

УДК 619.616**М. А. САПАЧОВА**, аспірант**Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м Київ***ДІАГНОСТИКА ПТАШИНОГО ГРИПУ**

Наведено огляд даних літератури з діагностики пташиного грипу. Встановлено, що до загальних недоліків застосування сучасних методів виявлення вірусу пташиного грипу, в т.ч. ПЛР, відносять тривалість проведення аналізу, значну вартість обладнання, що обґрунтовує розробку економічно вигідних, чутливих експрес – методів діагностики даного захворювання. Обґрунтовано, що перспективним є розробка та впровадження в практику лабораторій ветеринарної медицини України експрес – методу діагностики пташиного грипу, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу.

Ключові слова: вірус пташиного грипу, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, ізотермічний ампліфікація нуклеїнових кислот.

Грип птиці – небезпечне висококонтагіозне захворювання з гострим перебігом, що характеризується явищами септицемії, ураженням органів дихання та травлення, реєструється більш, ніж у 50 країнах світу, та завдає значних економічних збитків [1].

Етіологічний агент, що викликає дане захворювання - РНК-вмісний вірус, що відноситься до роду *Orthomyxoviridae* родини *Influenzavirus*. Згідно класифікації Міжнародного епізоотичного бюро вірус пташиного грипу відноситься до категорії особливо небезпечних хвороб птиці .

Віруси грипу А на основі гемаглютинінового антигену Н розділені на 16 субтипів. Крім антигену Н, у вірусів грипу є один із дев'яти нейрамінідазних антигенів (N).[1-5].

Збудники цього захворювання поділяються на віруси, що викликають високопатогенний (ВПГ) та низькопатогенний пташиний грип (НПГ). На сьогодні до високопатогенних ізолятів грипу відносять ВГП підтипу Н5 та ВГП підтипу Н7 [2, 4].

Вперше хворобу під назвою «ексудативний тиф курей» описав у 1880 р. Перрончіго (Італія). Невдовзі даний збудник був зареєстрований і в багатьох інших країнах: Росії, Грузії, Азербайджані, Казахстані та Україні [1, 3].

Епізоотична ситуація в світі щодо грипу птиці залишається складною. За даними Міжнародного епізоотичного бюро вже на початку 2011 року спалахи високопатогенного грипу птиці (H5N1) зареєстровано в 12 країнах Південно – Східної Азії та Близького Сходу. Україна на сьогоднішній день благополучна щодо високопатогенного грипу птиці, в останнє це захворювання було зафіксоване в 2008 року в АР Крим.

АР Крим відноситься до регіону України, у якому відмічається інтенсивне збільшення кількості перелітних, зимуючих водоплаваючих птахів. Основними

* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук В. О.Постоєнко

біотопами, в яких спостерігається скупчення птахів, є прибережні зони Каркінітської затоки (Різдольненський, Красноперекопський райони), Кримської частини Сиваша (Красноперекопський, Джанкойський, Нижньогорський, Советський, Кіровський райони), Останинські плавні (Ленінський район) [2, 4, 5].

Зважаючи на складну епізоотологічну ситуацію у світі щодо даного захворювання, є ймовірність повторної появи даного захворювання і в Україні.

Архівні дані з ліквідації вищевказаного захворювання свідчать про те, що успіх в боротьбі з високопатогенним штамом вірусу напряму залежить від методів дослідження, які використовуються.

Вивчення збудника пташиного грипу та його діагностика має велике значення, оскільки дане захворювання може завдати великих збитків державі. Високий рівень контагіозності та смертності птиці від згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою якнайшвидшої ідентифікації збудника.

Тому метою роботи є огляд даних літератури з існуючих методів діагностики пташиного грипу. Вчасна та достовірна діагностика вірусних захворювань – реальна перспектива попередити колосальну загрозу, яка може виникнути в разі спалаху гострої інфекції вірусної природи. Тому, саме діагностичний засіб може стати запорукою при вирішенні долі тварин та птиці, підозрілих у захворюванні на вірусну інфекцію, та дозволить зробити вибір запобіжного заходу в разі виникнення складної епізоотичної ситуації.

Діагностика грипу птиці проводиться комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних та патологоанатомічних змін та лабораторних досліджень [1, 3, 4].

Грип птиці необхідно диференціювати від: Ньюкаслської хвороби, респіраторного міксоматозу, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту, а також від ряду бактеріальних інфекцій та отруень [2, 3, 5].

