УДК 619:636.616-07:576.85
© 2018

УДОСКОНАЛЕННЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ МЕТАПНЕВМОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ

О.В. ІВЛЕВА,
аспірант

Луганський національний аграрний університет (м. Харків), Україна
E-mail: sauce1908@gmail.com

вул. Алчевських, 44, м. Харків

Наведено результати епізоотологічного моніторингу та скринінгу щодо поширення метапневмовірусної інфекції серед сільськогосподарської птиці фермерсько-присадибних господарств Харківської області. За допомогою ІФА-методу (набір фірми "IDEXX", США) позитивно реагуючих індиків до МПВІ виявлено в середньому 78,0 % з титрами антитіл 3776–27869, курей – 100 % у межах 4997–10414. Відсутність вітчизняних діагностичних препаратів та наявність надзвичайно дорогих імпортних підштовхнули до необхідності розробки порівняно недорогого діагностичного набору ІФА для визначення антитіл до МПВІ з використанням як антигени вітчизняних штамів метапневмовірусу. Розроблено вітчизняну ІФА-тест-систему для діагностики даної інфекції в індиків та курей, визначено технологічні характеристики даного діагностикуму. Оцінка чутливості та специфічності тест-системи здійснювалася шляхом порівняльного аналізу результатів тестування сироваток у запропонованій тест-системі ІФА з ІФА-тест-системою фірми "IDEXX" (США).

Ключові слова: *епізоотологія, моніторинг, хвороба, індики, кури, імуноферментний аналіз, тест-система.*

Постановка проблеми. Використання високопродуктивних кросів птиці, що імпортуються в Україну, призвело до поширення раніше невідомих вірусних хвороб, до яких відноситься і метапневмовірусна інфекція (МПВІ). Захворювання під назвою ринотрахеїт (*Turkey Rhino Tracheitis* – TRT) вражає верхні дихальні шляхи індиків та курей – запалення носових пазур, синусів та трахеї в індиків; "синдром пухлої голови" (SHS – *Swollen head syndrome*) – у курей. Причиною захворювання є пневмовірус, що відноситься до роду *Metapneumovirus*, підроду *Paramyxovirinae*, родини *Paramyxoviridae* [1–4].

Уперше респіраторне захворювання в сільськогосподарської птиці було зареєстровано 1978 року в Південній Африці. Учені Morley и Thomson вважали, що його причиною стала змішана інфекція, яка може бути викликана коронавірусом та кишковою паличкою. У США це захворювання зареєстрували в індиків у штатах Колорадо та Міннесота [1]. Сьогодні TRT-інфекція зустрічається в усіх країнах світу з розвиненим птахівництвом (Ізраїль, США, Канада, Англія, Північна Ірландія, Бразилія, Марокко, Росія) [1, 2, 5].

За TRT-інфекції захворюваність і смертність серед індиків на фермах коливалася від 4 до 90 %, у бройлерних стадах – від 1 до 10 % [1, 2].

Вірус передається повітряно-крапельним та контактним шляхами [2].

У зв'язку з відсутністю в нашій країні діагностичних препаратів дослідження щодо поширення TRT-інфекції в птахівничих господарствах України не проводилися. У багатьох країнах світу для діагностики TRT-інфекції використовують різні реакції: РНІФ, РН, ІФА та метод імуноцитохімії. За їх допомогою можна встановити епізоотологічний діагноз на TRT-інфекцію, але оцінити напруженість імунітету після щеплення птиці неможливо [6–11].

Нині в науково-дослідних та виробничих ветеринарних лабораторіях України відсутні стандартні вітчизняні діагностичні набори для експрес-діагностики МПВІ птиці, а закордонні аналоги мають дуже високу ціну (понад 20 тис. грн) і недоступні для широкого використання ветеринарними лабораторіями. Тому натепер необхідні більш доступні і чутливі серологічні реакції, до яких належить ІФА-тест-система, яку можна було б використовувати в практиці ветеринарної медицини України для контролю МПВ-інфекції.

