

О.В. ЦИНОВИЙ, кандидат біологічних наук,
Л.І. НАЛИВАЙКО, доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Державна дослідна станція птахівництва НААН
Email: tsyunovalexvet@ukr.net

Тест-система ІФА для метапневмовірусної інфекції птиці: МЕТОДОЛОГІЯ РОЗРОБКИ ТА ВИКОРИСТАННЯ У ВЕТЕРИНАРНІЙ ПРАКТИЦІ

Анотація. За відсутності діагностичних наборів для визначення антитіл до метапневмовірусної інфекції (МПВІ) епізоотологічний моніторинг у господарствах України практично не проводиться, імпорتنі тест-системи мають високу вартість, тому виникла потреба у вітчизняних методах діагностики даного захворювання. Найбільш точним методом і простим у використанні є тест-система на основі ІФА (імуноферментного аналізу).

Мета досліджень – розробка вітчизняної діагностичної тест-системи ІФА щодо метапневмовірусної інфекції.

Розроблено діагностичну тест-систему ІФА для визначення антитіл до МПВІ та встановлено, що цей діагностикум бажано використовувати в практиці ветеринарної медицини для серологічного контролю метапневмовірусної інфекції.

Відпрацьовано оптимальні співвідношення компонентів для виготовлення ІФА тест-системи.

Розраховано формулу обрахунку титрів антитіл у сироватках крові курчат при тестуванні їх в одному розведенні.

Визначено чутливість і специфічність тест-системи ІФА (порівняльний аналіз результатів тестування сироваток у ІФА, РНГА (реакції непрямої гемаглютинації) та в РН (реакції нейтралізації)).

Розроблено наукову документацію – інструкцію з виготовлення та контролю тест-систем ІФА для виявлення антитіл до метапневмовірусної інфекції в сироватках крові курей та настанову з її використання.

Було проведено індикацію та ідентифікацію отриманого ізоляту вірусу, її здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та нуклеотидного секвенування. На підставі проведених досліджень у суспензії внутрішніх органів індиків (трахея, легені) виявлено вірус, який відносився до підтипу В роду *Metapneumovirus*, підродини *Pneumovirinae*, родини *Paramyxoviridae* порядку *Mononegavirales*.

Згідно порівняння нуклеотидної послідовності фрагмента гена С штаму "PVT-09/B" з послідовностями штамів та ізолятів метапневмовірусу птиці підтипу В, що опубліковані в базі даних GenBank, встановлено, що ізольований від хворих індиків метапневмовірус філогенетично близький бразильським штамам пневмовірусу (*aMPV chicken B Brazil 27A-07 2007* та *MPV/B/Brazil-07/USP-08 G*).

Ключові слова: кури, сироватки крові, діагностика, ІФА, метапневмовірус

В Україні, за відсутності наразі вітчизняних методів діагностики, контроль метапневмовірусної інфекції (МПВІ) у птахівничих господарствах не проводиться, а зареєстровані імпорتنі діагностичні набори фірми BioChek (Нідерланди) та IDEXX (США) мають високу вартість – від 20-30 тис. грн, що є недоступним для лабораторій ветеринарної медицини, науково-дослідних закладів та птахівничих господарств. Отже, розробка та вдосконалення методів серологічної діагностики МПВІ має наукове та практичне значення.

Найбільш поширеним як у практиці ветеринарії, так і медицини для виявлення антитіл, визначення їх титрів у сироватках крові є непрямий варіант ІФА (ELISA) (Cook

et al., 2002; Дмитриев, 2010; Ирза и др., 2003; Волкова, 2003).

У країнах світу з розвинутим птахівництвом діагностика інфекційних захворювань птиці вірусної етіології та контроль напруженості імунітету у ветеринарії проводиться з використанням методу імуноферментного аналізу (ІФА), перевагами якого є висока чутливість, специфічність, безпечність, швидкість постановки реакції, оперативність проведення досліджень і можливість автоматизації практично всіх стадій виконання реакції, враховуючи реєстрацію та обробку отриманих результатів. Цей метод успішно використовують для виявлення як вірусних антигенів, так і специфічних антитіл у тварин-реконвалесцентів або щепле-

них противірусними вакцинами (Борисова и Старов, 2006; Лисенкова, 2013; Никитина, 2012).

Основний метод, що дозволяє контролювати рівень антитіл до МПВ інфекції у сироватках крові птиці, а також визначати присутність вірусу в біологічних матеріалах засновано на імуноферментному аналізі. На основі цього методу за кордоном рядом фірм (IDEXX Laboratories (USA), BioChek (Holland), KPL (Kirkegaard and Perry Laboratories (USA), "Синко" ВНИИЗЖ, РФ) випускаються діагностичні набори для визначення антитіл до метапневмовірусу в сироватках крові сільськогосподарської птиці.

Своєчасний та правильно поставлений діагноз – це переважний успіх у боротьбі з захворюваннями птиці. Практика ветеринарного обслуговування птахівничих господарств свідчить, що для обґрунтованого діагнозу будь-якого захворювання, включаючи й метапневмовірусну інфекцію, потребується проведення комплексних досліджень, про що свідчать роботи багатьох науковців з різних країн світу як ближнього зарубіжжя (Бочкарев, 2013), так і найвіддаленіших частин світу (Giovanni et al., 2020; Jiang et al., 2020; Umar et al., 2016; Yu et al., 2019; Zhu et al., 2016). У зв'язку з тим, що багато з цих хвороб супроводжуються подібними симптомами, важливе значення має диференціальна діагностика, а саме: максимально рання діагностика захворювання, яка є найважливішим принципом контролю за поширенням інфекції. Тому, розробка і вдосконалення методів діагностики МПВІ має наукове та практичне значення (Cook et al., 2002; Felipe et al., 2011).

