

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



**ДІАГНОСТИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ
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 Державної служби 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., Алексеєва Г. Б., Мандигра С. С., Коваленко В. Л.

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.

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

Уховський В. В. – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач науково-дослідного відділу епізоотології та інфекційних хвороб Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Діагностика ньюкаслської хвороби вірусологічними та серологічними методами : метод. рекомендації. (2025). Дрожже Ж.М., Дедок Л.А., Рудой О.В., Сушко М.І., Алексеєва Г.Б., Мандигра С.С., Коваленко В.Л.; К: ДНДІЛДВСЕ, 2025; 27 с.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних державних лабораторій Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів факультету «Ветеринарна медицина» та описують методи діагностики ньюкаслської хвороби, що зазначені в Рекомендаціях щодо стандартних діагностичних тестів і вакцин (Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / Office International des Epizootic (WOAH) згідно вимог Міжнародного епізоотичного бюро та Всесвітньої організації охорони здоров'я.

ЗМІСТ

	СПИСОК ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	4
	ВСТУП	5
1	ВІДБІР ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ	7
2	СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ, ЧУТЛИВІСТЬ МЕТОДІВ ТА КРИТЕРІЇ ЗАСТОСУВАННЯ	9
3	ВИДІЛЕННЯ ВІРУСІВ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ ТА ЙОГО ІДЕНТИФІКАЦІЯ	11
3.1	Необхідне обладнання та розхідні матеріали	11
3.2	Реактиви	11
3.3	Приготування суспензії курячих еритроцитів	12
3.4	Підготовка патологічного матеріалу для дослідження	12
3.5	Зараження курячих ембріонів	13
3.6	Визначення гемаглютинуючої активності вірусу в РГА	14
3.7	Ідентифікація виділеного вірусу в РЗГА	15
3.8	Постановка реакції затримки гемаглютинації (РЗГА)	16
3.9	Облік результатів	17
4	ВИЗНАЧЕННЯ ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОГО ІНДЕКСУ ПАТОГЕННОСТІ ЗБУДНИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ	17
4.1	Необхідне обладнання та розхідні матеріали	17
4.2	Проведення дослідження	17
5	СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ	19
5.1	Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА)	19
5.2	Необхідне обладнання, реактиви та розхідні матеріали	19
5.3	Підготовка сироваток крові для дослідження	20
5.4	Визначення гемаглютинуючого титру вірусу в РГА	21
5.5	Розрахунок та контроль робочої дози антигену та постановка РЗГА	21
5.6	Облік результатів	23
5.7	Інтерпретація результатів	24
	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	25
	ДОДАТОК	26

СПИСОК ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

ВГП – вірус грипу птиці;

ВНХ – вірус ньюкаслської хвороби;

ВППП – високо патогенний грип птиці;

ВСП – вільні від специфічних патогенів;

ВСП-КЕ – курячі ембріони вільні від специфічних патогенів;

ГАО – гемаглютинуюча одиниця;

ІП – інтравенозний індекс патогенності;

ІФА – імуноферментний аналіз;

ІЦПЗНХ – інтрацеребральний індекс патогенності збудника ньюкаслської хвороби птиці;

КЕ – курячі ембріони;

КЕР – контроль еритроцитів;

КРДА – контроль робочої дози антигену;

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

НХ – ньюкаслська хвороба;

РГА – реакція гемаглютинації;

РДП – реакція дифузної преципітації;

РЗГА – реакція затримки гемаглютинації;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

ФБР – фосфатно-буферний розчин.

ВСТУП

Ньюкаслська хвороба (псевдочума, азіатська чума курей, хвороба Філарет, хвороба Ранікхет)-*Newcastle disease (Pseudopestis avium, Avian pneuтоencephalitis)* – особливо небезпечне висококонтагіозне вірусне захворювання птиці, що характеризується ураженнями центральної нервової системи, респіраторних, вісцеральних органів та високою смертністю.