Згідно рекомендацій МЕБ, лабораторна діагностика ВППГ базується на виділенні вірусу з патологічного матеріалу (трахеальних та клоачних змивів від живої птиці або проб органного матеріалу від загиблої птиці) на курячих ембріонах з наступною його ідентифікацією; молекулярно-генетичних методах; визначенні інтравенозного індексу патогенності; серологічні тести – доступні для виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу типу А: імуоферментний аналіз (ІФА), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) [3, 4, 2].

Застосування кожного із наведених серологічних методів має свої переваги та недоліки. Так, ІФА та РДП застосовують для виявлення антитіл до групових антигенів вірусу грипу А. Імуоферментний аналіз широко застосовується в усьому світі для діагностики інфекційних захворювань тварин та птиці. Цей метод є більш чутливим та специфічним. Наразі існує багато модифікацій даного методу, і як правило, для діагностики ВППГ застосовують одну з модифікацій ІФА – DAS-ELISA (double-antibody sandwich type enzyme-linked immunosorbent assay), використовуючи моно- або поліклональні антитіла проти вірусного глікопротеїну, рідше – матричного білку [3, 8].

Недолік РДП – тест специфічний, але з обмеженою чутливістю. Може бути використаний для оцінки епізоотичного статусу поголів'я птиці (курей, індичок). Цей тест не може бути використаний для досліджень сироваток крові водоплавної

та інших видів птахів, оскільки водоплавні птахи не продукують преципітуючі антитіла. РЗГА застосовують для визначення підтипу специфічних антитіл (антитіл до гемаглютиніну).

Керівництво до Кодексу МЄБ передбачає інокуляцію вірусу пташиного грипу з наступним застосуванням позитивних сироваток в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Цією реакцією можна точно ідентифікувати віруси, які мають гемаглютинуючі властивості. Але вищевказана процедура триває кілька тижнів, потребує наявності SPF – ембріонів та низку позитивних антиген – сироваток до різних штамів вірусу грипу А. Даний метод більш чутливий, ніж імуноферментний аналіз, проте більш тривалий.

До загальних недоліків методів, що розглядалися вище, відносять: використання великої кількості патологічного матеріалу, значну тривалість проведення досліджень, відсутність можливості диференціації вірусу від інших близько-споріднених видів.

З розвитком молекулярної біології та генної інженерії був розроблений метод детекції інфекційних захворювань тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Принцип метода ПЛР був розроблений Кері Мюлісом у 1983 році. Перші повідомлення щодо практичного застосування даного методу з'явилися у 1985 році. При багаторазовому повторенні циклів синтезу відбувається експоненційне збільшення числа копій специфічного фрагменту ДНК, що дозволяє з невеликої кількості проаналізованого матеріалу, який містить поодинокі клітини мікроорганізмів, отримати достатню кількість копій ДНК - фрагментів для ідентифікації їх електрофорезом або іншим способом.

Зараз розроблено велику кількість чутливих молекулярних діагностичних тестів для детектування вірусу грипу птахів. Зокрема, це – зворотня транскрипції ПЛР (ЗТ - ПЛР), ПЛР в реальному часі і мультиплекс – ПЛР аналіз. На жаль, більшість з цих методів вимагає використання коштовного обладнання та реактивів і тому не завжди є доступними для лабораторій, що мають ресурсні обмеження.

ПЛР є найперспективнішим методом для діагностики ВППГ при хронічному та персистентному перебігу, ідентифікації ПГ та його диференціації від інших збудників захворювань птахів. За допомогою ПЛР генетичний матеріал вірусу ПГ можна виявити в інфікованій культурі клітин і в матеріалі від хворих та загиблих тварин. Тривалість аналізу 5-6 годин, що характеризує даний метод лабораторної діагностики ВППГ, як найшвидший серед усіх описаних. Важливою перевагою методу ПЛР в порівнянні з іншими є можливість диференціювання ВППГ від інших близькоспоріднених видів, а також ідентифікація окремих його ізолятів за допомогою додаткового проведення рестрикційного аналізу ПЛР-продуктів, або ж за допомогою застосування множинної ПЛР з кількома праймерами одночасно, чи використання гніздових та напівгніздових праймерів. ПЛР широко використовується при виявленні латентних вірусних інфекцій, а також для виявлення інфекційного агента. [7, 11].