Метою наших досліджень було розробити вітчизняну ІФА-тест-систему для контролю МПВІ птиці та провести серологічні дослідження порівняно з ІФА-методом закордонного виробництва.

Матеріал та методи. Ступінь поширення МПВІ серед сільськогосподарської птиці визначали у фермерських господарствах Харківської області серед індиків кросу "Біг-6" та "Бют-8" віком від 4 до 480 діб, завезених з Німеччини та Угорщини, вітчизняної породи біла широкогруда віком 70 діб та курей породи бірківська барвиста і кросу "Хайсекс коричневий" віком 250 і 180 діб відповідно. Діагностичну цінність ІФА-тест-системи порівнювали з ІФА-тест-системою фірми "IDEXX" (США).

Накопичення метапневмовірусу для ІФА-методу здійснювали шляхом його репродукції на первинно-трипсинізованій культурі клітин курячих ембріонів (ФЕК). Перед очищенням та концентруванням штаму PVT-09/B метапневмовірусу був розроблений регламент його інактивації. За температури 25±0,5 та 37±0,5 °С випробувано три концентрації етиленіміну (ЕІ): 0,05; 0,1 та 0,15 %. Після проведення чотирьох послідовних "сліпих" пасажів на культурі клітин ФЕК 10-добових ембріонів встановлено 100%-ву інактивацію штаму за температури 37 °С з експозицією 24 год у концентрації ЕІ 0,1 %.

Для ІФА-діагностикуму напрацьований антиген очищали та концентрували за розробленою нами схемою, яка включала підготовчий етап, попереднє очищення, концентрування вірусу та завершальне його очищення.

Діагностичні сироватки крові (позитивну сироватку) отримували шляхом гіперімунізації 30-добових курчат та індичат за розробленою нами схемою, нормальну сироватку від інтактних курчат та індичат віком 90 діб – шляхом тотального знекровлення. Сенсибілізацію планшетів, внесення досліджуваних сироваток на планшети та кон'югату проводили за загальноприйнятими методами [12].

Результати дослідження та їх обговорення. За допомогою ІФА-методу (набір фірми "IDEXX" США) позитивно реагуючих на МПВІ серед індиків кросу "Біг-6", "Бют-8" та породи біла широкогруда виявлено в середньому 78,0 % з титрами антитіл 3776–27869, курей – 100 % у межах 4997–10414 (бірківська барвиста) та 0 % ("Хайсекс коричневий").

Оскільки на ринку України існують тільки імпортні висококоштовні діагностичні препарати і відсутні діагностичні набори вітчизняного виробництва, то для контролю МПВІ в Луганському НАУ розроблена вітчизняна ІФА-тест-система для діагностики МПВІ серед індиків та курей птахівничих господарств різних форм власності.

З метою отримання діагностичних сироваток було розроблено схему імунізації інтактних курчат та індичат, отримано дві серії гіперімунної сироватки з титрами антитіл в ІФА у курчат 1:1700 та індичат 1: 2800 ("IDEXX"). Сироватки зберігають за температури мінус 20 °С та в ліофілізованому стані.

Антигенні властивості польових штамів PVCh-16 та PVT-09/B метапневмовірусу вивчали на курчатах та індичатах віком 30 діб. За індукцією специфічних антитіл спостерігали кожні 14 діб за 3-кратної імунізації курчат (рис. 1).

Згідно з отриманими результатами, за цей період захисні титри антитіл до МПВ у курчат сягали 1700, а в індичат – 2800 (ІФА "LAU").