Збудником хвороби є РНК-вмісний вірус, який належить до родини *Paramyxoviridae*, роду *Avulavirus*, типу *Avian Paramyxovirus-1* (APMV-1). На тепер, родина *Paramyxoviridae* налічує 21 серотип параміксовірусів.

Вірус здатний інфікувати щонайменше 236 видів птахів, у тому числі більшість видів диких і домашніх птахів, особливо чутливі до захворювання домашні кури. Інтенсивність захворювання варіює в залежності від виду птиці та штаму вірусу. Низькопатогенні штами можуть викликати значне захворювання, якщо хвороба ускладниться бактеріальною інфекцією або за несприйнятливих обставин навколишнього середовища.

Однією з найбільш характерних особливостей різних штамів вірусу ньюкаслської хвороби є значна варіабельність патогенності для курей. Штами вірусу ньюкаслської хвороби згруповані у п'ять патотипів в залежності від клінічних ознак, які виникають у інфікованих курей:

1. Вісцеротропні велогенні штами – викликають таку форму хвороби, яка характеризується високою патогенністю, дуже часто з геморагічним ураженням кишківника;
2. Нейротропні велогенні штами – характеризуються ураженням респіраторного тракту, нервовими явищами і високою летальністю;
3. Мезогенні штами – викликають респіраторні симптоми, іноді супроводжуються ознаками ураження нервової системи, але рівень смертності невисокий;
4. Лентогенні, або респіраторні – можуть викликати захворювання з легкими або субклінічними ознаками ураження респіраторного тракту;

5. Асимптомитичні ентеричні – можуть викликати таку форму захворювання, яка перебігає як субклінічна ентероінфекція.

Кожна з цих форм рідко зустрічається в чистому вигляді і навіть під час зараження ВСП курчат окремим штамом можуть бути значні відхилення. Але характерні клінічні симптоми і ураження різних органів специфічні для всіх вірулентних патотипів повинні викликати підозру на ньюкаслську хворобу.

Клінічні ознаки ньюкаслської хвороби та грипу птиці схожі, тому важко зразу запідозрити остаточний діагноз. Діагноз встановлюється шляхом вірусологічних досліджень – виділення ізолятів вірусу НХ та їх ідентифікації. Для підтвердження діагнозу необхідно проводити визначення вірулентності виділених ізолятів – визначати: інтрацеребральний індекс патогенності збудника ньюкаслської хвороби птиці (ІЦПЗНХ).

Віруси НХ мають гемаглютинуючі властивості щодо еритроцитів птиці, а також еритроцитів людини, на чому й базується серологічна діагностика захворювання за методикою реакції затримки гемаглютинації еритроцитів (РЗГА).

1. ВІДБІР ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

При підозрі на НХ в лабораторію направляють свіжі трупи або хвору птицю, внутрішні органи (легені, повітряні мішки, серце, селезінку, печінку, нирки, трахею, кишечник (разом з вмістом)), головний мозок, трахеальні або клоакальні мазки, проби свіжого посліду, кров від хворої та перехворілої птиці, з якої потім отримують сироватки крові.

Від загиблої птиці під час проведення патолого-анатомічного розтину відбирають шматочки вище вказаних внутрішніх органів.

Від живої птиці відбирають трахеальні і клоакальні мазки. Для відбору зразка з трахеї необхідно ввести стерильний зонд з ватним тампоном в трахею (через ротоглотку) и 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 значення рН ФБР доводять до 7,0-7,4). Для прикладу, можна застосувати такі антибіотики: пеніцилін (200 Од/ мл), стрептоміцин (2 мг/ мл), гентаміцин (50 мкг/ мл), мікостатін (1000 Од/ мл).

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

Стандартний набір зразків для вірусологічних досліджень: як 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. Також відбираються зразки легень, трахеї, селезінки, нирки,

печінки, серця та об'єднуються в один пул. Проби фекалій та зраки кишківника відбираються окремо (для ПЛР досліджень).

Стандартний набір зразків для серологічних досліджень: відбирають як 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.

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

Роботу з інфікованим матеріалом проводять у спеціальному приміщенні (боксі), обладнаному передбоксом для зміни одягу та індивідуальних засобів захисту.

