

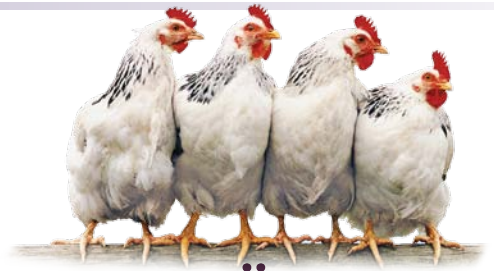


УДК 636.5:619:616.988:616-07

Л.І. НАЛИВАЙКО, докт. вет. наук
С.В. РЯБІНІН, мол. наук. співр.
Д.А. РЯБЕКА, аспірант

Інститут птахівництва НААН України, с. Бірки Харківської обл.

РНГА-ДІАГНОСТИКА МЕТАПНЕВМОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ



Висвітлено результати впровадження в практику еритроцитарного діагностикому для реакції непрямой гемаглютинації (РНГА). Дані епізоотологічного моніторингу та міжлабораторної комісійної перевірки свідчать, що розроблений еритроцитарний антиген до ринотрахеїту на основі РНГА є чутливим та специфічним і може бути використаний для контролю поширення метапневмовірусної інфекції та напруженості імунітету у птиці, щепленої проти цього захворювання.

Імпорт високопродуктивних кросів птиці в Україну сприяє поширенню на птахофабриках невідомих раніше вірусних хвороб, зокрема метапневмовірусної інфекції. Загибель птиці може сягати 30% і більше залежно від наявності вторинної бактеріальної інфекції [3].

Метапневмовірусна інфекція – це контагіозне захворювання, яке характеризується запаленням верхніх дихальних шляхів та інфраорбітальних синусів, назальними виділеннями, чханням,



важким диханням, хрипами. В індиків хворобу описують під назвою ринотрахеїт (*turkey rhinotracheitis*, TRT), у курей і курчат-бройлерів – синдром пухлої голови (*swollen head syndrome*). Останнім часом хвороба верхніх дихальних шляхів курей та індиків частіше представлена у літературі під загальною назвою пневмовірус птиці (*avian pneumovirus*) або метапневмовірус птиці (*avian metapneumovirus*) [2].

Вірусну етіологію ринотрахеїту в Україні було встановлено на індиках у 2008–2009 рр. у птахогосподарствах Донецької, Чернівецької та Харківської областей. Під час клінічного огляду індичат кросу «Біг-6» віком 30, 42, 70 днів було виявлено клінічно хвору птицю, в якій спостерігали пригнічення, сонливість, набряк голови, міжщелепного простору й підочних синусів, тяжке дихання і витікання слизу із дзьоба, кількість загиблих – 5–14%. Від клінічно хворої птиці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції було ідентифіковано та у результаті вірусологічних досліджень ізольовано збудника хвороби, який належить до роду *Metapneumovirus*, підтипу APV/B [5].

Щоб контролювати напруженість імунітету в щепленої проти TRT птиці, окремі лабораторії ветеринарної медицини використовують зареєстрований

в Україні діагностичний набір для імуноферментного аналізу (ІФА) виробництва BioChek (Нідерланди), вартість якого становить 8 тис. грн. Тому виникла необхідність розроблення вітчизняного діагностикому, який був би специфічним, чутливим, значно дешевшим. Такою тест-системою є реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), яку широко використовують у вірусологічних дослідженнях поряд з іншими діагностичними препаратами. Головна її перевага – висока чутливість, технічна простота реакції і стабільність компонентів. У Росії, Республіці Білорусь, Таджикистані для діагностики інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби, крім методу ІФА, застосовують еритроцитарний діагностиком для РНГА [1, 4, 7].

Мета дослідження – розробити тест-систему для реакції непрямой гемаглютинації, заснованої на здатності сенсibiliзованих TRT-антигеном еритроцитів виявляти специфічні антитіла в сироватці крові хворої на ринотрахеїт птиці або визначати напруженість імунітету у птиці, щепленої проти TRT-інфекції.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Поширення ринотрахеїту вивчали в індиків кросу «Біг-6» віком 7–170 днів, породи біла широкогруда віком 60–70 днів; курчат-бройлерів кросу «Хабборт» віком 20–60 днів та курей-несучок кросів «Ломанн-Класик», «Тетра СЛ», «Хайсек білий» віком 180 днів і більше у птахогосподарствах Харківської, Донецької, Луганської та Чернівецької областей.

Еритроцитарний діагностиком для визначення антитіл до збудника метапневмовірусної інфекції та TRT у РНГА,



розроблений в Інституті птахівництва НААН України, містить формалізовані та сенсibilізовані еритроцити барана, гіперімунну сироватку крові з титром не нижче 1:32 і нормальну сироватку крові курей.

Процес отримання еритроцитарного антигену передбачав виготовлення формалізованих еритроцитів, обробку їх таніном і сенсibilізацію танізованих еритроцитів. Формалізовані й танізовані еритроцити готували за загальноприйнятою методикою [1].

