

8. Makarov V. V., Sukharev O. I., Vasilevich F. I. Serotype 8 bluetongue in Europe: relationships «virus↔*Culicoides*» // Veterinaria. — 2014. — № 6. — P. 18–23.

9. Makarov V. V., Sukharev O. I., Vasilevich F. I. Serotype 8 bluetongue in Europe. 1. Epidemiological and clinical pattern // Veterinariya Segodnya. — 2014. — № 1. — P. 5–8.

10. Spread of bluetongue in Europe and its real threat for animal husbandry in Russia / V. M. Zakharov, V. M. Gulenkin, A. K. Karaulov, S. A. Dudnikov // Rus. Vet. Journ. Selkhoz. zhivotnye. — 2007. — № 4. — P. 4–6.

11. Animal Disease Information System from Member States. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index_en.htm (date of inquiry: 22.09.14).

12. Bluetongue / OIE. Terrestrial Animal Health Code. — 23th ed. — Chapter 8.3. — Paris, 2014.

13. Bluetongue // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — Chapter 2.1.3. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUE-TONGUE.pdf.

14. Bluetongue situation in Russia / A. Panferova [et al.]. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

15. Department for Environment, Food&Rural Affairs. Bluetongue Virus in Estonia, Latvia, Lithuania and Poland, 28, 30 November 2012. — URL: <http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/monitoring/poa>.

16. Detection of Bluetongue outbreak in Smolensk region of Russia in 2011 / A. Panferova, A. Koltsov, M. Novikova [et al.] // 6th Annual Meeting EPIZONE «Viruses on the move». Abstracts. — Brighton, UK, 2012. — P. 23.

17. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/epidemiological_report_en.pdf.

18. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BT_germany_report.pdf.

19. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/docs/BTbelgium_report.pdf.

20. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_latvia%20.pdf.

21. EC. Animal Health and Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/04122012_bluetongue_spain.pdf.

22. EC. Animal Health and Welfare. Bluetongue serotype 14 vaccine-like strain circulation December, 2012. — URL: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm.

23. Molecular characterization of BTV-14 in North Europe / K. Nomikou, C. Batten, E. Morekroft [et al.] // IV International Conference on Bluetongue and related Orbiviruses, 5–7 November, Book of Abstracts. — Rome, 2014. — P. 55.

24. Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. Section: Animal Health and Animal Welfare. — URL: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/presentations_en.htm#04122012.

25. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2012/5/EU of the European Parliament and of the Council of 14 March 2012 amending Council Directive 2000/75/EC as regards vaccination against bluetongue // Official Journal of the European Union. — 2012. — L. 81. — P. 1–2.

26. VBD Molecular Epidemiology Report Form (2012-02-03; 2012-11-22, 2012-11-30). — Reference Laboratory at the Pirbright Institute.

27. World Animal Health Information Database OIE. — 2014.

28. Zakharov V., Mischenko V. Bluetongue prevention in Russia // 3rd Annual Meeting EPIZONE «Crossing borders». Programme and Abstracts. — Antalya, Turkey, 2009. — P. 114.

УДК 619:616.98:578.821.21:636.52/.58:615.371:616-085.37

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА «ЗАМЕДЛЕННОЙ РЕАКЦИИ СЕРЕЖЕК» У КУР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ НАПРЯЖЕННОСТИ ИММУНИТЕТА К ОСПЕ ПТИЦ

С.А. Похвальный¹, В.Ю. Кулаков², А.С. Самсонова³

¹ кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pohvalniy@arriah.ru

² кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ ведущий биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

Применили тест «замедленной реакции сережек» у цыплят, вакцинированных против оспы птиц. Определили модель связи величины относительного коэффициента воспаления и прививной дозы аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур и произвели сравнение результатов теста «замедленной реакции сережек» с напряженностью иммунитета.

Ключевые слова: тест «замедленной реакции сережек», аттенуированный штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур, напряженность иммунитета, метод «повторной прививки», клеточно-опосредованный иммунитет, гиперчувствительность замедленного типа.