У 1987 році вченими було остаточно доведено, що етіологічним чинником даної хвороби є вірус, і згідно біологічних характеристик його віднесено до родини *Paramyxoviridae*, роду *Pneumovirus*. Вірус не викликає геммаглютинації еритроцитів курей, морських свинок і людини. Оскільки вірус МПВ (ІРТ) – єдиний представник з роду *Pneumovirus*, який викликає захворювання у індиків (запалення верхніх дихальних шляхів та легень), він одержав назву "ринотрахеїт індиків" (turkey rhinotracheitis, TRT, IPT) або пташиний пневмовірус (*Avian Pneumovirus*, АmPV).

Вченими доведено, що ізольований вірус МПВ (ІРТ) від хворих індиків і курей з ознаками "синдрому пухлої голови" та наявність специфічних антитіл у сироватці крові – це загальний етіологічний агент двох захворювань – "ринотрахеїт індиків" (TRT) і "синдром пухлої голови" (SHS) (Борисова и Старов, 2006).

Під час ізоляції вірусу МПВ (ІРТ) від хворих птахів була виділена різна бактеріальна мікрофлора, така як: *Alcaligenes faecalis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma sp.*, *Bordetella avium*, *E. coli*, *Staphylococcus*. Серед ізольованих бактерій превалювала *E. coli*. Встановлено, що при зараженні чистою культурою *E. coli* шляхом скарифікації в ділянці шкіри голови, виникають клінічні прояви, характерні для "синдрому пухлої голови". Клінічні ознаки даної інфекції птиці непатогномонічні й характеризуються, насамперед, ураженням органів респіраторного тракту. Також спостерігають у багатьох випадках коінфекції (Hristova & Petrova, 2017). У хворої птиці спостерігають виткання з носових й очних пазух, незначні запалення інфраорбітальних синусів. У батьківських стадах курей та індиків хвороба супроводжується зниженням несучості.

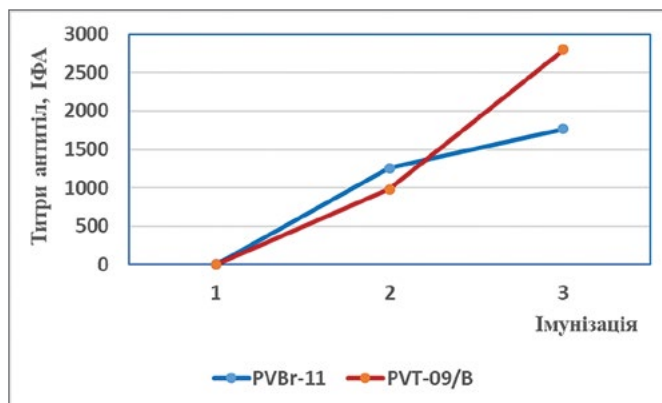


Рис.1. Індуція специфічних антитіл при імунізації курчат

Через 2-3 доби може виникнути гнійний кон'юнктивіт і набряк у ділянці голови ("синдром пухлої голови", SHS), що може призвести до сліпоти птиці (Абгарян, 2020).

Мета роботи – розробка вітчизняного методу діагностики на основі імуноферментного аналізу до метапневмовірусної інфекції птиці.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили у Державній дослідній станції птахівництва НААН (ДДСП НААН) та Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків).

Дана робота передбачала розробку методу, тому в розширеному форматі матеріали представлено в розділі щодо результатів досліджень.

Результати досліджень. Роботу виконували у наступному напрямі – напрацьовувався антиген з штаму метапневмовірусу PVT-09/B (раніше виділений, ізольований та депонований) для його наступного очищення та концентрування для розробки тест-системи ІФА.

Розроблено високотехнологічний спосіб очищення та концентрування метапневмовірусу птиці. Дослідження проводили на базі Інституту кріобіології і кріомедицини м. Харкова.

Було напрацьовано культуральну розплідку штаму метапневмовірусу з титром цитопатичної дії 5,72 Іг ТЦД_{50/см³}, далі її заморожували при -20 °С з наступним відтаюванням до +4 °С. Очищення та концентрування ві-

