

УДК 619:616-07:576.85

О.В.ЦИНОВИЙ, кандидат біологічних наук
Державна дослідна станція з птахівництва НААН України

Вітчизняна ІФА тест-система для діагностики метапневмовірусної інфекції птиці

Розроблено вітчизняну тест-систему ІФА для визначення специфічних антитіл до метапневмовірусу в сироватках крові курей. Вивчено ефективність її використання для експрес-діагностики даної інфекції, контролю поствакцинального імунітету у щепленій птиці. Визначено технологічні характеристики даного діагностичного та наведена його порівняльна характеристика із закордонним аналогом.

Імуноферментний аналіз, метапневмовірус, кури

Респіраторні вірусні хвороби з яких є найбільш поширеними хвороба Ньюкасла, інфекційний бронхіт курей, грип птиці, інфекційний ларинготрахеїтносять значний економічний збиток птахівництву.

Використання птиці високопродуктивних кросів, що імпортується в Україну, призвело до розповсюдження на птахофабриках раніше невідомих вірусних хвороб, до яких відноситься і метапневмовірусна (пневмовірусна) інфекція птиці (МПВІ), яка вражає верхні дихальні шляхи індиків та курей. Ці захворювання відомі під назвами: у індиків – рінотрахеїт (*Turkey Rhino Tracheitis – TRT*) – запалення носових пазур, синусів та трахеї; курей та курчат – “синдром пухлої голови” (*SHS – Swollen head syndrome*). Причиною захворювання є пневмовірус (APV), що відноситься до роду *Metapneumovirus* підроду *Paramyxovirinae* родини *Paramyxoviridae* (AmPV). Вперше респіраторне захворювання у сільськогосподарської птиці було зареєстровано у 1978 році в Південній Африці. Вчені Morley и Thomson вважали, що його причиною є змішана інфекція, яка може бути викликана коронавірусом (*Coronavirus*) та кишковою паличкою. У 1985 року подібне захворювання у індиків було зареєстровано в Англії (Norfolk) і швидко поширилось в інші країни світу. Недавно AmPV був ізольований від індиків у штатах

Колорадо і Міннесота США [1].

Захворюваність і смертність при TRT-інфекції серед птиці батьківських та промислових стад на фермах коливається від 4 до 90%. Захворюваність на SHS в стадах бройлерів може бути від 1 до 10% [1, 2].

Вірус передається прямим контактним та повітряно-крапельним шляхами. Трансвазіальна передача хвороби до кінця не встановлена [2].

На сьогоднішній день МПВ-інфекція зустрічається у всіх країнах світу з розвинутим птахівництвом (Ізраїль, США, Канада, Англія, Північна Ірландія, Бразилія, Марокко, Росія) [5].

У зв'язку з тим, що племінна і товарна продукція птиці регулярно постачається із-за кордону в Україну, можна припустити наявність даного захворювання і в наших птахівничих господарствах різних форм власності. Дослідження щодо розповсюдження МПВ-інфекції в Україні не проводились. Напруженість імунітету у щепленої птиці до метапневмовірусу спеціалістами господарств не контролювалася у зв'язку з відсутністю в нашій країні діагностичних препаратів.

У багатьох країнах світу для діагностики МПВ-інфекції використовують різні реакції: РНІФ, РН, ІФА та метод імуноцитохімії. За допомогою їх можна встановити епізоотологічний діагноз на МПВ-інфекцію, але оцінити напруженість імунітету після

щеплення птиці неможливо. Тому необхідні інші більш доступні і чутливі серологічні реакції, які можуть бути використані як для вивчення епізоотичної ситуації в господарствах щодо МПВ інфекції, так і контролю імунітету після щеплення птиці [2-5].

Зараз в Україні у науково-дослідних та виробничих ветеринарних лабораторіях відсутні стандартні вітчизняні діагностичні набори для експрес-діагностики МПВІ птиці, а закордонні аналоги мають дуже високу ціну (не менше 15 тисяч гривень) і недоступні для більшості ветеринарних лабораторій.

За період 2012-2014 рр. в Інституті птахівництва НААН України (нині Дослідна державна станція птахівництва) розроблено вітчизняну ІФА-тест-систему для діагностики метапневмовірусної інфекції птиці у птахівничих господарствах різних форм власності.

Мета дослідження – розробити вітчизняну ІФА-тест-систему для контролю МПВІ птиці та провести серологічні дослідження порівняно з ІФА-методом закордонного виробництва.

Матеріали і методи досліджень. Діагностичну цінність ІФА-тест-системи встановлювали порівняно з ІФА-тест-системою “IDEXX” (США).

Накопичення метапневмовірусу для ІФА-методу здійснювали шляхом його репродукції на перещеплюваній культурі клітин