UDC 619:616.98:578.821.21:636.52/.58:615.371:616-085.37

APPLICATION OF «DELAYED WATTLE REACTION» ASSAY IN CHICKEN FOR RAPID ASSESSMENT OF ANTI FOWL POX IMMUNITY LEVEL

S.A. Pokhvalny¹, V.Yu. Kulakov², A.S. Samsonova³

¹ Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pohvalniy@arriah.ru

² Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Leading Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

«Delayed wattle reaction» assay was applied in chicken vaccinated against fowl pox. Pattern of correlation between inflammation relative coefficient and inoculation dose of attenuated strain «KEM-7» of fowl pox virus was determined and results of «delayed wattle reaction» assay were compared with the level of immunity.

Key words: «delayed wattle reaction» assay, attenuated strain «KEM-7» of fowl pox virus, level of immunity, “re-inoculation” method, cell-mediated immunity, delayed hypersensitivity.

Сокращения и обозначения: ХАО — хориоаллантоисная оболочка; SPF — животные, в организме которых исключено присутствие определенных патогенных микроорганизмов и специфических антител к ним; IgD — прививная доза вируса; $\pm m$ — величина стандартной ошибки измерения среднего значения; p — величина ошибки прогноза; n — число произведенных измерений.

ВВЕДЕНИЕ

Напряженность иммунитета к оспе у кур может быть определена либо контрольным заражением патогенным штаммом, либо методом «повторной прививки» вакцинного штамма [5, 7]. Оба способа оценки являются эффективными, однако их продолжительность составляет 14 суток.

Иммунная реакция организма птицы на вирус оспы имеет две составляющие: гуморальную и клеточно-опосредованную. Первая может быть обнаружена в различных серологических реакциях, вторая — в тестах, где оценивается активность иммунокомпетентных клеток [4, 5, 6, 7]. При этом считается, что гуморальный иммунный ответ птиц при оспе играет второстепенную роль и имеет слабую связь с напряженностью иммунитета [5, 6, 7]. Наряду с этим известны результаты исследований, подтверждающие развитие клеточно-опосредованного иммунитета у вакцинированных птиц против оспы [4, 7].

Для демонстрации *in vivo* клеточно-опосредованного иммунитета к оспе у цыплят описан тест «замедленной реакции сережек», проявляющейся в ответ на инъекцию разведенной вакцины непосредственно в сережку [4]. Оценочным показателем данного теста является изменение толщины сережки вследствие альтернативного воспаления (без образования экссудата). При этом введение в противоположную сережку

неинфекционного материала (в качестве отрицательного контроля) позволяет сопоставить интенсивность специфического и неспецифического воспалительных процессов.

В настоящем сообщении представлены результаты использования теста «замедленной реакции сережек» на иммунизированных и интактных птицах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали аттенуированный штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур в составе суспензии гомогената ткани ХАО эмбрионов SPF-кур. Была предварительно определена инфекционная активность вируса в материале, которая составила $5,86 \lg \text{ID}_{50}/\text{см}^3$.

Подопытная птица. Клинически здоровые цыплята яичного кросса *Hisexwhite* 70-суточного возраста, не иммунные к оспе птиц, в количестве 60 голов.

Процедура интрадермальной вакцинации. С помощью двухигольного инъектора проводили интрадермальную инъекцию путем смачивания игл в ресуспендированной вакцине и последующего сквозного прокалывания безоперенного участка кожи с внутренней стороны перепонки правого крыла. Объем интрадермальной инъекции вакцины составлял $0,004 \text{ см}^3$.

Тест «замедленной реакции сережек». Цыплятам в правую сережку вводили с помощью инсулинового шприца в объеме $0,1 \text{ см}^3$ вирусный материал, содержащий штамм «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе $4 \lg \text{ID}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. В левую сережку аналогичным способом производили инъекцию имитатора (гомогената суспензии ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур). Через 24–48 ч после инъекции проводили

Рис. 1. Измерение толщины сережек цыпленка с помощью штангенциркуля в тесте «замедленной реакции сережек»



измерение толщины сережек (расстояния между латеральной и медиальной поверхностями) штангенциркулем с точностью измерения $0,1 \text{ мм}$ (рис. 1).

Определение напряженности иммунитета методом «повторной прививки». Цыплятам производили интрадермальную инъекцию штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе $10^3 \text{ ID}_{50}/0,004 \text{ см}^3$ в перепонку левого крыла. На 5–7 сутки после инъекции проводили осмотр птиц, учитывали наличие поствакцинальной реакции в области инъекции штамма в виде ограниченного воспалительного процесса. Птиц считали защищенными, если воспалительная реакция отсутствовала. Определяли долю защищенных птиц в каждой группе.

