



Пваринництво, ветеринарна медицина

УДК 619:616-07:576.85

© 2015

О.В. Циновий,
кандидат
біологічних
наук

О.А. Шомін
Державна
дослідна станція
птахівництва НААН

ДІАГНОСТИКА МЕТАПНЕВМОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ВІТЧИЗНЯНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Мета. Розробити ІФА-діагностикум для контролю метапневмовірусної інфекції (МПВІ) птиці. **Методи.** Для створення тест-системи ІФА для визначення антитіл до МПВІ птиці було застосовано методи накопичення вірусу на перещеплюваній культурі клітин та очищення вірусу з використанням поетапного ультрацентрифугування. **Результати.** Розроблено вітчизняну тест-систему ІФА для визначення специфічних антитіл до МПВІ в сироватках крові курей. Розроблено технологію постановки діагностикуму в одному розведенні сироватки крові, що поліпшує точність аналізу. **Висновки.** На Державній дослідній станції птахівництва НААН уперше в Україні створено вітчизняну тест-систему ІФА для визначення специфічних антитіл до МПВІ в сироватках крові курей. Діагностикум є найкращим експрес-методом виявлення інфекції, за допомогою якого можна контролювати напруженість імунітету у щепленої птиці, а також опосередковано визначати наявність захворювання у нещеплених стад курей.

Ключові слова: метапневмовірус, тест-система ІФА, антитіла, сироватка крові курей.

Щороку дедалі більше в Україну завозять високопродуктивну птицю з-за кордону. У цьому процесі є як позитивні сторони, так і негативні. Негативний момент — це поширення хвороб, яких раніше не було на нашій території. До таких хвороб також належить і метапневмовірусна інфекція (МПВІ) птиці. Ретельніші дослідження щодо цієї інфекції розпочалися після 2000 р. (у нашій лабораторії — з 2009 р., вперше в Україні). Оскільки захворюваність і смертність за МПВІ серед птиці на птахофабриках може становити 10–90%, виникла потреба в правильній діагностиці захворювання та в диференціюванні його від

інших захворювань [2, 4].

У завезених імпортованих кросів птиці почали виявляти МПВІ в багатьох регіонах країни. Це захворювання характеризується запаленням верхніх дихальних шляхів (носових пазух, синусів і трахеї). Виникає захворювання у курей, індиків і курчат-бройлерів. Способи передачі вірусу — контактний та повітряно-крапельний.

Про поширення цього захворювання відомо у всьому світі, його виявлено практично на всіх континентах [1–3]. Нині знайдено 4 підтипи вірусу, що викликають захворювання: 2 з них (А і В) — в Європі, Азії та Південній Америці; 1 (D) — тільки у Франції; підтип С

виділено тільки у Північній Америці.

Контроль за поширенням цього захворювання в Україні раніше не проводили. Нашими дослідженнями встановлено, що на території України трапляється переважно підтип В.

У багатьох країнах світу для діагностики МПВІ використовують різні реакції: РНІФ, РН, ІФА та метод імуноцитохімії. За їх допомогою можна встановити епізоотологічний діагноз на МПВІ, але оцінити напруженість імунітету після щеплення птиці неможливо. Також можна використати молекулярно-генетичні дослідження (ПЛР), проте остаточний діагноз потрібно ставити комплексно з використанням вірусологічних і серологічних досліджень [7, 8].

Для того щоб проводити моніторинг на напруженість імунітету до цього захворювання, потрібні доступніші, прості у використанні, чутливіші серологічні реакції, які можуть бути використані як для вивчення епізоотичної ситуації в господарствах щодо МПВІ, так і контролю імунітету після щеплення птиці [4–6, 9, 10]. Такими реакціями є реакція непрямой гемаглютинації (РНГА) та імуноферментний аналіз (ІФА). За кордоном були розроблені тест-системи ІФА для виявлення антитіл до МПВІ, але вони практично недоступні для ветеринарних лабораторій України, оскільки вартість їх у межах 20–25 тис. грн. За період від 2009 по 2015 р. у нашій лабораторії було розроблено тест-систему РНГА для визначення антитіл до МПВІ у курей та індиків. Перевага цієї системи в її універсальності (дослідження можна проводити на двох видах птиці) та простоті використання. Також нами розроблено тест-систему ІФА для визначення антитіл до МПВІ у курей. Перевагами цієї тест-системи є вища точність порівняно до РНГА і ціна, менша у 4 рази порівняно до закордонних аналогів.

Надалі ці діагностикуми можуть стати на озброєнні багатьох ветеринарних

лабораторій. З їх допомогою можна буде контролювати як поширення цього захворювання в Україні, так і напруженість імунітету у щепленої птиці. Використання вітчизняних наборів (не тільки до МПВІ, а й до інших захворювань у птиці) дасть змогу мати здорову птицю в господарствах України та зекономити велику кількість коштів під час закупівлі закордонних препаратів.

Мета досліджень — розробка ІФА-діагностикуми для контролю МПВІ птиці.

