БОЛЕЗНЬ НЬЮКАСЛА

6.8.
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ УРОВНЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА)

(утверждены 28 июня 1997 г., № 13-7-2/988)

1. Общие положения.

1.1. Настоящие методические указания предназначены для серологического контроля напряженности иммунитета к ньюкаслской болезни (НБ), оценки эффективности иммунизации, определения оптимальных сроков вакцинации (ревакцинации) птицы, а также для контроля эпизоотической ситуации по НБ в хозяйствах.

gost.e-ecolog.ru

1.2. Методика основана на обнаружении в сыворотке крови специфических к вирусу НБ антител (антигемагглютининов) в реакции торможения гемагглютинации.

1.3. Сроки серологического обследования поголовья определены Наставлениями по применению вакцин против НБ и могут быть скорректированы исходя из эпизоотической ситуации в конкретном хозяйстве.

1.4. Исследованию подлежат не менее 25 проб сывороток крови от птиц, взятых из различных мест птичника (зала) в объеме не менее 0,5 см^3.

1.5. Результаты каждого серологического исследования должны быть зарегистрированы в специальном журнале и проанализированы ветеринарным врачом хозяйства.

2. Методика постановки реакции торможения гемагглютинации.

2.1. Оборудование и реактивы:

- антиген сухой вирусвакцины против НБ из штаммов «Ла-Сота», «В1» или «ГАМ-61» или экстраэмбриональная жидкость куриных эмбрионов, инфицированных этими штаммами, с гемагглютинирующим титром не ниже 1:8;
- испытуемые сыворотки птиц;
- 0,7 или 1%-ная взвесь эритроцитов петуха на физиологическом или фосфатно-буферном растворе (pH 7,2...7,4) для исследований в микро- и макроварианте соответственно;
- пипетки мерные;
- микротитраторы одно- и восьмиканальные любой модели с варьируемым или стабильным объемом в пределах 0,025...0,05 см^3.

2.2. Подготовка антигена.

2.2.1. Вакцину в ампулах (флаконах) ресуспендируют в физиологическом растворе до исходного объема вируса.

2.3. Приготовление взвеси эритроцитов петуха.

Кровь берут из подкрыльцовой вены во флаконы с 2...3%-ным раствором лимонно-кислого натрия на физиологическом растворе (pH 7,2...7,4) в соотношении 1:2, трижды отмывают физиологическим раствором путем центри-

фугирования при 1500 об/мин 10 мин. Из осадка эритроцитов на физиологическом растворе (pH 7,2...7,4) готовят 0,7 или 1%-ную суспензию. Хранить суспензию можно в условиях холодильника (4°С) до появления признаков гемолиза эритроцитов.

Кроме нативных, в работе могут быть использованы стабилизированные (формалинизированные) эритроциты петуха.

2.4. Получение сыворотки крови.

2.4.1. Кровь берут из подкрыльцовой вены или путем скарификации гребня, собирают в стерильные пробирки, предварительно увлажненные стерильным физиологическим раствором. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают при комнатной температуре (18...20°С) в течение 12...18 ч или при температуре 37°С (термостат) в течение 60 мин, а затем 8...10 ч при 4°С (холодильник). Отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые пробирки и исследуют в РТГА.

2.4.2. Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотку крови прогревают на водяной бане при 56°С в течение 30 мин.

2.5. Реакцию торможения гемагглютинации проводят в два этапа:

- определение гемагглютинирующего титра вируса в реакции гемагглютинации (РГА) для расчета рабочей дозы;
- определение титра антител в пробах сыворотки крови.

Реакцию ставят макро- или микрометодом.

2.5.1. Постановка реакции гемагглютинации.

Для постановки РГА готовят двукратные разведения вакцинного вируса от 1:2 до 1:4096. С этой целью во все лунки одного ряда полистероловой микропанели микротитратором разливают физиологический раствор (0,05 или 0,25 $см^3$), в первую вносят в равном объеме вакцинный вирус, трехкратно пипетируют и переносят 0,05 или 0,025 $см^3$ во вторую лунку и т. д. Из последней лунки 0,05 или 0,025 $см^3$ удаляют и обезвреживают в 2%-ном растворе едкого натра.

После разведения вируса во все лунки вносят 0,7%-ную суспензию эритроцитов петуха в объеме, равном исходному объему физиологического раствора. Микропанели аккуратно встряхивают и оставляют при комнатной температуре (18...20°С). Учет реакции проводят после оседания эритроцитов в контроле.

Для контроля эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию и определения времени учета реакции в две лунки с физиологическим раствором (0,05 или 0,025 см^3) добавляют равный объем эритроцитов.

РГА оценивают положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», отрицательно — в виде «пуговки». За титр вируса принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию в виде «зонтика». Получение нечетких результатов может быть связано с изменившимся pH физиологического раствора.

Реакция может быть поставлена макрометодом в полистероловых макропанелях, для чего все компаненты берут в объеме 0,2 см^3. При этом в работе используют 1%-ную суспензию эритроцитов петуха.

2.5.2. Для постановки РТГА готовят рабочую дозу исследуемого вируса (4 ГАЕ) исходя из его титра.

Для этого исходный вирус разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получают от деления его титра на 4.

Например: титр вируса 1:256. Для приготовления рабочего разведения необходимо взять 63 см^3 физиологического раствора и 1 см^3 исходного вируса (256 : 4 = 64).