Статистическая обработка. Использовали общепринятые методы вычисления дисперсий, стандартных ошибок и существенности различий средних эмпирических оценок выборок варьирующих переменных. В тексте статистические вариации средних значений (x) представлены в виде стандартных ошибок ($x \pm m$), установленных по результатам не менее 3 единичных измерений. Устанавливали количественные показатели связи зависимых переменных в виде коэффициентов корреляции (r) и путем построения регрессионной модели ($y = y_0 + kx$, где: y — прогнозируемое значение зависимого параметра для заданного x), а также вычисляли коэффициенты детерминации (R^2), оценивающие адекватность модели [1]. Для вычислительных операций и построения диаграммы использовали программу Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цыплят разделили на 6 равных групп по 10 голов в каждой. Затем цыплятам 1, 2, 3, 4 и 5 групп была произведена интрадермальная инъекция штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе 10^3 , 10^2 , 10 , 1 и $0,1 \text{ ID}_{50}/0,004 \text{ см}^3$ соответственно. Группа 6 была принята в качестве контрольной, цыплятам которой был инъецирован внутрикожно имитатор в виде суспензии гомогената ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур. За цыплятами вели ежедневно клиническое наблюдение.

На 21-е сутки после начала опыта во всех подопытных и контрольной группах был проведен одновременно тест «замедленной реакции сережек» и оценка напряженности иммунитета методом «повторной прививки». Через 24–48 ч после инъекции вирусного и неинфекционного материалов в сережки произвели измерения их толщины. Оценкой теста «замедленной реакции сережек» считали относительный коэффициент воспаления (K), который вычисляли по формуле:

$$K = (R - L) / L,$$

где R — толщина (расстояние от латеральной до медиальной стороны) правой сережки (куда был инъецирован вирусный материал), мм;

L — толщина левой сережки (инъецирован имитатор), мм.

Принятый коэффициент имеет свойство односторонности, т.е. большее значение соответствует более интенсивной степени специфической реакции. При этом считали, что результирующей оценкой для данной группы птиц (опытных и контрольной) будет среднее значение коэффициента, рассчитанное по вы-

Таблица
Результаты теста «замедленной реакции сережек» и оценки напряженности иммунитета к оспе птиц

№ гр.	Доза вируса, ID_{50}^*	Относительный коэффициент воспаления ($K \pm m$)**	Напряженность иммунитета против оспы птиц ($C_{\text{прот}}^{\text{прот}}$)
1	1000	$1,53 \pm 0,17$	100%***
2	100	$0,66 \pm 0,16$	100%
3	10	$0,42 \pm 0,12$	90%
4	1	$0,38 \pm 0,16$	50%
5	0,1	$0,13 \pm 0,07$	0%
6	контроль	$0,12 \pm 0,04$	0%

*доза штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур, привитая внутрикожно

с помощью двухигольного инъектора в перепонку правого крыла;

**даны средние величины измерений и их стандартные ошибки ($x \pm m$; $n = 10$);

***процент иммунных птиц в группе по результатам реакции на повторную прививку.

борке единичных измерений. Объем выборки должен быть достаточен для проведения необходимых статистических операций.

Рассчитанные значения относительного коэффициента воспаления (K) и результаты оценки напряженности иммунитета против оспы птиц методом «повторной прививки» у цыплят опытных и контрольной групп представлены в таблице.

Из данных таблицы следует, что установленные соответственно испытанным прививным дозам вируса (D) средние оценки K демонстрируют собственную значимость ($t = K/m$), т.е. статистическое отличие от нуля, при соблюдении условия $p \leq 0,05$ (по Стьюденту) в границах $10^3 \leq D \leq 10$. Меньшие дозы не обусловили статистически значимых коэффициентов. При этом формально их величины превышали соответствующую среднюю оценку в группе контроля. Очевидно, что установленная недоверительность отмеченных показателей явилась следствием малочисленности последних двух опытных групп.

Средний коэффициент воспаления в группе контроля, описывающий реакцию на инъекцию вируса неиммунным птицам, был достоверно меньше, чем соответствующие величины, установленные в трех первых опытных группах, но при этом являлся статистически значимым ($t = (0,12/0,04) > t_{p \leq 0,02} = 2,718$). Это обстоятельство позволило принять верхнюю границу доверительного интервала ($p \leq 0,05$) данной величины в качестве порогового показателя неспецифической реакции птицы ($K = 0,12 + (0,04 \times 2,201) \approx 0,21$).