Матеріали та методи. Діагностичну цінність тест-системи ІФА перевіряли порівняно з американською тест-системою ІФА виробництва фірми IDEXX (США).

Напрацювання МПВІ для ІФА діагностики здійснювали способом його репродукції на перещеплюваній культурі клітин *Vero*.

Для ІФА-діагностикуми напрацьований антиген очищали та концентрували за розробленою нами схемою, яка включала підготовчий етап — заморожування та розморожування вірусу, попереднє його очищення — низькошвидкісне центрифугування, концентрування вірусу з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ-6000) та завершальне очищення вірусу через шар сахарози. Методику очищення вірусу адаптовано з урахуванням його властивостей (стійкості до фізичного впливу, розміру вірусних частинок, питомої густини).

Гіперімунну сироватку крові отримували способом гіперімуназації 30-денних курчат за розробленою нами схемою (отримано патент). Нормальну сироватку одержували з крові інтактних курчат віком 90 днів методом тотального знекровлення. Діагностичні сироватки крові зберігали у замороженому (за температури -20°C) та ліофілізованому стані. Сенсibiliзацію планшетів, внесення досліджуваних сироваток на планшети та антивидового кон'югату проводили за

Результати перевірки специфічності, чутливості та відтворюваності тест-системи ІФА

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

загальноприйнятими методиками [9].

Результати досліджень. Розробка тест-системи складається з підбору оптимального робочого розведення сироватки та виведення формули з метою визначення титрів антитіл в одному розведенні. Для цього було досліджено 100 проб польових сироваток крові курей з різним рівнем антитіл до МПВІ. Рівень антитіл визначали методом непрямого твердофазного ІФА послідовними розведеннями сироватки від 1:100 до 1:12800.

Також відпрацьовано оптимальні співвідношення компонентів, які використовують для постановки реакції (антигену і кон'югату) та визначено їх робочі розведення методом «шахового титрування»:

- антигену (очищеного МПВІ), що наносили на планшет — 1:500;
- антивидового імунопероксидазного кон'югату проти Іg G курей — 1:4000.

Для визначення оптимального розведення сироваток та виведення формули обрахунків титрів антитіл методом одного розведення проводили математичний аналіз отриманих результатів. Вираховували значення S/P (співвідношення оптичної щільності досліджуваної сироватки і оптичної щільності 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 Іg T до Іg S/P). Коефіцієнт кореляції становив для розведень: 1:100 — 90,59%; 1:200 — 92; 1:400 — 92,16; 1:800 — 88,90%. Розведення сироватки 1:400 мало найвищий

коефіцієнт кореляції і взято за робоче.

Відповідно зі значеннями оптичних густин досліджуваних сироваток, за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel побудовано калібрувальну криву й виведено рівняння лінійної регресії для обрахунку логарифмічного значення титрів антитіл у сироватках (рис. 1).

Обраховано формулу титрів антитіл у сироватках крові курчат під час їх тестування в одному розведенні: $Ig T = 3,7981 + 0,8524 \cdot Ig (S/P400)$, що спрощує аналіз.

Для об'єктивної оцінки імунної відповіді встановлено позитивно-негативний поріг (ПНП). Досліджено 40 негативних сироваток крові від курчат, отриманих за вирощування у камеральних умовах. Сироватки протестовані розробленим нами набором ІФА для визначення антитіл методом послідовних розведень. Як позитивний та негативний контроль були взяті контрольні сироватки, отримані від інтактних курчат. Проведено перерахунок для тестування в одному розведенні та вираховано ПНП. На основі отриманих результатів за раніше виведеною формулою $Ig T = 3,7981 + 0,8524 \cdot Ig (S/P)$ визначено ПНП — негативні сироватки від 0 до 850, позитивні — від 850 та вище.

Після введення даних за формулою для розрахунку в програму Microsoft Excel можна визначати титри антитіл у досліджуваних сироватках в одному розведенні сироватки.

Проведено порівняльний аналіз результатів тестування сироваток у тест-системі ІФА, розробленій у ДДСП НААН з ІФА-тест-системою фірми IDEXX. Водночас порівнювали 60 сироваток крові курчат з різною активністю (30 сироваток крові від курей, не щеплених проти МПВІ, та 30 сироваток крові курчат, щеплених проти МПВІ).

У нещепленої птиці титри антитіл в ІФА МПВІ (ДДСП) становили від 24 до 79 (за ПНП 850), в ІФА МПВІ (IDEXX) — від 37 до 390 (за ПНП 396); у щепленої птиці — від 3017 до 9756 (в ІФА МПВІ, ДДСП) та від 674 до 2578 (ІФА МПВІ, IDEXX). З огляду на те, що набори мають різний ПНП, титри антитіл відрізняються за абсолютними значеннями.

Отже, простежується 100%-ва подібність результатів за даними діагностикумами, тобто сироватки крові курей, що не мають антитіл до цього захворювання, не виявлено в обох наборах, і навпаки, сироватки з наявністю протективних титрів антитіл до цього захворювання виявляють обидві використані тест-системи.