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

Упаковка має бути герметична, в разі виявлення пошкодження цілісності, проводяться заходи для деконтамінації матеріалу, за неможливості проведення деконтамінації, матеріал знешкоджують будь-якими можливими методами та складають акт.

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

Лабораторні дослідження на ньюкаслську хворобу включають:

- виділення вірусу з патологічного матеріалу на курячих ембріонах з наступною його ідентифікацією;
- полімеразна ланцюгова реакція зворотної транскрипції;
- визначення інтрацеребрального індексу патогенності на курчатах віком від 24 до 40 год;
- серологічна діагностика: реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), імуоферментний аналіз (ІФА).

Чутливість методів та критерії їхнього застосування для діагностики ньюкаслської хвороби наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Методи діагностики ньюкаслської хвороби

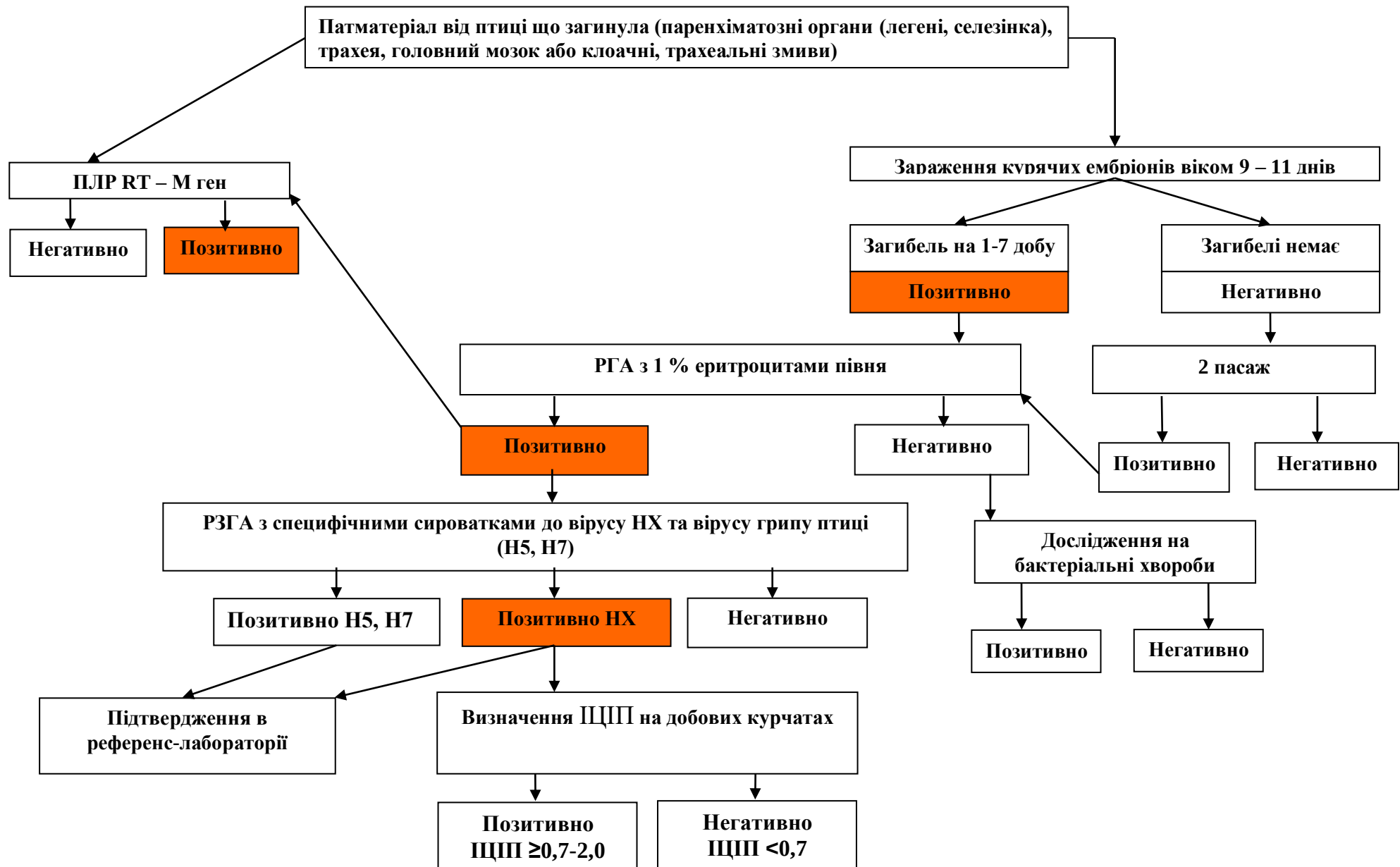
(за рекомендаціями Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // WOAH.