Аналіз ефективності методів діагностики ВППГ вказує, що найперспективнішим методом для швидкої і диференційної діагностики пташиного грипу є ПЛР. Застосування даного методу гарантує отримання адекватних результатів за найкоротший проміжок часу, що є важливим при широкому практичному використанні. Крім того, лише за допомогою даного методу можливою є детекція

вірусоносійства ВППГ, що необхідно для контролю за розповсюдженням захворювання.

Але, на жаль, сьогодні лабораторно-діагностична мережа ветеринарної медицини не має в достатній кількості лабораторій, які проводять дослідження молекулярно – генетичним методом. Відсутність достатнього фінансування обмежує впровадження сучасних методів аналізу в українських діагностичних лабораторіях. Ця обставина в свою чергу, спонукає до пошуку інших альтернативних методів, які характеризуються високою швидкістю та економічністю аналізу. Крім цього, враховуючи високу мінливість вірусу грипу птиці і відмінності протікання інфекції в різних регіонах світу, неможливо дати рекомендації на всі випадки. Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес - методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов.

Одним з таких методів є аналіз, який ґрунтується на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот (loop – mediated isothermal amplification, LAMP). Це високочутливий, простий та швидкий метод, який можна використовувати для діагностики вірусних захворювань за допомогою простого та портативного обладнання. Цей метод дозволяє з високою специфічністю та ефективністю проводити ампліфікацію нуклеїнових кислот при постійній температурі і, на відміну від циклічної ампліфікації, не потребує наявності термоциклера (ПЛР – ампліфікатора). [6, 7]

Вперше метод ізотермічної ампліфікації нуклеїнових кислот описали М.Вінсент (M.Vincent; біолабораторії Нової Англії в Беверлі, США) з колегами. В даній методиці використовуються визначені праймери в поєднанні з ферментом полімерази ВST. У запропонованій ними процедурі дволанцюгова ДНК розплітається на одинарні ланцюги ферментом геліказою. Цей білок рухається уздовж молекули ДНК, тимчасово розриваючи зв'язки між ланцюгами. Ампліфікація нуклеїнових кислот відбувається на водяній бані в ізотермічних умовах (60-65°C) протягом від 30 до 60 хв. На відміну від традиційного методу ПЛР аналіз триває не більше однієї години. Облік реакції проводиться візуально, шляхом додавання флуоресцентного реагенту (кальцеїн і MnCl₂) в реакційну суміш для спостереження за зміною кольору при денному світлі або ультрафіолетовому випромінюванні [11-12].

Метод ізотермічної ампліфікації вже знайшов своє застосування для детектування захворювань, як вірусної, так і бактеріальної етіології. У комбінації зі зворотною транскрипцією, LAMP придатний для ампліфікації РНК – матриці (RT – LAMP). Цей підхід був успішно використаний для детектування різних вірусів, таких як вірус Західного Нілу (West Nile virus), вірусної геморагічної септицемії вірусу (viral hemorrhagic septicemia virus), вірус гепатиту Е (hepatitis E virus), респіраторно – синцитіальних вірус (respiratory syncytial virus), а також вірусу хвороби Ньюкасла, окремих підтипів вірусу грипу А, зокрема, підтипів H3, H5 та H9.[6-12].

Подібно звичайній ПЛР, ізотермічна ампліфікація дозволяє збільшувати вміст ДНК в пробі в мільйони разів та дозволяє отримати готовий результат протягом години. Для діагностики вірусу грипу по цій технології не потрібно дорогого обладнання, так як результат аналізу видно неозброєним оком.

Враховуючи вищенаведене, в даний час нами проводяться дослідження, спрямовані на удосконалення та впровадження даного методу, що робить його

можливою альтернативою стандартній ПЛР, особливо в тих випадках, коли застосування циклічного нагрівання та охолодження неможливо або небажано (наприклад, в домашніх або польових умовах в якості діагностичного тесту на певну генну мутацію або інфекцію). Даний метод можна буде використовувати для моніторингу пташиного грипу в усіх областях України, що дасть змогу ефективно контролювати благополуччя і попереджувати занесення збудника до нашої країни.

Висновки: 1. Показано, що висококонтagioзний грип птиці відноситься до небезпечних та розповсюджених у світі захворювань, що обумовлює проведення постійного його моніторингу та своєчасної діагностики.

2. Встановлено, що до загальних недоліків застосування сучасних методів виявлення вірусу пташиного грипу, в т.ч. ПЛР, відносять тривалість проведення аналізу, значну вартість обладнання, що обґрунтовує розробку економічно вигідних, чутливих експрес – методів діагностики даного захворювання.