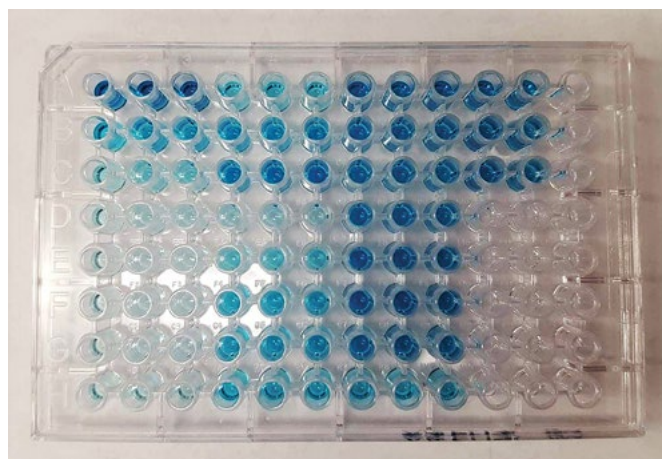


Рис.2. Визначення рівня антитіл за допомогою тест-системи ІФА

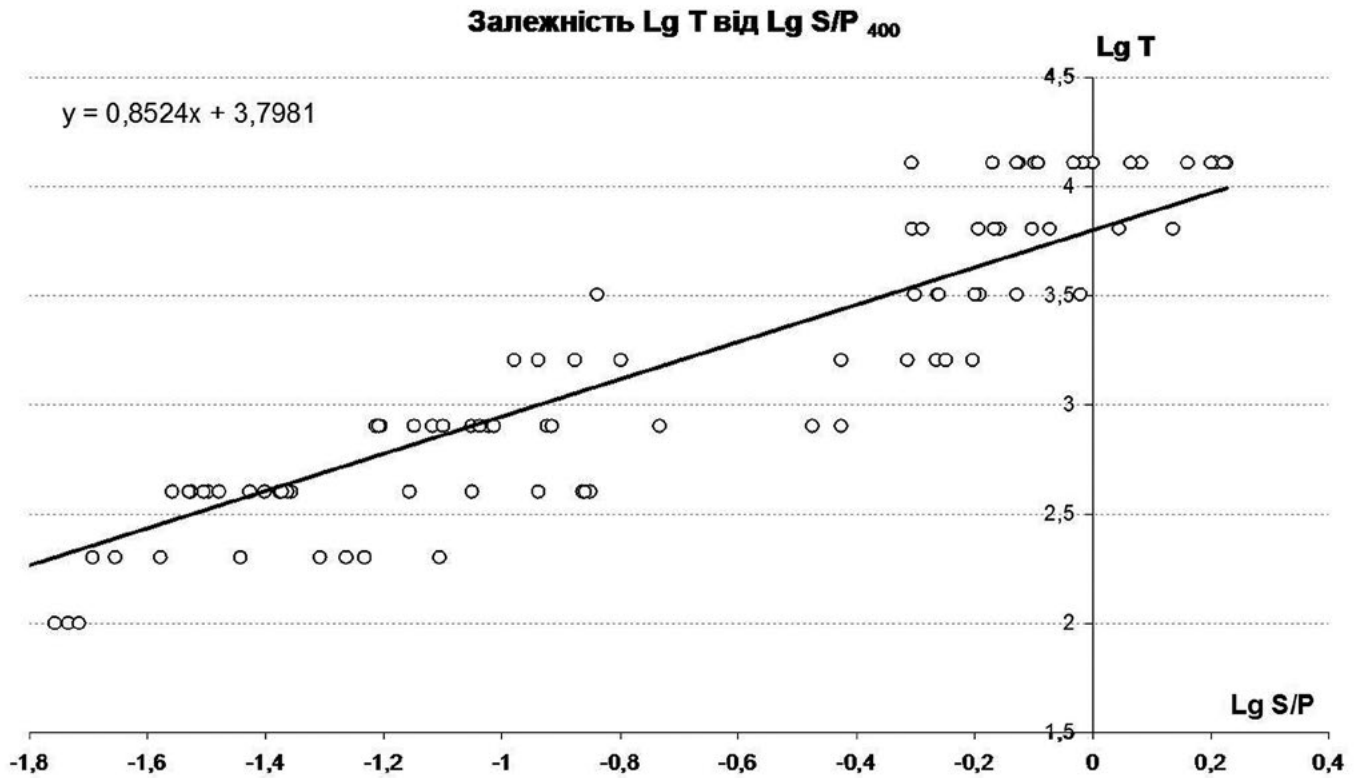


Рис.3. Калібрувальна крива значення lg T до lg S/P

рису проводили за розробленою нами схемою:

1 етап. Попереднє очищення вірусу. Клітинний дебрис з культуральної рідини було видалено центрифугуванням при 1000 g (3000 об/хв.) 20 хвилин за температури +4 °C та зібрано супернатант.

2 етап. Концентрування вірусу. Попередньо очищену розплідку вірусу змішували з 6% ПЕГ-6000 (поліетиленгліколь) від загального об'єму і витримували протягом 2 годин за температури +4 °C, після чого проводили її центрифугування при 12000 g (g – кутове прискорення) 30 хвилин за +4 °C. Отримані осади було ресуспензовано у TSE-буфері (трис-сольовому буфері, pH 7,6).

3 етап. Завершальне очищення вірусу. Проби центрифугували через 20% розчин сахарози при 76000 g 1,5 години (за температури +4 °C). Отриманий осад ресуспензували у TSE-буфері (до 10 мл).

Наступний етап роботи включав вивчення антигенних властивостей метапневмовірусу та отримання гіперімунної, негативної та діагностичних сироваток крові курей для виготовлення ІФА-діагностикума.

Удосконалено схему імунізації курчат, з метою отримання гіперімунної (з високим титром антитіл) сироватки крові для ІФА-діагностикума. На інтактних курчатах отримано дві серії гіперімунної сироватки з титрами антитіл в ІФА 4344 (BioChek) і 2808 (IDEXX). Для визначення титрів антитіл використовували тест-системи ІФА виробництва США (IDEXX) і Нідерландів (BioChek). Від клінічно здорових курчат та індицинят 30-добового віку, яких вирощували у камеральних умовах, отримано негативні сироватки крові (з нульовими титрами антитіл).