Объем рабочей дозы вируса определяют, исходя из количества подлежащих исследованию сывороток. Для постановки РТГА микрометодом на исследование 1 сыворотки требуется 0,6 или 0,3 см^3 4 ГАЕ вируса (в зависимости от первоначального объема физиологического раствора), макрометодом — 2,4 см^3.

2.5.3. Рабочую дозу вируса готовят непосредственно в день постановки реакции с обязательным контролем 4 ГАЕ.

Для этого в 4 лунки разливают физиологический раствор в объемах, выбранных для постановки реакции. В пер-

вую добавляют равный объем рабочей дозы вируса и титруют согласно п. 2.5.1.

Учет реакции проводят после оседания эритроцитов в контроле.

При правильном определении рабочей дозы в первой, второй лунках должна быть полная агглютинация («зонтик»), в третьей — частичная, в четвертой — отсутствие агглютинации («пуговка»).

Полная агглютинация в третьей лунке означает, что доза вируса завышена, а отсутствие агглютинации в первой или во второй лунках свидетельствует о недостаточном его количестве. Корректирование рабочей дозы (увеличение или уменьшение) проводят добавлением вируса или физиологического раствора с обязательным повторным контролем 4 ГАЕ.

2.6. Постановка РТГА.

2.6.1. Для постановки реакции во все лунки полистероловой микро- или макропанели вносят физиологический раствор в объеме 0,05 (0,025) или 0,2 $см^3$. Затем в первую лунку добавляют равный объем испытуемой сыворотки, трижды пипетируют и готовят ряд последовательных двукратных разделений (с 1:2 до 1:4096).

После этого во все лунки вносят рабочее разведение вируса в объеме 0,05 (0,025) или 0,2 $см^3$, осторожно встряхивают и после 25...30 мин контакта сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют двойной объем (по отношению к объему физиологического раствора) суспензии эритроцитов.

2.6.2. Контроли:

- сыворотки на изоагглютинацию (сыворотка + физиологический раствор в равных объемах + 1%-ная суспензия эритроцитов в двойном объеме). Агглютинация должна отсутствовать;
- эритроцитов на спонтанную агглютинацию (суспензия эритроциты + физиологический раствор в равных объемах). Агглютинация должна отсутствовать.

2.6.3. Реакцию учитывают через 25...40 мин. При наличии в сыворотке антител наблюдают торможение гемагглютинации — эритроциты выпадают в осадок в виде «пуговки».

Титром сыворотки считают наибольшее ее разведение, дающее полное торможение гемагглютинации 4 ГАЕ вируса НБ.

2.7. Интерпритация полученных результатов.

2.7.1. По результатам РТГА определяют эффективность иммунизации в партии привитых цыплят путем деления суммарного количества проб с титром антител 1:8 и выше (после применения живых вакцин) или 1:16 и выше (после применения инактивированных вакцин) на общее число исследованных сывороток и выражают в процентах.

2.7.2. Птицу считают невосприимчивой к НБ при эффективности иммунизации 80 и более процентов после применения живых вирусвакцин и 90 и более процентов после использования инактивированных препаратов.

2.7.3. При эффективности иммунизации менее 80% после применения живых вирусвакцин или менее 90% после применения инактивированных вирусвакцин птица подлежит повторной вакцинации.

2.7.4. Обнаружение в РТГА высокого уровня антител (1:2048 и выше у птиц, привитых живыми вакцинами, и 1:4096 и выше у птиц, привитых инактивированными вакцинами) свидетельствует о возможной циркуляции в стаде полевого вируса ньюкаслской болезни. В таких случаях через 21...30 дней проводят повторное исследование проб сывороток крови, полученных от этих же птиц.

2.7.5. Снижение или стабилизация уровня антител и (или) уменьшение количества птиц с высоким уровнем антител при повторных исследованиях проб сыворотки крови свидетельтвует об отсутствии циркуляции в хозяйстве эпизоотического вируса и является следствием поствакцинальных реакций.

2.7.6. Нарастание титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при отсутствии клинических и патологоанатомических признаков НБ не является основанием для объявления хозяйства неблагополучным по данному заболеванию, но предусматривает установление за птицей тщательного наблюдения, проведения систематических серологических и вирусологических исследований.

2.7.7. Нарастание титров и (или) увеличение количества птиц с высоким уровнем антител при наличии клинико-патологоанатомических признаков заболевания служит основанием для проведения детального эпизотологического обследования хозяйства и установление окончательного диагноза по данному заболеванию.

2.7.8. Обнаружение антител к вирусу ньюкаслской болезни у птиц, не привитых против НБ, без клинических и патолоанатомических признаков заболевания свидетельствует о циркуляции полевых лентогенных штаммов вируса ньюкаслской болезни и не является основанием для объявления хозяйства неблагополучным по НБ. За птицей таких хозяйств устанавливают постоянное наблюдение.

С утверждением настоящих Методических указаний на территории Российской Федерации отменяются «Методические указания по серологическому контролю напряженности иммунитета при ньюкаслской болезни птиц с помощью реакции задержки гемагглютинации» № 115-6а от 18.05.79.

Методические указания по определению уровня антител к вирусу ньюкаслской болезни в реакции торможения гемагглютинации разработаны сотрудниками лаборатории препаратов, применяемых в птицеводстве Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

gost.e-ecolog.ru