Методи	Підтвердження статусу господарства вільного від інфекції	Моніторинг від зараження до поширення	Застосування в період політики викорінювання	Підтвердження клінічних випадків	Нагляд при поширенні інфекції	Підтвердження імунного статусу після вакцинацій
Ідентифікація агента						
Вірусізоляція на курячих ембріонах	-	+++	+	+++	+	-
ПЛР та секвенування	+	++	+	+++	+	-
RT-PCR	++	+++	++	+++	+	-
Визначення імунної відповіді						
ELISA (ІФА)	+	+	++	-	++	++
HI (РЗГА)	-	-	+	-	++	+++

+++ 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 - імунодифузія в агаровому гелі; HI - тест на гальмування гемаглютинації; ELISA - імуоферментний аналіз.

Схема лабораторної діагностики НХ птиці



3. ВИДІЛЕННЯ ВІРУСІВ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

3.1 Необхідне обладнання та розхідні матеріали:

- Курячі ембріони, ВСП-КЕ або вільні від специфічних антитіл, віком 9-11 днів;
- Шафа ламінарна (клас захисту II);
- Термостат з температурою нагрівання $+(37-38)^{\circ}\text{C}$;
- Центрифуга на 3000 об/хв;
- Подрібнювач тканин або ступка фарфорова;
- Овоскоп;
- Пінцет;
- Ножиці;
- Пробійник;
- Парафін;
- Шприці одноразові на 1 мл, 20 мл;
- Фільтр шприцевий з $\varnothing$ пор 0,45 мкм;
- Скло кварцеве стерильне, бите;
- Піпетки пастерівські;
- Пробірки центрифужні;
- Пластикові, одноразові мікроплашки з V-подібним дном;
- Одно- та багатоканальні дозатори змінного об'єму.

3.2 Реактиви:

- Набір антигену та сироваток для виявлення антитіл до збудника ньюкаслської хвороби в реакції затримки гемаглютинації;
- Набір антигенів (гемаглютиніни H1-H16) та сироваток (специфічних до гемаглютинінів H1-H16) для діагностики грипу птиці в реакції затримки гемаглютинації;

- 0,1М фосфатно-буферний розчин (ФБР) з рН 7,0-7,2 або 0,9 % розчин NaCl з рН 7,0-7,2;
- 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 ньюкаслської хвороби 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 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°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 Ø пор 0,45 мкм). Витримують 1 годину 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. 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. 1).

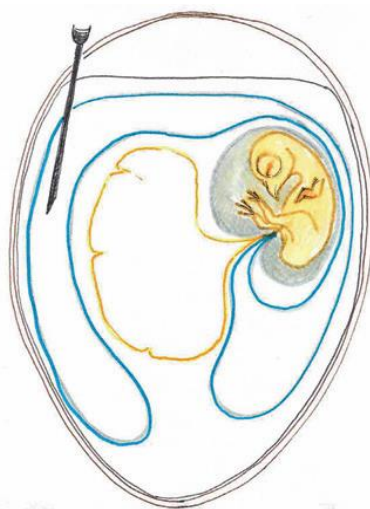


Рис. 1. Зараження курячого ембріону в алантоїсну порожнину

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

Протягом всього періоду інкубації проводять овоскопію ембріонів 2 рази на добу через кожні 12 годин (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 $+4^{\circ}\text{C}$ впродовж 12–18 годин і проводять розтин.