У 2014 р. було проведено комісійне міжлабораторне випробування «Набори компонентів

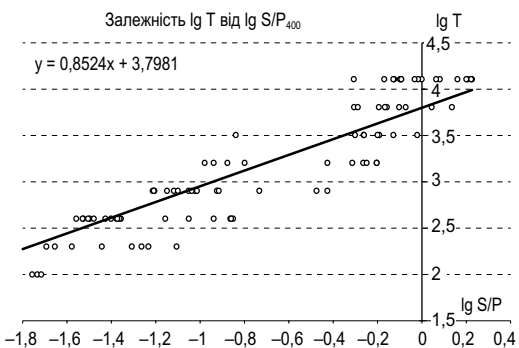


Рис. 1. Калібрувальна крива значення Іg T до Іg S/P

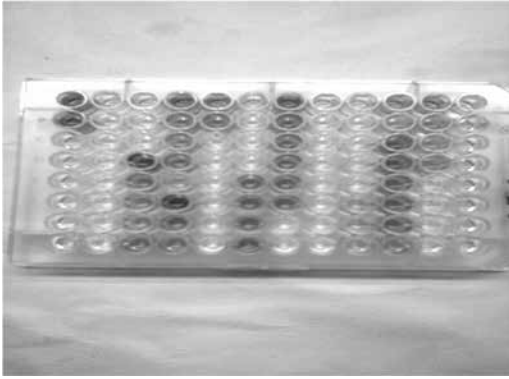


Рис. 2. Результати міжлабораторної комісійної перевірки

для визначення антитіл до метапневмовірусної інфекції птиці в сироватках крові курей імунферментним методом». Здійснено тестування сироватками крові з різними титрами антитіл за показниками: специфічність, чутливість

і відтворюваність (таблиця).

Специфічність тест-системи за співвідношення негативно реагуючих і дійсно негативних сироваток становила 100%. Чутливість тест-системи — 100% (співвідношення позитивно реагуючих сироваток і 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-ти повторях) та 3,7–9,6% — для негативної сироватки (3 сироватки у 5-ти повторях), тобто в межах норми. Гіперімунні сироватки до ІБК, ІББ, РЕО, НХ, ССЯ не мали титрів під час тестування (рис. 2).

Враховуючи наведені вище дані, можна стверджувати, що розроблена вітчизняна тест-система для визначення антитіл до МПВІ курей має високу чутливість і специфічність, дешевша від закордонних аналогів у 4 рази, тому є доступною для використання в лабораторіях ветеринарної медицини України.

Висновки

Завдяки розробленій тест-системі ІФА для визначення специфічних антитіл до МПВІ птиці можна проводити епізоотологічний моніторинг цього захворювання та контроль

поствакцинального імунітету у щепленої птиці в птахогосподарствах України. Реакція є кількісною, простою у використанні, проводиться в одному розведенні сироватки.

Бібліографія

1. Борисова І.А. Метапневмовірусная инфекция птиц/И.А. Борисова, А.В. Борисов//РацВетИнформ. — 2009. — № 12. — С. 9–11.
2. Борисова І.А. Пневмовірусная инфекция птиц/И.А. Борисова, С.К. Старов//Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — Владимир, 2006. — Т. 4. — С. 281–296.
3. Борисова О.А. Метапневмовірусная инфекция птиц/О.А. Борисова, И.А. Борисова/Обзор литературы. — Владимир, 2007. — С. 30–38.
4. 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.
5. Ирза В.Н. Проблемы респираторных заболеваний в современном птицеводстве/В.Н. Ирза, А.В. Борисов, В.В. Дрыгин//1-й Международный ветеринарный конгресс по птицеводству. — М., 2005. — С. 14–22.
6. Ирза В.Н. Серологический мониторинг по птичьему пневмовирусу (Avian Pneumovirus — APV) в России/В.Н. Ирза, Т.В. Оковытая, В.В. Борисов// Конференция по птицеводству. — Зеленоград, 2003. — С. 222–223.
7. Капустин В.Н. Диагностика и профилактика пневмовируса у кур-несушек/В.Н. Капустин, В.Г. Лысый//Ветеринария и кормление. — 2005. — № 5. — С. 31.
8. Каспарьянц С. Пневмовирусы птицы/С. Каспарьянц, А. Столляр, Preston Vet Kit//РацВетИнформ. — 2009. — № 11. — С. 8–10.
9. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы с использованием серологических реакций. — Ч. 1: метод. реком./ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008. — С. 59–60.
10. Трефилов Б.Б. Пневмовірусная инфекция птиц (эпизоотология, диагностика)/Б.Б. Трефилов, Н.В. Никитина, Н.В. Денисов//Актуал. пробл. вет. мед. (научно-практ. конгр. 24–25 августа 2007). — СПб., 2007. — С. 210–211.

Надійшла 8.06.2015.