По результатам, полученным в пяти опытных группах птиц, сделали заключение, что между соответствующими средними значениями K и показателями $C_{\text{прот}}$ присутствовала явная положительная связь. При этом гарантированный уровень защищенности соответствовал коэффициентам, которые превышали величину $K \pm m = 0,42 \pm 0,12$.

Далее исследовали связь между величиной коэффициента воспаления сережек и дозой вируса, которой были привиты цыплята. Результаты анализа зависимости коэффициентов K от $\lg D$ представлены в виде диаграммы на рис. 2.

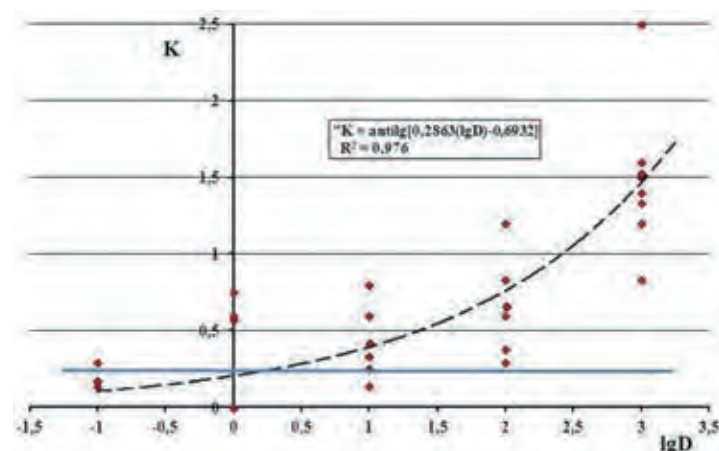


Рис. 2. Зависимость коэффициента воспаления сереежек (K) у цыплят от величины прививной дозы (lgD) штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур

Дано распределение экспериментальных значений относительного коэффициента воспаления сереежек (K) соответственно испытанным прививным дозам вируса (lgD).

Пунктиром показан график зависимости величины относительного коэффициента воспаления сереежек у кур от прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур, построенный по регрессионному уравнению: $K = \text{antlg}[0,2863(\lg D) - 0,6932]$, где K — прогнозируемый относительный коэффициент воспаления сереежек для заданной величины прививной дозы штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур (lgD).

Линия синего цвета, параллельная оси абсцисс, соответствует пороговому значению отрицательного контроля, которое составляет 0,21.

Диаграмма иллюстрирует монотонное возрастание значения коэффициента воспаления соответственно испытанным дозам. Коэффициент корреляции величин K и lgD составил величину $R = 0,987$, и соответствующая модель связи (регрессионная модель) имела вид $K = \text{antlg}[0,2863(\lg D) - 0,6932]$, где K — прогнозируемое значение коэффициента воспаления для заданной дозы вируса (lgD). Приведенная модель имела коэффициент адекватности $R^2 = 0,976$, что позволяло использовать ее для целей обратного прогноза. А именно, уравнение вида: $\lg D = (0,6932 - \lg K) / 0,2863$ по результатам оценки среднего коэффициента воспаления сереежек (K) позволяет определить ожидаемую величину прививной дозы вируса (lgD) и прогнозировать степень защищенности птицы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недостатком ранее опубликованной работы [4] можно считать то, что результаты теста «замедленной реакции сереежек» были соотнесены с результатами РТМЛ, которые между собой имели слабую связь, а не с непосредственно установленной напряженностью иммунитета в группе птиц.

При объяснении явления замедленной реакции сереежек необходимо исходить из следующего определения иммунитета — как направленной на поддержание гомеостаза способности организма распознавать, специфически реагировать и элиминировать генетически чужеродные вещества эндо- и гетерогенного происхождения. При повторном введении вируса оспы у привитых цыплят «включается» вторичный иммунный ответ.

Можно предположить, что тест «замедленной реакции сереежек» является проявлением реакции типа IV — группы патологических иммунных реакций, опосредованных клетками (или гиперчувствительности замедленного типа). Реакции этого типа обусловлены взаимодействием антигена с презентируемыми лимфоцитами, что приводит к повреждению тканей в результате неадекватного функционирования механизмов клеточного иммунитета, проявляемого в виде альтеративного воспаления [3].