Перед розтином шкаралупу над пугою дезінфікують 5% спиртовим розчином йоду і фламбують. Відбирають екстраембріональну алантоїсно-амніотичну рідину в стерильні пробірки від кожного ембріону окремо (Рис. 2).



Рис. 2. Відбір алантоїсної рідини

Проби екстраембріональної рідини, відібрані з кожного ембріона, досліджують індивідуально на наявність в них вірусу шляхом постановки РГА.

Пробу досліджуваного матеріалу вважають негативною, якщо в двох послідовних пасажах не буде виявлено гемаглютинації еритроцитів і загибелі заражених ембріонів. При наявності гемаглютинації еритроцитів або загибелі ембріонів проводять ідентифікацію виділеного вірусу в РЗГА з використанням штамоспецифічних, імунних до вірусу грипу птиці сироваток та сироватки, що позитивна до ньюкаслської хвороби птиці.

3.6 Визначення гемаглютинуючої активності вірусу

Починаючи з другої лунки і до кінця ряду планшету вносять по 25 мкл ФБР. В першу та другу лунки мікропланшету вносять по 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 $+(20-22)^{\circ}\text{C}$ на 30-40 хв. Паралельно ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (25 мкл фізрозчину + 25 мкл суспензії еритроцитів) (Рис. 3).

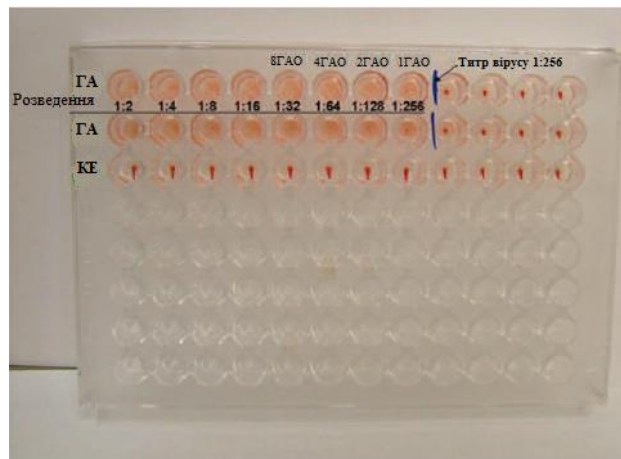


Рис. 3. Реакція гемаглютинації.

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 (H1-H16) 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 0,25 мл, 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 кожну лунку по 25 мкл ФБР та по 25 мкл 1% суспензії еритроцитів. Паралельно ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (50 мкл фізрозчину + 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 специфічної сироватки до антигену ньюкаслської хвороби (PMV-1) та специфічних сироваток до ВГП.

В ряд лунок, починаючи з другої, вносять по 25 мкл ФБР. В першу і другу лунки вносять по 25 мкл специфічної сироватки. В другій лунці 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 при 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.

4. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОГО ІНДЕКСУ ПАТОГЕННОСТІ ІЗОЛЬОВАНОГО ВІРУСУ ЗБУДНИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ ПТИЦІ

4.1 Необхідне обладнання та розхідні матеріали

- Бокс для зараження птиці;
- Шприці одноразові на 1мл;
- Стерильна вата;
- Спирт;
- Разові латексові рукавиці;
- Курчата віком від 24 до 40 годин, отримані з ВПФ яєць, або від курей, які не вакцинуються проти ньюкаслської хвороби та періодично перевіряються на відсутність антитіл до ВНХ.

4.2 Проведення дослідження

Визначають титр вірусу в алантоїсній рідині за допомогою РГА. Для визначення ЩПЗНХ використовують алантоїсну рідину, яка має титр вірусу вищий, ніж 1:16 (2⁴). Алантоїсна рідина не повинна піддаватися заморожуванню.

Розводять алантоїсну рідину стерильним фізіологічним розчином, без антибіотиків, в співвідношенні 1:10. Заражають внутрішньочеребрально 10 курчат алантоїсною рідиною в дозі 0,05 мл.