Отримано діагностичні сироватки крові на інтактних курчатах: негативні сироватки крові курей для ви-

значення негативно-позитивного порогу в тест-системі ІФА та гіперімунні сироватки крові до двох штамів МПВ з середніми титрами антитіл у РНГА 1:256 та ІФА – 1764 (PVBr-11), 2800 (PVT-09/B). На курчатах віком 30 діб вивчені антигенні властивості штамів PVT-09/B та PVBr-11 метапневмовірусу, ізольованих від індиків і курчат-бройлерів. За індукцією специфічних антитіл спостерігали кожні 14 діб при 3-кратній імунізації курчат (рис. 1).

Після отримання достатньо високих титрів антитіл, птиця була забита з метою подальшого отримання сироваток крові.

Специфічність гіперімунних сироваток визначали в ІФА, використовуючи набір IDEXX (США), з антигенами вірусів ІБК (інфекційного бронхіту курей), БГ (хвороби Гамборо) та МПВ. У РЗГА (реакція затримки гемаглютинації) – до вірусів НХ (хвороби Ньюкасла) та СЗН-76 (синдрому зниження несучості). Позитивна реакція була виявлена тільки з метапневмовірусним антигеном, з іншими – негативна. Негативні сироватки були вільні від антитіл.

Наступний етап роботи включав розробку ІФА-тест-системи до МПВІ. Було відпрацьовано оптимальні співвідношення компонентів для виготовлення ІФА-діагностикума.

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

При відпрацюванні оптимальних співвідношень компонентів (антигена та кон'югата) для виготовлення

ІФА-діагностикума було визначено їх робочі розведення методом "шахового титрування":

- антигена, який наносили на планшет – 1:500;
- антивидового імунопероксидазного кон'югата проти Ig G курей – 1:4000.

Для визначення оптимального розведення сироваток і виведення формули обрахунків титрів антитіл методом одного розведення проводили математичний аналіз отриманих результатів. Визначали значення S/P (відношення оптичної густини досліджуваної сироватки до оптичної густини позитивного контролю, з відніманням оптичного показника негативного контролю): S/P100, S/P200, S/P400, S/P800 – у розведеннях 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 (результати обробляли з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel).

Для кожного розведення визначали коефіцієнт кореляції зі значенням титрів, отриманих методом послідовних розведень (значення lg T до lg S/P).

Коефіцієнт кореляції становив для розведень: 1:100 – 90,59%; 1:200 – 92,00%; 1:400 – 92,16%; 1:800 – 88,90%. Розведення сироватки 1:400 мало найвищий коефіцієнт кореляції і було взято за робоче.

У відповідності зі значеннями оптичної густини досліджуваних сироваток, за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel, була побудована калібрувальна крива й виведено рівняння лінійної регресії для обрахунку логарифмічного значення титрів антитіл у сироватках (рис.3).

Обраховано формулу титрів антитіл у сироватках крові курчат при тестуванні їх в одному розведенні:
 $Lg T = 3,7981 + 0,8524 \times lg (S/P400)$.

Також було проведено ідентифікацію ізоляту з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Індикацію і ідентифікацію ізоляту здійснювали методом ПЛР та нуклеотидного секвенування ізоляту. На підставі проведених досліджень у суспензії внутрішніх органів індиків (трахея, легені) виявлено вірус, який відноситься до підтипу В роду *Metapneumovirus*, підроду *Pneumovirinae*, родини *Paramyxoviridae*, порядку *Mononegavirales*. Ізоляту надано назву штам "PVT-09/B".

Згідно порівняння нуклеотидної послідовності фра-



Рис.4. Клінічні ознаки пневмовірусу в індички

гмента гена G штаму "PVT-09/B" з послідовностями штампів та ізолятів метапневмовірусу птиці підтипу В, що опубліковані в базі даних GenBank, встановлено, що ізолюваний від хворих індиків (рис. 4) пневмовірус філогенетично близький бразильським штамам пневмовірусу (aMPV chicken B Brazil 27A-07 2007 та MPV/B/Brazil-07/USP-08 G).

Наступний етап розробки ІФА-тест системи МПВ включав визначення позитивно-негативного порогу тест-системи та встановлення її чутливості та специфічності (порівняльний аналіз результатів тестування сироваток у ІФА, РНГА).

Для об'єктивної оцінки імунної відповіді встановлено позитивно-негативний поріг (ПНП). Досліджено 40 негативних сироваток крові від курчат, які були отримані при вирощуванні у камеральних умовах. Сироватки протестовані розробленим нами набором ІФА для визначення антитіл методом послідовних розведень. В якості позитивного та негативного контролю були взяті контрольні сироватки (позитивний та негативний контроль), які були отримані на інтактних курчатах.

1. Тестування сироваток в одному розведенні та визначення ПНП

Розведення	Кількість проб	Середнє оптичне значення	Мінімальне оптичне значення	Максимальне оптичне значення	Стандартне відхилення	Стандартна похибка
1:100	40	0,130625	0,112	0,174	0,013756	0,002175
1:200		0,092775	0,076	0,109	0,009225	0,001459
1:400		0,083225	0,063	0,099	0,010516	0,001663
1:800		0,076775	0,058	0,099	0,009937	0,001571
1:1600		0,074850	0,061	0,092	0,008442	0,001335
1:3200		0,074350	0,060	0,091	0,008952	0,001415
1:6400		0,072950	0,057	0,088	0,007802	0,001235
1:12800		0,077850	0,063	0,091	0,007213	0,001140

2. Результати перевірки чутливості, специфічності та відтворюваності тест-системи