Интрадермальная инъекция аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур в дозе больше $10 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^3$ обеспечивает индукцию иммунитета у привитых цыплят, выявляемую в тесте «замедленной реакции сереежек», что согласуется с предыдущими данными (для штамма «КЭМ-7» регламентируемая прививная доза в составе эмбрион-вакцины против оспы птиц составляет не менее $100 \text{ ИД}_{50} / 0,004 \text{ см}^3$) [2].

Таким образом, результаты описанного исследования являются доказательством пригодности теста «замедленной реакции сереежек» для экспресс-оценки напряженности иммунитета против оспы птиц в течение 24–48 ч. Для этого цыплят опытной группы (не менее 10 голов) можно будет считать защищенными от заражения вирусом оспы птиц, если на 24–48 ч после введения вирусной суспензии и суспензии гомогената ткани ХАО неинфицированных эмбрионов SPF-кур в равном объеме ($0,1 \text{ см}^3$) среднее значение разности толщины правой и левой сереежек будет статистически отличаться ($p \leq 0,05$) от аналогичного показателя у неиммунных птиц контрольной группы.

ВЫВОДЫ

1. Тест «замедленной реакции сереежек» обеспечивает быструю оценку напряженности иммунитета против оспы у вакцинированных цыплят в течение 24–48 ч.
2. Показана зависимость между долей защищенных птиц в группе против оспы птиц и проявлением местной реакции на введение вирусосодержащего материала в сереежки цыплятам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во МГУ, 1970. — 367 с.
2. Похвальный С.А., Кулаков В.Ю. Иммунобиологические свойства аттенуированного штамма «КЭМ-7» вируса оспы кур // Ветеринария и кормление. — 2011. — № 6. — С. 43–45.
3. Ройт А. Основы иммунологии: пер. с англ. / под ред. Р.Г. Василовой, А.Ф. Киркина. — М.: Мир, 1991. — 328 с.
4. Dharsana R., Spradbrow P.B. The demonstration of cell-mediated immunity in chickens vaccinated with fowlpox virus // Zbl. Vet. Med. R. B. — 1985. — Bd. 32, № 8. — P. 628–632.
5. Fowl pox // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). — 7th ed. — 2012. — Vol. 1, Chap. 2.3.10. — P. 507–513.
6. Morita C. Role of humoral and cell-mediated immunity on the recovery of chickens from fowlpox virus infection // J. Immunol. — 1973. — Vol. 111, № 5. — P. 1495–1501.
7. Tripathy D.N., Hanson L.E. Immunity to fowlpox // Am. J. Vet. Res. — 1975. — Vol. 36, № 4. — P. 541–544.

УДК 619:615:543.54

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРИ АНАЛИЗЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Д.С. Большаков¹, В.Г. Амелин², Т.Б. Никешина³

¹ научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

РЕЗЮМЕ

В работе оценена возможность контроля качества готовых лекарственных средств методами капиллярного электрофореза. Выбраны оптимальные условия разделения и определения различных классов антибактериальных веществ: пенициллинов, фторхинолонов, нитрофуранов, сульфаниламидов, метронидазола и хлорамфеникола. Диапазон определяемых содержаний действующих компонентов составил 1–2500 мг/г для твердых образцов и 0,001–0,50% для жидких препаратов.

Ключевые слова: готовые лекарственные средства, капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, антибиотики, антибактериальные вещества.

UDC 619:615:543.54

CAPABILITIES OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF READY-TO-USE PHARMACEUTICAL PRODUCTS WITH AN ANTIBACTERIAL EFFECT

D.S. Bolshakov¹, V.G. Amelin², T.B. Nikeshina³

¹ Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

² Leading Researcher, Doctor of Science (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir

³ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir

SUMMARY

The capability to monitor quality of ready-to-use pharmaceuticals using capillary electrophoresis methods is evaluated in the paper. Optimal conditions for separation and determination of different classes of such antibacterial agents as penicillins, fluoroquinolones, nitrofurans, sulfanilamides, metronidazole and chloramphenicol are chosen. The range of content of active constituents is 1–2500 mg/g for solid samples and 0,001–0,50% for liquid preparations.

Key words: ready-to-use pharmaceuticals, capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, antibiotics, antibacterial agents..