Проводять клінічний огляд курчат з інтервалом 24 години протягом 8-ми діб. Кожне курча оцінюють за 3-х бальною шкалою від 0 до 2 (0 – курча без клінічних ознак; 1 – хворе курча; 2 – курча загинуло. Якщо курча загинуло його оцінюють балом „2”, і в подальші дні також оцінюють балом „2”).

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

4.3 Облік результатів: найбільш вірулентні віруси будуть давати індекс близький до максимальної позначки шкали („2”), тоді як лентогенні і безсимптомні кишкові штами будуть давати значення індексу близьке до „0”.

Приклад підрахунку ВЦПЗНХ

Стан здоров'я	День спостереження, Кількість голів з специфічними клінічними ознаками								Загальна кількість балів за станом здоров'я впродовж 10 діб
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	
Здорове (0 балів)	10	4	2	0	0	0	0	0	16 x 0 = 0
Хворе (1 бал)	0	6	5	6	2	0	0	0	19 x 1 = 19
Загинуло (2 бала)	0	0	3	4	8	10	10	10	45 x 2 = 90
Загальна кількість голів за 8 днів спостереження	10	10	10	10	10	10	10	10	80

$$ВЦПЗНХ = \frac{0 + 19 + 90}{80} = 1,36$$

5. СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ

Дослідження сироваток крові птиці з метою виявлення антитіл до вірусів ньюкаслської хвороби проводять у спеціалізованих лабораторіях. Сироватки крові досліджують методами ІФА та РЗГА.

РЗГА застосовують для серологічного контролю напруженості імунітету до ньюкаслської хвороби, оцінки ефективності специфічної профілактики, визначення оптимальних строків вакцинації (ревакцинації) птиці, а також для контролю епізоотичної ситуації з ньюкаслської хвороби птиці.

Існує велика кількість комерційних наборів для проведення досліджень на виявлення антитіл до ньюкаслської хвороби 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 імуноферментним методом супроводжується детальною настановою до застосування, яка є обов'язковою до виконання.

5.1 Реакція затримки гемаглютинації

Метод РЗГА базується на здатності специфічних антитіл нейтралізувати гемаглютинуючу активність вірусу. До суміші вірус+сироватка додають еритроцити півня, які за відсутності специфічних антитіл в сироватці аглютинуються вірусом і осідають на дно лунки у вигляді «парасольки». Якщо специфічні антитіла присутні в сироватці - гемаглютинація відсутня, еритроцити осідають на дно лунки у вигляді «гудзика». Титром сироватки вважається найбільше її розведення, яке дає чітку затримку гемаглютинації (наявність «гудзика») робочої дози антигену ньюкаслської хвороби.

5.2 Необхідне обладнання, реактиви та розхідні матеріали

– Набір антигену та сироваток для виявлення антитіл до збудника ньюкаслської хвороби в реакції гальмування 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” та „U”-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 (18-25)°C протягом 12-18 годин або в термостаті за 37°C впродовж 60 хв, а потім в холодильнику за температури (2-8)°C впродовж 8-10 год. Відстояну сироватку зливають в чисті пробірки і з метою видалення термолабільних інгібіторів прогрівають в водяній бані за температури 56°C протягом 30 хв. Сироватки крові інших видів птиці можуть викликати аглютинацію еритроцитів курей. Тому в разі виявлення такої особливості проводять додаткову обробку сироваток еритроцитами. 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 (1500 об/хв) впродовж 2-5 хв і сироватки зливають.

Гемолізовані або контаміновані сироватки не досліджують.

Для видалення феномену ізоаглютинації сироватку обробляють еритроцитами курей: до зразків додають в рівному об'ємі 1:1 10 % суспензію еритроцитів півня, обережно струшують та витримують 30-40 хв за кімнатної температури. Потім еритроцити осаджують центрифугуванням за 800 g впродовж 2-5 хв.

Обережно відбирають сироватку, не торкаючись осаду, переносять в чисту пробірку і використовують в РЗГА.