Сироватки	Оптична густина	Титри
Негативні польові сироватки (15 сироваток)	0,031-0,038	47-134
Позитивні польові сироватки (15 сироваток)	0,462-1,204	3837-8993
Негативні контрольні сироватки (10 сироваток)	0,030-0,036	12-107
Позитивні контрольні сироватки (10 сироваток)	0,691-0,774	5513-6097
1 негативна польова сироватка в 5 повторах	0,033-0,036	63-107
2 негативна польова сироватка в 5 повторах	0,030-0,038	30-134
3 негативна польова сироватка в 5 повторах	0,032-0,038	47-134
1 позитивна польова сироватка в 5 повторах	0,801-0,809	6299-6341
2 позитивна польова сироватка в 5 повторах	0,817-0,876	6527-6802
3 позитивна польова сироватка в 5 повторах	0,500-0,548	4123-4479

ПНП визначали шляхом розрахунку середніх значень оптичної густини негативних сироваток для кожного розведення з додаванням потрібного значення стандартного відхилення.

Отриманий результат у вигляді прямої ПНП є порогом, що вказує на верхні 0,5% негативних величин. Середнє значення оптичної густини сироваток з додаванням потрібного значення стандартного відхилення відповідає нижньому позитивному титру антитіл до МПВ. Проведено перерахунок для тестування в одному розведенні та вираховано ПНП. Дані наведені в таблиці 1.

На основі отриманих даних, за раніше виведеною формулою:

$\lg T=3,7981+0,8524 \cdot \lg (S/P)$, визначено ПНП (позитивно-негативний поріг) – негативні сироватки з титром від 0-850, від 850 і більше – позитивні.

Оцінку чутливості та специфічності тест-системи було проведено шляхом порівняльного аналізу результатів тестування сироваток у тест-системі ІФА (ДДСП НААН) з ІФА-тест-системою фірми IDEXX (США) та РНГА-діагностиком (ДДСП НААН). Паралельно порівнювалися 60 сироваток крові курчат з різною активністю (30 сироваток від курей, що не щеплювали від МПВІ та 30 сироваток крові курчат, щеплених від МПВІ).

У не щепленої птиці титри у РНГА були нульові, в ІФА (ДДСП НААН) – від 24 до 79 (позитивно-негативний поріг 850), в ІФА (IDEXX) – від 37 до 390 (ПНП 396) – нижче порогових.

У щепленої птиці титри у РНГА були 1:16-1:64, в ІФА (ДДСП НААН) знаходились в межах від 3017 до 9756, в ІФА (IDEXX) – від 674 до 2578.

Простежується 100% повторюваність результатів по всіх трьох діагностикмах.

Проведено комісійні міжлабораторні випробування "Набору компонентів для визначення антитіл до метапневмовірусної інфекції птиці в сироватках крові курей імуноферментним методом", підготовлено методуку проведення досліджень.

Протестовані сироватками крові з різними титрами антитіл за показниками: специфічність, чутливість та відтворюваність. Результати наведені в таблиці 2.

Специфічність тест-системи, яка визначалась у відсотках за співвідношенням негативно реагуючих сироваток до дійсно негативних сироваток, становила 100%.

Чутливість тест-системи становила 100% (співвідношення позитивно реагуючих сироваток до дійсно позитивних сироваток).

Відтворюваність тест-системи, що визначалась за відсотком розбігу від середнього значення оптичної густини зразків однієї сироватки становила 0,5-3,3% для позитивної сироватки (3 сироватки у 5-и повторах) та 3,7-9,6% для негативної сироватки (3 сироватки у 5-и повторах), тобто в межах норми. Гіперімунні сироватки до інфекційного бронхіту курей, інфекційної бурсальної хвороби, реовірусної інфекції, хвороби Ньюкасла, синдрому зниження несучості не мали титрів при тестуванні. Виготовлено дослідні зразки ІФА-діагностикума для визначення антитіл до метапневмовірусу в сироватках крові курей.

Також розроблено наукову документацію – інструкцію з виготовлення та контролю тест-системи для виявлення антитіл до метапневмовірусної інфекції в сироватках крові курей імуноферментним методом та настанову з її використання, що затверджені в ДДСП НААН.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено метод очищення та концентрування МПВ шляхом поетапного ультрацентрифугування з метою його використання при розробці ІФА-діагностикума.
2. Одержано специфічні гіперімунні сироватки крові на курчатах з титрами антитіл 4344 (BioChek, Нідерланди) і 2808 (IDEXX, США) для ІФА-діагностикума. За допомогою ІФА та РЗГА визначена специфічність отриманих гіперімунних сироваток. Позитивна реакція була виявлена тільки з метапневмовірусним антигеном, з іншими (з антигенами вірусів ІБК, ІББ, НХ та СЗН-76) – негативна.