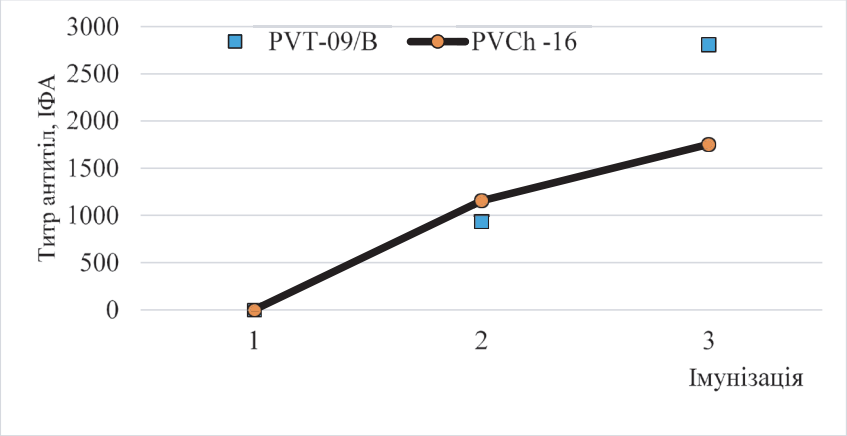

Рис. 1. Індукція специфічних антитіл за імунізації індичат штамом PVT-09/B та курчат штамом PVCh-16

Для підбору оптимального робочого розведення сироватки та виведення формули, з метою визначення титрів антитіл в одному розведенні, досліджено 100 проб польових сироваток крові курей з різним рівнем антитіл до метапневмовірусу. Рівень антитіл визначали методом непрямого ІФА послідовними розведеннями сироватки від 1:100 до 1:12800 (рис. 2).

Для виготовлення ІФА-тест-системи відпрацьовані оптимальні співвідношення антигену і кон'югату, визначено їх робочі розведення методом "шахового титрування". Для кожного розведення розрахований коефіцієнт кореляції зі значеннями титрів. За робоче розведення сироватки прийнято розведення 1:400, яке мало найвищий коефіцієнт кореляції. Відповідно до значень оптичних щільностей досліджуваних сироваток, за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel, була побудована калібрувальна крива й виведено рівняння лінійної регресії для розрахунку логарифмічного значення титрів антитіл у сироватках (рис. 3).

Формула титрів антитіл у сироватках крові курчат під час тестування в одному розведенні спрощує проведення аналізу

$$\lg T = 3{,}7981 + 0{,}8524 \cdot \lg (S/P\ 400).$$

Для об'єктивної оцінки імунної відповіді встановлено позитивно-негативний поріг (ПНП).