3. Обґрунтовано, що перспективним є розробка та впровадження в практику лабораторій ветеринарної медицини України експрес – методу діагностики пташиного грипу, який заснований на ізотермічній ампліфікації нуклеїнових кислот вірусу.

1. *Каришева А. Ф.* Спеціальна епізоотологія / підручник. Каришева А. Ф // Вища освіта, 2002. - 703 с.

2. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др; Под ред. А.Н. Головкин. –Х.: «НТМТ», 2007.- 512 с.

3. Методичні рекомендації щодо методів лабораторної діагностики грипу птиці. Дрожже Ж. М, Дедок Л. А. , Марущак Л.В. ДНДІЛДВСЕ, К. - 2012.-30 с.

4. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини. Науково – методичний посібник. Б.Т. Стегний, А.П. Герило-вич//Харків, 2006. – С.18-20.

5. *Сюрин В.Н.*, Инфекционный бронхит птиц / Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н. В. // Вирусные болезни животных. – ВНИТИБП.-1998.– С.183-198.

6. *Erica Spackman*, Development of a Real – Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. // Erica Spackman, Dennis A. Senne, T.J. Myers and all // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol (40.9), P. 3256 – 3260.

7. *Francesca Sidoti*, Development of a Real – Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. / Francesca Sidoti, Francesca Rizzo, Cristina Costa and all // Mol Biotechnol. – 2010. Vol 44:41 – 50, P.41 – 50.

8. *J. Ji*, Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop – mediated isothermal amplification assay. / J. Ji, Q. M. Xie, C. Y. Chen and all // Pultr Science. – 2010. – Vol 89: 477, P. 477 – 483.

9. *Hiromi Yoshida*, Evaluation of the Reverse Transcription Loop – Mediated Isothermal Amplification (RT – LAMP) as a Screening Method for the Detection of Influenza Viruses in the Fecal Materials of Water Birds. / Hiromi Yoshida, Yoshihiro Sakoda, Mayumi Endo and all // J. Vet. Med. Sci.- 2011. – Vol 73(6), P.753 – 758.

10. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / Office International des Epizootic (OIE), 2011 (Рекомендації щодо стандартних діагностичних тестів і вакцин / міжнародне епізоотичне бюро (МЕБ), 2011).

11. *Manmohan Parida, Loop – Mediated Isothermal Amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infection diseases.* / Manmohan Parida, Santhosh Sannarangaiah, Padan Kumar Dash and all // *Rev. Med. Virol.* – 2008. Vol 18, P. 407 – 421

12. *Wai – Yip Lam, Development and Comparison of Molecular Assays for the Rapid Detection of the Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Virus.* /Wai – Yip Lam, Ting – Fan Leung, Nelson Lee and all // *Journal of Medical Virology.* – 2010. –Vol 82: 675, P. 675 - 863.

ДІАГНОСТИКА ПТИЧЬЕГО ГРИППА / М. А. Сапачева

Представлен обзор данных литературы по диагностике птичьего гриппа. Установлено, что к общим недостаткам применения современных методов обнаружения вируса птичьего гриппа, в т.ч. ПЦР, относят длительность проведения анализа, значительную стоимость оборудования, что обосновывает разработку экономически выгодных, чувствительных экспресс - методов диагностики данного заболевания. Обосновано, что перспективным является разработка и внедрение в практику лабораторий ветеринарной медицины Украины экспресс - метода диагностики птичьего гриппа, который основан на изотермической амплификации нуклеиновых кислот вируса.

Ключевые слова: вирус птичьего гриппа, диагностика, полимеразная цепная реакция, изотермический амплификация нуклеиновых кислот.

AVIAN INFLUENZA DIAGNOSTICS / М. А. Sapacheva

The review of the literature on the diagnosis of avian influenza. Found that the general shortcomings of application of modern methods of detection of avian influenza, including PCR, include duration analysis, a significant cost of equipment that justifies the development of cost-effective, sensitive express - methods of diagnosis of this disease. Proved that promising is the development and implementation in practice of veterinary medicine laboratories Ukraine Express - method of diagnosis of avian influenza, which is based on isothermal amplification of nucleic acids of the virus.

Keywords: virus avian influenza, diagnostics, PCR, isothermal amplification of nucleic acids.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **М. В. Бабкін.**