3. Відпрацьовано оптимальні співвідношення компонентів для виготовлення ІФА-діагностикума: антигена – 1:500, антивидового імунпероксидазного кон'югату проти Ig G курей – 1:4000. За робоче розведення сироватки прийнято розведення 1:400. Виведено рівняння лінійної регресії для обрахунку логарифмічного значення титрів антитіл у сироватках. Обраховано формулу визначення титрів антитіл у сироватках крові курчат при тестуванні їх в одному розведенні.
4. Встановлено, що ізольований від хворих індиків пневмовірус філогенетично близький бразильським штамам пневмовірусу (aMPV chicken B Brazil 27A-07 2007 та MPV/B/Brazil-07/USP-08 G).
5. Результати міжлабораторної комісійної тест-системи для виявлення антитіл до метапневмовірусної інфек-

А.В. ЦИНОВИЙ, Л.І. НАЛИВАЙКО

DOI: <https://dx.doi.org/10.31548/poultry2021.05-06.024>

Тест-система ІФА для метапневмовірусної інфекції птиці: методологія розробки і використання в ветеринарній практиці

Анотація. *Из-за отсутствия диагностических наборов для определения антител к метапневмовирусной инфекции (МПВИ) эпизоотологический мониторинг в хозяйствах Украины практически не проводится, импортные тест-системы имеют высокую стоимость, поэтому возникла потребность в разработке отечественных методов диагностики данного заболевания. Наиболее точным методом и простым в использовании является тест-система на основе ИФА (иммуноферментного анализа). Цель исследований – разработка отечественной диагностической тест-системы ИФА для метапневмовирусной инфекции (МПВИ).*

Разработана диагностическая тест-система ИФА и установлено, что этот диагностикум нужно использовать в практике ветеринарной медицины для серологического контроля метапневмовирусной инфекции.

Отработаны оптимальные соотношения компонентов для изготовления ИФА тест-системы. Выведена формула расчета титров антител в сыворотках крови цыплят при тестировании их в одном разведении. Определены чувствительность и специфичность тест-системы ИФА (сравнительный анализ результатов тестирования сывороток в ИФА, РНГА (реакции непрямої гемаглютинації) и в РН (реакции нейтрализації)). Разработана научная документация – инструкция по изготовлению и контролю тест-систем ИФА для выявления антител к метапневмовирусной инфекции

ції у сироватках крові курей імуноферментним методом свідчать про те, що цей діагностикум є чутливим та специфічним. Його можна використовувати для раннього виявлення інфекції, диференційної діагностики від інших захворювань, проводити контроль за розповсюдженням інфекції в птахогосподарствах (визначення епізоотичної ситуації) та визначати рівень напруженості імунітету при щепленні птиці.

Перспективи подальших досліджень полягають у тому, що у світі нових обставин – пандемії та поширення особливо небезпечних для людини вірусів, даний алгоритм можна застосовувати (основні принципи розробки) не тільки в ветеринарії, але й у медицині при розробці тест-систем ІФА та вивченні поствакцинального імунітету до респіраторних захворювань. ■

в сыворотках крови кур и руководство по ее использованию.

Была проведена индикация и идентификация полученного изолята вируса, ее осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и нуклеотидного секвенирования. На основании проведенных исследований в суспензии внутренних органов индеек (трахея, легкие) обнаружен вирус, который относится к подтипу В рода Metapneumovirus, подсемейства Pneumovirinae, семейства Paramyxoviridae, порядка Mononegavirales. Согласно сравнения нуклеотидной последовательности фрагмента гена G штамма "PVT-09/B" с последовательностями штаммов и изолятов метапневмовирус птицы подтипа В, опубликованных в базе данных GenBank, установлено, что изолированный от больных индеек метапневмовирус филогенетически близок бразильским штаммам метапневмовируса (aMPV chicken B Brazil 27A-07 2007 и MPV/B/Brazil-07/USP-08 G).

Ключевые слова: *куры, сыворотки крови, диагностика, ИФА, метапневмовирус*

O.V. TSINOVYI, Candidate of Biological Sciences, **L.I. NALYVAYKO,** Doctor of Veterinary Sciences, State Poultry Research Station National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
E-mail: tsynovalxvet@ukr.net

DOI: <https://dx.doi.org/10.31548/poultry2021.05-06.024>

ELISA test metapneumoviral infection of bird: methodology of development and use in veterinary practice

Abstract. *In the absence of diagnostic kits for the detection of antibodies to metapneumovirus infection (MPVI) epizootological monitoring in Ukrainian farms is practically not carried out, imported test systems have a "sky-high" price, so there is a need for domestic methods of diagnosing this disease. The most accurate, easy-to-use*

method is ELISA-based test systems (enzyme-linked immunosorbent assay). A diagnostic ELISA test system for the detection of antibodies to MPVI has been developed and it has been established that this diagnosticum should be used in the practice of veterinary medicine for serological control of metapneumovirus infection.

The optimal ratios of components for the manufacture of ELISA test system have been worked out. The form of calculation of antibody titers in blood sera of chickens when testing them in one dilution is calculated.

The sensitivity and specificity of the ELISA test system were determined (comparative analysis of serum testing results in ELISA, RING and RN). Scientific documentation has been developed – instructions for the manufacture and control of ELISA test systems for the detection of antibodies to metapneumovirus infection in the serum of chickens and instructions for its use.

Indication and identification of the obtained virus isolate was carried out using polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequencing. Based on the studies carried out in the suspension of the internal organs of turkeys (trachea, lungs), a virus belonging to subtype B of the genus Metapneumovirus, subfamily Pneumovirinae, family Paramyxoviridae of the order Mononegavirales was revealed.

By comparing the nucleotide sequence of the G gene fragment of the PVT-09/B strain with the sequences of strains and isolates of the avian metapneumovirus subtype B published in the GenBank database, it was found that the metapneumovirus isolated from sick turkeys is phylogenetically close to the Brazilian strains 27A-07 2007 and MPV/B/Brazil-07/USP-08 G.