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 ньюкаслської хвороби. 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 вносять 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 аглютинації). 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. 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 аглютинації в контролі реакції. За титр антигену приймають його найбільше розведення, яке дало чітко виражену аглютинацію еритроцитів у вигляді „парасольки”, що відповідає 1 ГАО.

5.5 Розрахунок та контроль робочої дози антигену та постановка РЗГА

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 1 мл 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.

Для контролю реакції вносять в три лунки мікроплашки по 50 мкл ФБР і 25 мкл 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.

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. (двократне розведення з 1:16 – 1:512). 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 $t+(2-8)^{\circ}\text{C}$).

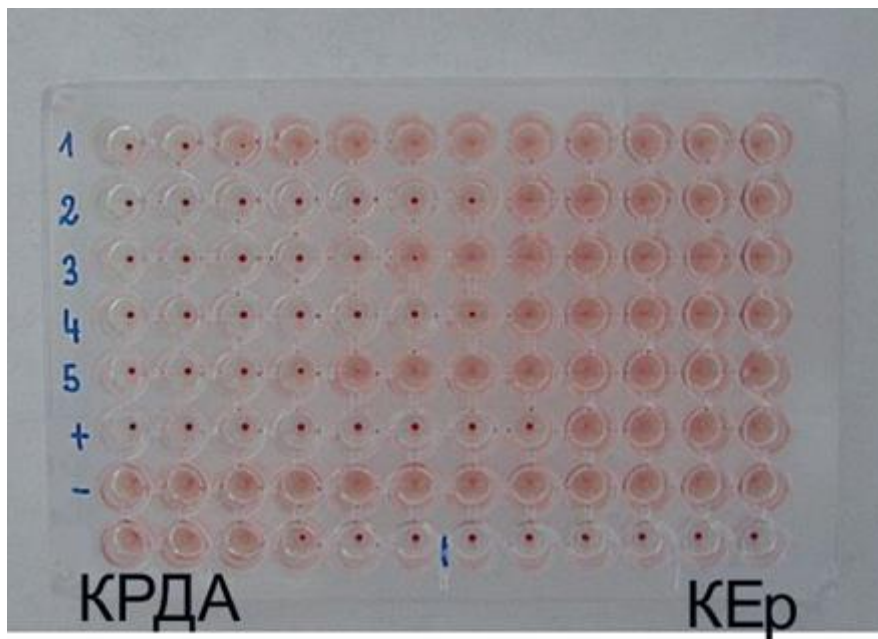


Рис. 4. Реакція затримки гемаглютинації

Одночасно вносять контролі реакції:

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

– контроль сироваток на відсутність ізоаглютинації. Для цього вносять в лунки 25 мкл фізіологічного розчину, додають рівний об'єм дослідної сироватки та 1 % суспензії еритроцитів. Аглютинація еритроцитів повинна бути відсутня. У випадку прояву феномену ізоаглютинації до 50 мкл сироватки додають 25 мкл осаду відмитих еритроцитів, ретельно змішують і витримують протягом 30 хв за кімнатної температури. Потім еритроцити осаджують центрифугуванням за 800 g (1500 об/хв) впродовж 3-5 хв

5.6 Облік 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 ньюкаслської хвороби (Рис.5).