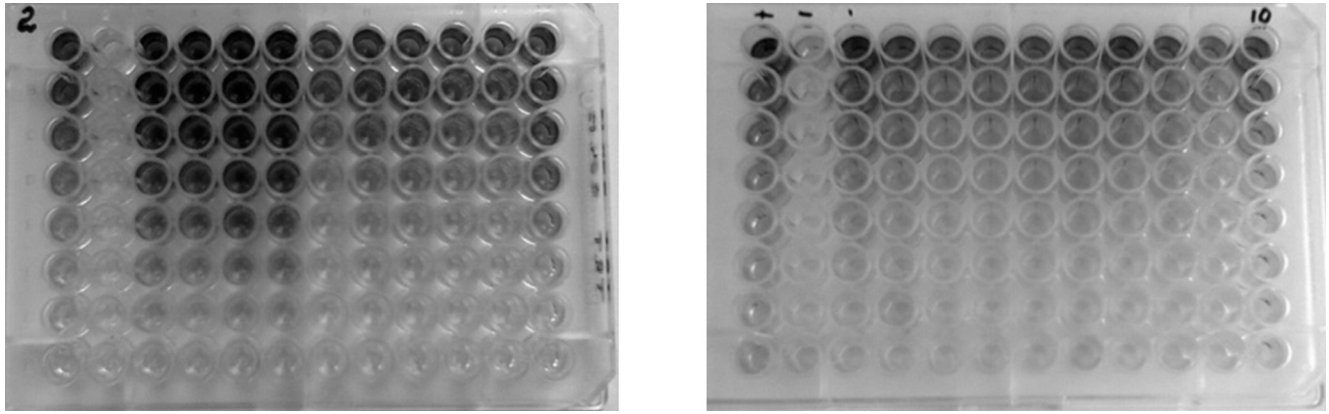


Рис. Визначення рівня антитіл за допомогою вітчизняного ІФА

Тестування сироваток крові

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	40	0,092775	0,076	0,109	0,009225	0,001459
1:400	40	0,083225	0,063	0,099	0,010516	0,001663
1:800	40	0,076775	0,058	0,099	0,009937	0,001571
1:1600	40	0,074850	0,061	0,092	0,008442	0,001335
1:3200	40	0,074350	0,060	0,091	0,008952	0,001415
1:6400	40	0,072950	0,057	0,088	0,007802	0,001235
1:12800	40	0,077850	0,063	0,091	0,007213	0,001140

Vero або на первинно-трипсинізованій культурі клітин курячих СПФ-ембріонів (ФЕК).

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

Гіперімунну сироватку крові отримували шляхом гіперімуназації 30-добових курчат за розробленою нами схемою (отримано патент). Нормальну сироватку одержували з крові інтактних курчат віком 90 діб методом тотального знекровлення. Діагностичні сироватки крові зберігали у замороженому (за температури мінус 20 °С) або ліофілізованому стані. Сенсibilізація планшетів, внесення досліджуваних сироваток на планшети та антивидового кон'югату проводили за загальноприйнятими методами.

Результати досліджень. 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.).

Для виготовлення ІФА-діагностикуму відпрацьовані оптимальні співвідношення компонентів (антигену та кон'югату) та визначено їх робочі розведення методом "шахового титрування":
 – антигену, що наносили на планшет –1:500;
 – антивидового імунопероксидазного кон'югату проти Ig 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 (відношення оптичної щільності досліджуваної сироватки до 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 за використання комп'ютерної програми Microsoft Excel).

Для кожного розведення визначали коефіцієнт кореляції з значенням титрів, отриманих методом послідовних розведень (значення Ig T до Ig S/P). Коефіцієнт кореляції складав 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 з значеннями оптичних густин 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.

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

Для об'єктивної оцінки імунної відповіді встановлено позитивно-негативний поріг (ПНП). Досліджено 40 негативних сироваток крові від курчат, отриманих 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. ПНП визначалось шляхом розрахунку середніх значень оптичної густини негативних сироваток для кожного розведення з додаванням трьох значень 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.

На основі отриманих результа-

тів, за раніше виведеною формулою $Ig T = 3,7981 + 0,8524 \times Lg (S/P)$, визначено ПНП: – негативні сироватки від 0 до 850, позитивні – від 850 та вище.

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" (США). Паралельно порівнювалися 60 сироваток крові курчат з різною активністю (30 сироваток від курей, що не щеплювалися проти метапневмовірусної інфекції (МПВІ) та 30 сироваток крові курчат, щеплених проти МПВІ.

У нещепленої птиці титри антитіл в ІФА МПВ (ДДСП) склали від 24 до 79 (при ПНП 850), в ІФА МПВ ("IDEXX") – від 37 до 390 (при ПНП 396). У щепленої птиці – від 3017 до 9756 (в ІФА МПВ, ДДСП) та від 674 до 2578 (ІФА МПВ, "IDEXX"). У зв'язку з тим, що набори мають різний позитивно-негативний поріг, титри антитіл відрізняються за абсолютними значеннями, що й зумовлюють дані результати.

Таким чином, простежується 100% кореляційна залежність по даним діагностикумам, тобто сироватки курей, 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 використаними тест-системами.

Висновки

Завдяки розробленій тест-системі ІФА для визначення спе-

цифічних антитіл до метапневмовірусу можна проводити епізоотологічний моніторинг даного захворювання та контроль поствакцинального імунітету у щепленої птиці. Реакція є кількісною, простою у використанні, проводиться в одному розведенні сироватки. Порівняно із закордонними аналогами вітчизняна тест-система дешевша у 4 рази.

Разработана отечественная тест-система ИФА для определения специфических антител к метапневмовирусу в сыворотках крови кур. Изучена эффективность её использования для экспресс-диагностики данной инфекции, контроля поствакцинального иммунитета у вакцинированной птицы. Определены технологические характеристики данного диагностикума и приведена его сравнительная характеристика с иностранным аналогом.

Имуноферментный анализ, метапневмовирус, куры

Native ELISA test-system for definition of the specific antibodies to metapneumovirus in hen blood serums is worked out. The efficiency of its use for express diagnostics of this infection and for the control of post-vaccination immunity in vaccinated flock is studied. The technological characteristics of this test-system are defined and its comparison with foreign analogies is presented.

ELISA, metapneumovirus, chickens

Література

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. 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.

3. 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

4. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы с использованием серологических реакций. Ч.1: методические рекомендации / ФГУ "ВНИИЗЖ", 2008. – С. 59-60.