Key words: chickens, blood sera, diagnostics, ELISA, metapneumovirus

Література

- Абгарян С.Р.** Эпизоотологические особенности метапневмовирусной инфекции птиц у кур-несушек: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02. Санкт-Петербург, 2020. 131с.
- Борисова И.А., Старов С.К.** Пневмовирусная инфекция птиц. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. Владимир, 2006. Т.4, С. 281-296.
- Бочкарев В.С.** Иммунологические свойства вакцинных штаммов метапневмовируса птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02. Санкт-Петербург, 2013. 21 с.
- Волкова М.А.** Непрямой вариант иммуноферментного метода для определения антител к пневмовирусу птиц: материалы международной научной конференции ФГУ "ВНИИЗЖ". *Актуальные проблемы инфекционной патологии животных*. Владимир, 2003. С. 358–361.
- Дмитриев Д.В.** Серологический мониторинг на метапневмовирусную инфекцию птиц на основе иммуноферментного анализа. *Ветеринарная практика*. 2010. №2(49). С. 20–22.
- Ирза В.Н., Оковитая Т.В., Борисов В.В.** Серологический мониторинг по птичьему пневмовирусу (Avian Pneumovirus – APV) в России. *Материалы конференции по птицеводству*. Зеленоград, 2003. С. 222–223.
- Лисенкова А.С.** Экспресс-метод диагностики метапневмовирусной инфекции птиц на основе иммуноферментного анализа: автореф. дис. ... канд. вет. наук 06.02.02. Санкт-Петербург, 2013. 23 с.
- Никитина Н.В., Трефилов Б.Б., Лисенкова А.С.** Влияние физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. *Ветеринарная практика*. 2012. №2(57). С. 36–39.
- Cook J.K.A., Cavanagh D.** Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology*. 2002, Vol. 31. P. 117–132. doi:10.1080/03079450120118603
- Felippe P.A., Silva L.H.A., Santos M.B., Sakata S.T., Arns C.W.** Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology*. 2011. Vol. 40, №5. P. 445–452. doi: 10.1080/03079457.2011.596812
- Giovanni F., Matteo L., Giulia M., Claudia M.T., Caterina L., Giulia Q., Elen, C., Mattia C.** Avian Metapneumovirus subtype B around Europe: A phylodynamic reconstruction. *Veterinary Research*. 2020. №51. P. 88.
- Hristova M., Petrova R.** Coinfection of chicken anatmia virus mycoplasma galisepticum. Avian metapneumovirus and avian reovirus in fancy chicken. *Tradition and modernity in veterinary medicine*. 2017. Vol. 2, № 2. P. 17–22.
- Jiang, N., Jiang, F., Sun, F., Wang, K., Wang, S.** Research progress on avian Metapneumovirus. *Chinese Animal Health Inspection*. 2020. № 37. P. 86–91.
- Umar S., Sabir H., Ahmed A., Subhan S.** Avian metapneumovirus infection in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2016, Vol. 72(4), P. 833–846. doi: 10.1017/S0043933916000738
- Yu M., Xing L., Chang, F., Bao, Y., Wang, S., He X., ... Gao Yu.** Genomic sequence and pathogenicity of the first avian Metapneumovirus subtype B isolated from chicken in China. *Veterinary Microbiology*. 2019. № 228. P. 32–38. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.11.009
- Zhu Y., Gong X., Guo W., Xu B., Li, L., Lang F., Liu H., Liu D., Fan H.** Molecular epidemiological analysis of avian Metapneumovirus in some areas of China from 2012 to 2015. *Prog. Veterinary Medical*. 2016. № 37. P. 30–34.

References

- Abgaryan, S.R.** (2020). Epizootologicheskie osobennosti metapnevovirusny infektsii ptits u kur-nesushek [Epizootological features of metapneumovirus infection of birds. in laying hens]. All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg, 131. [in Russian].
- Borisova, I.A., & Starov, S.K.** (2006). Pnevmovirusnaya infektsiya ptits [Pneumovirus infection of birds]. *Trudy Federal'nogo tsentra ohrany zdorovya zhivotnykh* [Proceedings of the Federal Center for Animal Health]. Vladimir, 4, 281-296. [in Russian].
- Bochkarev, V.S.** (2013). Immunologicheskie svoystva vaksinnnykh shtammov metapnevovirusa ptits [Immunological properties of avian metapneumovirus vaccine strains]. All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg, 21. [in Russian].
- Cook, J.K.A., & Cavanagh, D.** (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology*, 31, 117-132. doi:10.1080/03079450120118603. [in English].
- Dmitriev, D.V.** (2010). Serologicheskiy monitoring na metapnevovirusnuyu infektsiyu ptits na osnove immunofermentnogo analiza [Serological monitoring for