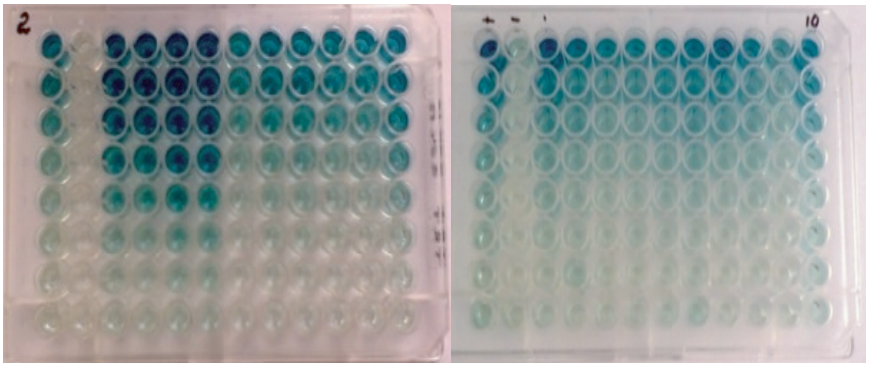

Рис. 2. Визначення рівня антитіл за допомогою вітчизняного ІФА-методу

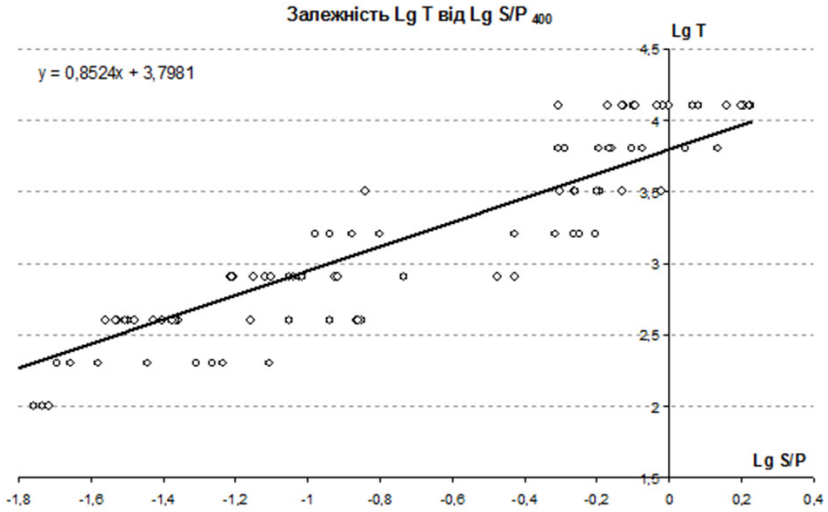

Рис. 3. Калібрувальна крива значення lg T до lg S/P

На основі отриманих результатів за наведеною формулою визначено ПНП: негативні сироватки від 0 до 850; позитивні – від 850 і більше.

Оцінку чутливості та специфічності тест-системи проводили шляхом порівняльного аналізу результатів тестування сироваток у тест-системі ІФА, яка розробляється, з ІФА-тест-системою фірми "IDEXX". Паралельно порівнювали 60 сироваток крові від індиків з різною активністю (по 30 сироваток крові від нещеплених та щеплених проти МПВІ птиці).

У нещеплених проти МПВІ індиків титри антитіл до вірусу в ІФА коливалися від 0 до 223 (вітчизняна система) за ПНП 850, тоді як з використанням тест-системи фірми "IDEXX" – від 0 до 302 за ПНП 396. У щепленої птиці титри антитіл в ІФА "LAU" були від 3352 до 8105, в ІФА "IDEXX" – від 2946 до 6044. Оскільки ІФА-набори мають різний позитивно-негативний поріг, то титри антитіл відрізняються абсолютними значеннями, що й обумовлює дані результати (рис. 4).

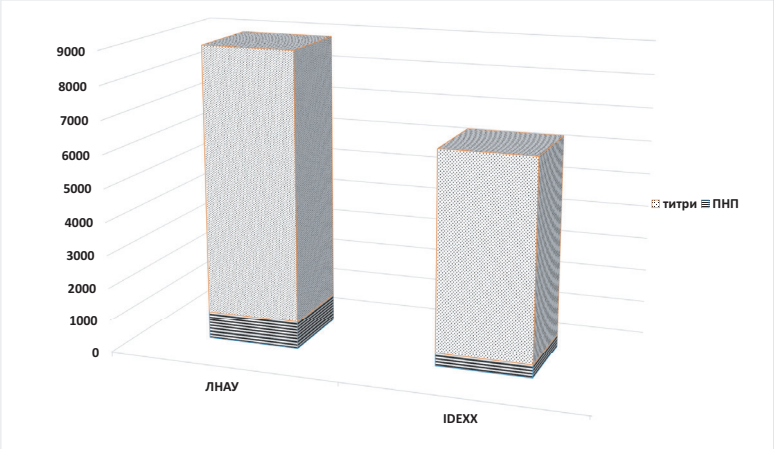

Рис. 4. Титри антитіл за різних позитивно-негативних порогів, визначені двома ІФА-тест-системами "LAU" (Україна) та "IDEXX" (США)

Таким чином, на підставі проведених досліджень простежується 100%-ва кореляційна залежність щодо даних діагностикумів, тобто сироватки дослідженої птиці, що не мають антитіл до даного захворювання, не фіксуються в обох наборах і, навпаки, сироватки з наявністю протективних титрів антитіл до цього захворювання фіксуються двома тест-системами.

