуванням за 800g (1500об/хв) впродовж 5 хв. Обережно відбирають сироватку, не торкаючись осаду, переносять в чисту пробірку і використовують в РЗГА.

Для видалення термолабільних інгібіторів сироватку крові для дослідження на грип розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:8 та прогрівають на водяній бані за +58°C впродовж 30 хв. Кожну пробу сироватки крові обробляють CO₂ протягом 2-3 хв, після чого центрифугують за 800 g (1500 об/хв). Допускається видалення термостабільних інгібіторів за допомогою фільтрату холерного вібріону, перйодату калію, сухого льоду.

Гемолізовані або контаміновані сироватки не досліджують.

5.4 Визначення гемаглютинуючого титру вірусу в РГА

Антигени в ампулах (флаконах) розчиняють до початкового об'єму, вказаного на етикетці. В ряд лунок мікроплашки вносять по 25 мкл ФБР. В першу лунку вносять 25 мкл антигену вірусу грипу птиці. Новим наконечником тричі піпетують і переносять 25 мкл в наступну лунку і т. д. З останньої лунки після піпетування видаляють 25 мкл в дезрозчин. В усі лунки з розтитрованим антигеном вносять по 25 мкл ФБР та по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів.

В три лунки вносять по 50 мкл ФБР і 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів, (контроль еритроцитів на відсутність спонтанної аглотинації). Мікроплашку акуратно струшують і залишають за кімнатної температури +(18–22°C) на 40 хв або в умовах холодильника +(4°C) на 60 хв. Облік реакції проводять після повного осідання еритроцитів у вигляді «гудзика» в контрольних лунках.

РГА оцінюють позитивно при осіданні еритроцитів у вигляді «парасольки», негативно – у вигляді «гудзика» за відсутності спонтанної аглотинації в контролі реакції. За титр антигену приймають його найбільше розведення, яке дало чітко виражену аглотинацію еритроцитів у вигляді «парасольки», що відповідає 1 ГАО.

5.5 Розрахунок та контроль робочої дози антигену

Для одержання робочої дози (4 ГАО) антиген, виходячи з його титру, встановленого в РГА, розводять ФБР в стільки разів, скільки отримують від ділення його титру на 4. (Приклад: титр антигену в РГА становить 1:256, $256 : 4 = 64$, тобто 63 мл ФБР і 1мл вихідного антигену). Робочу дозу антигену готують безпосередньо перед постановкою реакції.

Для контролю робочої дози антигену в 4 лунки мікроплашки вносять по 25 мкл ФБР. В першу лунку вносять 25 мкл робочої дози антигену, тричі піпетують і переносять у наступну лунку і т.д. З четвертої лунки після піпетування 25 мкл видаляють в дезрозчин. В усі лунки з розтитрованим антигеном вносять по 25 мкл ФБР та по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів.

Для контролю реакції вносять в три лунки мікроплашки по 50 мкл ФБР і 25мкл 1 % суспензії еритроцитів. Мікроплашку акуратно струшують і залишають за кімнатної температури $+(18-22^{\circ}\text{C})$ на 40 хв або в умовах холодильника $+4^{\circ}\text{C}$ на 60 хв. Реакцію враховують після повного осідання еритроцитів у вигляді «гудзика» в контрольних лунках.

При правильному виборі робочої дози в першій і другій лунках буде повна аглютинація, в третій – часткова, в четвертій – аглютинація відсутня.

5.6 Визначення титру антитіл в пробах сироваток крові в реакції затримки гемаглютинації

В усі лунки мікроплашки вносять по 25 мкл ФБР. У першу лунку ряду вносять 25 мкл досліджуваної сироватки, тричі піпетують, переносять у наступну лунку і т.д. В усі лунки з сироватками вносять по 25 мкл робочого розведення антигену, струшують і залишають на 30 хв за кімнатної температури (або 60 хв за температури $+(2-8)^{\circ}\text{C}$). В кожную лунку вносять по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів, обережно струшують і залишають за кімнатної температури на 40 хв (або 60 хв за температури $+(2-8)^{\circ}\text{C}$) (рис. 6).

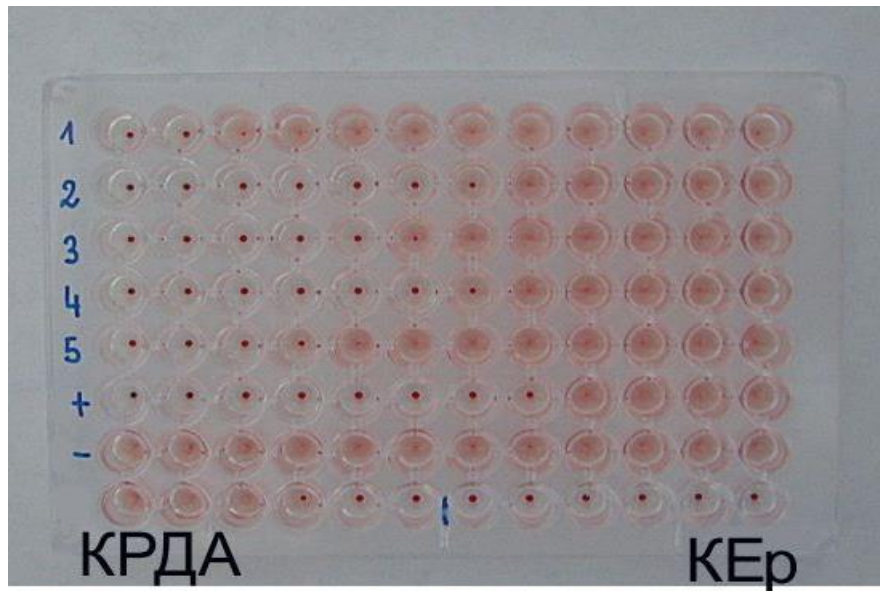


Рис. 6. Реакція затримки гемаглютинації

Одночасно вносять контролі реакції:

–контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію. До подвійного об'єму ФБР додають по 25 мкл 1 % суспензії еритроцитів. Аглютинація еритроцитів повинна бути відсутня. За наявності спонтанної аглютинації еритроцитів їх замінюють.

–контроль сироваток на відсутність ізоаглютинації. Для цього вносять в лунки 25 мкл фізіологічного розчину, додають рівні об'єми дослідної сироватки та 1 % суспензії еритроцитів. Аглютинація еритроцитів повинна бути відсутня.

5.7 Облік та інтерпретація результатів

Реакцію оцінюють візуально після повного осідання еритроцитів в контрольних лунках. Титром сироватки вважають найбільше її розведення, в якому повністю відсутня аглютинація еритроцитів антигеном вірусу грипу.

Результат дослідження вважають позитивним, якщо титр сироватки становить 1:16 ($4,0 \log_2$) і вище.

При використанні 8 ГАО результат дослідження вважають позитивним, якщо титр сироватки становить $3,0 \log_2$ 1:8 і вище.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Грип птиці. Епізоотологія, діагностика, профілактика / Стегній Б.Г., Головка А.М., Музика Д.В., Бісюк І.Ю. і ін. Харків: НТМТ, 2010.
2. ДСП 9.9.5.-080-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю. Державні санітарні правила. [Чинний від 2002-01-28]. Міністерство охорони здоров'я України. Державна санепідеміологічна служба. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0001588-02>.
3. Ilaria Capua, Dennis J. Alexander. Avian Influenza and Newcastle Disease. A Field and Laboratory Manual. Italia: Springer-Verlag, 2009. 186 P. <https://doi.org/10.1007/978-88-470-0826-7>.
4. Інструкція з профілактики та ліквідації грипу птиці, затверджена Міністерством аграрної політики та продовольства України 17.10.2011 №547 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1277-11>
5. Commission decision of 4 august 2006 approving a Diagnostic Manual establishing for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC. URL: <http://data.europa.eu/eli/dec/2006/437/oj>
6. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електронний ресурс] // OIE. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf
7. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T. & Suarez D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. Jurnal of clinical microbiology. Volume 40 (9), P. 3256–3260. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>.
8. Wood G.W., Mccauley J.W., Bashiruddin J.B. & Alexander D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes: Archives of Virology. Volume 130, P. 209 – 217. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>.

Приготування розчину Альсівера

В 1000 мл дистильованої води розчиняють:

- 18,7 г глюкози,
- 4,2 г хлориду натрія,
- 8 г лимонно-кислого натрія,
- 0,5 г лимонної кислоти.

Розчин доводять до кипіння, охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр, розливають в колби або флакони із зручним об'ємом та стерилізують в автоклаві за температури + (103 – 105)°C впродовж 30 хв.

Приготування розчину цитрату натрію

До 100 мл дистильованої води додають 0,85 гр. хлористого натрію та 3-5 гр. цитрату натрію.

Розчин доводять до кипіння, охолоджують, фільтрують через паперовий фільтр, розливають в колби або флакони із зручним об'ємом та стерилізують в автоклаві за температури + (103 – 105)°C впродовж 30 хв.

Приготування забуференого фізіологічного розчину

Необхідно в 1 літрі бідистильованої води розчинити:

- 8,0 г натрію хлористого;
- 2,83 г натрію фосфорнокислого двозаміщеного 12-водного (або 1,22 г 2-водного);
- 0,2 г калію фосфорнокислого.

Виміряти рН розчину і довести його до показника 7,0-7,2.

ДРОЖЖЕ Жанна Миколаївна
кандидат ветеринарних наук, старший дослідник, старший науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

ДЕДОК Людмила Анатоліївна
молодший науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

РУДОЙ Олексій Васильович
кандидат ветеринарних наук, в.о. завідувача науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

СУШКО Микола Іванович
завідувач науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

РАДЗИХОВСЬКИЙ Микола Леонідович
професор, доктор ветеринарних наук, провідний лікар науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

МАНДИГРА Світлана Станіславівна
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

УХОВСЬКИЙ Віталій Вікторович
професор, доктор ветеринарних наук, завідувач науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб ДНДІЛДВСЕ

ПІЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович
кандидат ветеринарних наук, директор ДНДІЛДВСЕ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ. ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ ВІРУСОЛОГІЧНИМИ ТА СЕРОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

В авторській редакції

Підписано до друку __. __. ____ р. Формат _____
Папір друк. №2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)