- avian metapneumovirus infection based on enzyme-linked immunosorbent assay]. *Veterinarnaya praktika* [Veterinary practice], 2(49), 20-22. [in Russian]
- Felippe, P.A., Silva, L.H.A., Santos, M.B., Sakata, S.T., & Arns C.W.** (2011). Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology*, 40(5), 445-452. doi: 10.1080/03079457.2011.596812. [in English].
- Giovanni, F., Matteo, L., Giulia, M., Claudia, M.T., Caterina, L., Giulia, Q., Elen, C., & Mattia, C.** (2020). Avian Metapneumovirus subtype B around Europe: A phylodynamic reconstruction. *Veterinary Research*, 51, 88. [in English].
- Hristova, M., & Petrova, R.** (2017). Coinfection of chicken anatmia virus mycoplasma galisepticum. Avian metapneumovirus and avian reovirus in fancy chicken. *Tradition and modernity in veterinary medicine*, 2(2), 17-22. [in English].
- Irza, V.N., Okovyitaya, T.V., & Borisov, V.V.** (2003). Serologicheskiy monitoring po ptichemu pnevmovirusu (Avian Pneumovirus – APV) v Rossii: materialyi konferentsii po ptitsevodstvu [Avian Pneumovirus (APV) Serological Monitoring in Russia: Proceedings of the Poultry Conference]. Zelenograd, 222-223. [in Russian].
- Jiang, N., Jiang, F., Sun, F., Wang, K., & Wang, S.** (2020). Research progress on avian Metapneumovirus. *Chinese Animal Health Inspection*, 37, 86-91. [in Chinese].
- Lisenkova, A.S.** (2013). Ekspres-metod diagnostiki metapnevovirusnoy infektsii ptits na osnove immunofermentnogo analiza [Rapid method for diagnosing metapneumovirus infection in birds based on enzyme-linked immunosorbent assay]. All-Russian Scientific Research Institute of Poultry. Sankt-Peterburg 23. [in Russian].
- Nikitina, N.V., Trefilov, B.B., & Lisenkova, A.S.** (2012). Vliyaniye fiziko-himicheskikh faktorov na chuvstvitel'nost i spetsifichnost immunofermentnogo analiza [The influence of physicochemical factors on the sensitivity and specificity of the enzyme immunoassay]. *Veterinarnaya praktika* [Veterinary practice], 2(57), 36-39. [in Russian].
- Umar, S., Sabir, H., Ahmed, A., & Subhan, S.** (2016). Avian metapneumovirus infection in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 72(4), 833-846. doi: 10.1017/S0043933916000738. [in English].
- Volkova, M.A.** (2003). Nepriyamoj variant immunofermentnogo metoda dlya opredeleniya antitel k pnevmovirusu ptits: materialyi mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii FGU "VNIIZh" [An indirect variant of the enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of antibodies to avian pneumovirus: materials of the international scientific conference of FGU "VNIIZh"]. *Aktualnyie problemy infektsionnoy patologii zhivotnyih* [Actual problems of infectious pathology of animals]. Vladimir, 358-361. [in Russian].
- Yu, M., Xing, L., Chang, F., Bao, Y., Wang, S., He, X., ... Gao, Yu.** (2019). Genomic sequence and pathogenicity of the first avian Metapneumovirus subtype B isolated from chicken in China. *Veterinary Microbiology*, 228, 32-38. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.11.009. [in Chinese].
- Zhu, Y., Gong, X., Guo, W., Xu, B., Li, L., Lang, F., Liu, H., Liu, D., & Fan, H.** (2016). Molecular epidemiological analysis of avian Metapneumovirus in some areas of China from 2012 to 2015. *Prog. Veterinary Medical*, 37, 30-34. [in Chinese].

ЦЕ ЦІКАВО

Який колір корму подобається курям найбільше?

Вчені перевірили вплив кольору корму на споживання його бройлерами та отримали цікаві результати.

Дослідники Джозеф П. Гуліція і Кевін М. Даунс зі Школи сільського господарства Державного університету Середнього Теннесі (США) вирішили дізнатися більше про курячі переваги щодо корму. Свої спостереження і висновки вони виклали в статті, опублікованій в журналі "Animals 2021".

Добре відомо, що птахи, в тому числі й кури, бачать у широкому діапазоні колірних спектра, але деякі кольори можуть бути стимулюючими.

Так, у курей розвинутий триколірний зір, який дозволяє їм бачити усі ділянки видимого світлового спектра та трохи ультрафіолету. Крім розпізнавання кольору, птиця запам'ятовує певні колірні ознаки. У кількох експериментах бройлери споживали значно більше корму в приміщенні з зеленим освітленням і зеленим кормом у порівнянні з іншими поєднаннями світла та корму.

З метою розширення бази знань, пов'язаних з фарбуванням кормів для домашньої птиці, це досліджен-

ня було зроблено для оцінки того, як зміна кольору корму може вплинути на продуктивність бройлерів.

Збільшення споживання корму бройлерами, викликане фарбуванням, з супутнім поліпшенням продуктивності могло б стати корисним інструментом у сучасному птахівництві. Для цього дослідження вибрали кольори, які охоплюють широкий діапазон видимого спектра й представляють довші (червоний, оранжевий, жовтий, зелений) і більш короткі довжини хвиль (синій і фіолетовий), та відповідно запропонували птахам пофарбований корм і звичайний для порівняння.

Найбільше ефективними кольорами виявилися синій і фіолетовий. Приріст живої маси бройлерів за два тижні (1-14 діб) був більшим при використанні фіолетового корму (490,78 г/гол.), ніж помаранчевого (467 г/гол.) і жовтого (461 г/гол.) та контрольного (474 г/гол.). Такий поведінці є пояснення.

Відне світло проходить через чотири оптичні структури очей птиці: рогівку, передню камеру, кристалик і склоподібне тіло. Вважається, що ці структури пропускають хвилі ближ-



нього ультрафіолетового діапазону з довжиною хвилі приблизно 310 нм і збільшувальним ефектом. Тобто, птиця відчуває збільшення візуальних явищ з короткохвильовою відбивною здатністю. Можливо тому, відповідно забарвлений корм здається їм більшим і привабливішим.

За матеріалами: ptichki.net