Обидві тест-системи були використані в проведенні діагностичних досліджень сироваток крові в птахівничих господарствах, де птицю щеплювали проти МПВІ. Під час використання вітчизняного ІФА-діагностикуму в індиків виявлені позитивні титри антитіл від 2722 до 9819, у курей – 1532–8105. З використанням комерційної ІФА-тест-системи фірми "IDEXX" в індиків титри антитіл реєстрували в межах 1506–6230. Через три місяці вони зберігалися в межах 4358–16280 ("LAU") та 4084–11590 ("IDEXX"). У курей відсутність титрів антитіл виявлена обома тест-системами.

У курчат яєчного напряму виробництва віком 30 діб, які були щеплені проти МПВІ, титри антитіл в ІФА (тест-система "LAU") коливалися від 2122 до 5886.

Висновки

Отже, для епізоотологічного моніторингу та скринінгу сироваток крові з метою визначення специфічних антитіл до метапневмовірусу, а також контролю напруженості імунітету в щепленої птиці можна використовувати вітчизняну тест-систему. Реакція є кількісною, простою у використанні, проводиться в одному розведенні сироватки. Порівняно зі закордонними аналогами вітчизняна тест-система набагато дешевша, доступна для лабораторій ветеринарної медицини, а також є конкурентоспроможною та імпортозаміщуючою.

Перспективою подальших досліджень у даному напрямі є впровадження вітчизняної ІФА-тест-системи для діагностики МПВІ в лабораторіях ветеринарної медицини та птахівничих господарствах України.

Бібліографія

1. Борисова И.А. Пневмовирусная инфекция птиц / *И.А. Борисова, С.К. Старов* // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 281–296.

2. *Виноходов В.О.* Синдром "опухшая голова" или введение в ото-ларингологию птиц / *В.О. Виноходов* // Ветеринария в птицеводстве. – 2003. – № 1(7) – С. 14–27.

3. *Вентуе М.* Пневмовирусная инфекция птиц (инфекционный рино-трахеит индеек или ТРТ; синдром опухания головы или SHS). 2 часть. По материалам компании Laboratories Hipra, S.A. (Испания) / *М. Вентуе* // Сучасна вет. медицина. – 2008. – № 4. – С. 8–12.

4. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain / *C.J. Naylor, Kr Show, P. Britton, D. Cavanagh* // Avian Pathal. – 1997. – 26. – P. 327–338.

5. *Arns C.W.* Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil / *C.W. Arns, H.M. Hafez* // Proc. 41st Western Poultry Dis. Conf. – Sacramento, 1992. – P. 81–83.

6. Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants / *E. Catelli, M.A. De Marco, M. Delogu, C. Terregino, V. Guberti* // Veterinary Record. – 2001. – 149: 56–58.

7. *Чайка Н.А.* Применение РНГА для диагностики вирусных инфекций / *Н.А. Чайка* // В кн.: Реакция непрямой гемагглютинации. – Л., 1981. – С. 98–105.

8. *Волкова М.А.* Непрямой вариант иммуноферментного метода для определения антител к пневмовирусу птиц / *М.А. Волкова, Г.В. Батченко, Н.С. Мудрак* // Актуальн. пробл. инфекц. патологии жив-х: матер. Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ "ВНИИЗЖ". – Владимир, 2003. – С. 358–361.

9. Development and evaluation of a whole virus-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human Metapneumovirus antibodies in human sera / *M. Okamoto, K. Sugawara, E. Takashita* [et al.] // J. Virol. Methods. – 2001. – Vol. 164. – P. 24–29.

10. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies / *S.J. Chiang, A.M. Dar, S.M. Goyal* [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2000. – V. I2. – P. 381–384.

11. *Assanov N.G.* Serological aspects of avian metapneumovirus infection in Kazakhstan / *N.G. Assanov, A.R. Sansyzbay, A.M. Mussoev* // Annual 19th International Scientific Conference Research for Rural Development (15–17 May 2013). – Jelgava: Latvia University of Agriculture, 2013. – P. 147–150.

12. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы с использованием серологических реакций: методические рекомендации; 4 часть / ФГУ "ВНИИЗЖ". – Владимир, 2008. – С. 59–60.