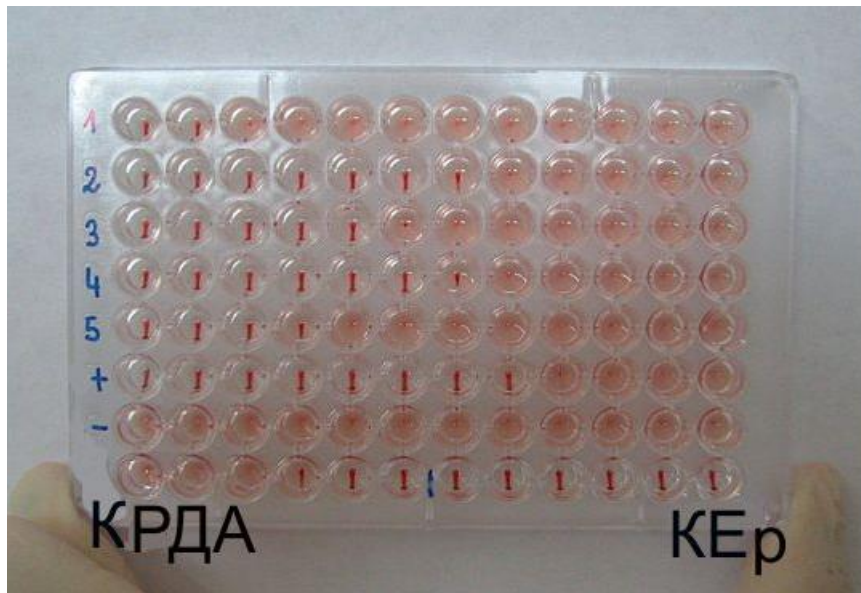


Рис. 5. Облік результатів реакції затримки гемаглютинації

5.7 Інтерпретація результатів

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.

За результатами РЗГА визначають ефективність імунізації в партіях щепленої птиці у відсотках згідно Інструкції із серологічного контролю рівня антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби птиці в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА): груповий імунітет вважається сформованим, а птиця – несприйнятлива до хвороби Ньюкасла при наявності у 80 % і більше досліджуваних сироваток після щеплень живими вакцинами та у 90 % – після щеплень інактивованими вакцинами таких титрів антитіл: у курчат до місячного віку - 1:8 і вище; у курчат від 30 до 60-денного віку - 1:8 - 1:16 (домінуючі) і вище; у молодняка від 60 до 140 днів - 1:16 - 1:32 (домінуючі) і вище; у дорослої птиці - 1:32 - 1:64 (домінуючі) 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. Інструкція із серологічного контролю рівня антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби птиці в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Голова Державного департаменту ветеринарної медицини України. Наказ № 38 від 27.04.2005
4. Стегній Б.Т. Музика Д.В., Ткаченко С.В. (2012). Ньюкаслська хвороба: сучасна класифікація збудника, діагностика та профілактика захворювання. Ветеринарна медицина. № 96. С. 120–122.
5. Ilaria Capua, · Dennis J. Alexander. (2009). Avian Influenza and Newcastle Disease. A Field and Laboratory Manual. Italia: Springer-Verlag. 186 P. <https://doi.org/10.1007/978-88-470-0826-7>.
6. Kaleta, E.F., Baldauf, C. (1988). Newcastle disease in free-living and pet birds, In: Alexander, D.J. (Ed.) Newcastle disease Kluwer Academic Publishers, Boston, 197–246.
7. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. (2018). The World Organisation for Animal Health (WOAH). <https://www.woah.org>. Retrieved from:
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
8. 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. Vol. 40 (9), P. 3256–3260. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>.
9. 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>.

10.ДОДАТОК

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) °С впродовж 30 хв.

Приготування розчину цитрату натрію

До 100 мл дистильованої води додають 0,85 г хлористого натрію та 3-5 г 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) °С 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.

Приготування 1 % суспензії еритроцитів півня

Кров у півня беруть з підкрильцевої вени у флакони з (3-5) % розчином лимоннокислого натрію на забуференому фізіологічному розчині (рН 7,0-7,2) у співвідношенні 1:2.

Тричі відмивають забуференим фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв. З осаду еритроцитів готують 1% суспензію на забуференому фізіологічному розчині (99,0 мл забуференого фізіологічного розчину + 1,0 мл осаду еритроцитів).

Зберігати суспензію можна в умовах холодильника за температури + (2-8) °С до появи ознак гемолізу еритроцитів, але не більше тижня.

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

АЛЕКСЕЄВА Галина Борисівна
кандидат ветеринарних наук, старший дослідник, заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ

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

КОВАЛЕНКО Вячеслав Леонідович
професор, доктор ветеринарних наук, головний науковий співробітник науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ. ДІАГНОСТИКА НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ 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)