Антигеном для сенсibilізації еритроцитів була екстраембріональна вірус-утримувальна рідина з інфекційним титром вірусу $10^{-2.9}$ ЛД₅₀/см³, яку одержували шляхом інфікування 10-денних СПФ-ембріонів курей або інтактних 12-денних ембріонів індиків [6].

Експериментально підбирали оптимальні умови для сенсibilізації еритроцитів з використанням фосфатно-буферних фізіологічних розчинів (ФБР), рН 6,4 та 7,2. До формалізованих і танізованих еритроцитів барана з концентрацією 10% додавали вірусний TRT-антиген з інфекційним титром $10^{-2.9}$ ЛД₅₀/см³, розведений 1:10 ФБР, рН 7,2. Сенсibilізовані еритроцити інкубували за температури 38°C протягом 40 хв, після чого тричі відмивали ФБР, рН 7,2. Відмиті еритроцити суспендували у 0,5% гліцеринізованому ФБР, рН 6,4. Отримані сенсibilізовані еритроцити консервували з додаванням 1% формаліну від загального об'єму.

Для отримання позитивної (гіперімунної) сироватки крові проводили гіперімунізацію 30-денних курчат за розробленою нами схемою. Інактивованій за 60 °C TRT-вірус з інфекційним титром $10^{-2.9}$ ЛД₅₀/см³ об'єднували з ад'ювантом Монтанід ISA-70 у співвідношенні 30:70 і вводили внутрішньом'язово курчатам в об'ємі 1 см³. Ін'єкції повторювали протягом 2 міс. Після останньої ін'єкції антигену відбирали кров для контрольної перевірки на наявність специфічних до вірусу TRT антитіл у ІФА (тест-система BioChes, Нідерланди). При визначенні антитіл у титрах не нижче 1650 курчат знекровлювали.

Нормальну сироватку одержували з крові інтактних курчат віком 90 днів методом тотального знекровлення. Обидві сироватки крові зберігали у замороженому (за температури -20°C) або ліофілізованому стані. Досліджували на стерильність, активність та специфічність. Перевірку контрольних сироваток крові на стерильність проводили згідно з ДСТУ 4483:2005 і ДСТУ 4613:2006. Активність і специфічність виготовленого еритроцитарного антигену визначали в РНГА та ІФА шляхом використання гіперімунної сироватки крові курей і специфічної – позитивної сироватки крові, отриманої від хворих на TRT індиків або курей; негативної (нормальної сироватки крові), отриманої від неімунної та здорової птиці й стандартних колібактеріозних і мікоплазмозних сироваток крові в РНГА та позитивних сироваток до вірусів ІБХ, НХ, ІБК з наборів Cinco (ВНИИЗЖ, Росія).

За допомогою ІФА та РНГА визначали титр специфічних антитіл у гіперімунній сироватці крові. Нормальна сироватка крові не повинна містити специфічних до TRT антитіл.

При проведенні РНГА контролем слугували: гіперімунна (позитивна) сироватка крові курей і сенсibilізовані еритроцити; нормальна сироватка крові курей і сенсibilізовані еритроцити.

Результат вираховували за чотирибальною системою згідно з формою осаду еритроцитів через 30 та 60 хв. За титр сироватки приймали останнє її розведення, в якому була позитивна реакція в один плюс, тобто відбувалася аглютинація еритроцитів у вигляді «гудзика», що вкривала 1/3 дна лунки. Діагностичним титром вважали найменше розведення сироватки – $3,0 \log_2$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У 7 птахогосподарствах західних і східних областей України досліджено 500 проб сироваток крові від індиків віком 4, 14, 30, 43, 56, 70, 110 днів; 200 проб – від курей віком 180, 340, 450 днів; 100 проб – від курчат-бройлерів віком 7, 9, 20, 30, 45 днів.

У ході серологічних досліджень на TRT-інфекцію позитивну реакцію у індиків було виявлено: за ІФА у 75%, за РНГА у 65%, а також у 69%





Таблиця 1 – Імуномоніторинг TRT-інфекції серед різних видів птиці у птахогосподарствах

Птиця	Кількість проб	Вік, доби	Титри антитіл	
			РНГА, log ₂	ІФА
Індики	500	4, 14, 30, 43, 56, 70, 110	3–7 (65%)	993–2731 (75%)
Кури	200	180, 349, 450	3–8 (69%)	–
Курчата-бройлери	100	7, 9, 20, 30, 45	3–5 (53,5%)	–

Таблиця 2 – Активність та специфічність еритроцитарного TRT-антигену в РНГА

Матеріал	Розведення досліджуваних сироваток							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Гіперімунна сироватка курчат	+	+	+	+	+	+	+	0
Нормальна сироватка курчат	0	0	0	0	0	0	0	0
Польові сироватки крові індиків	1	+	+	+	+	0	–	–
	2	+	+	+	+	+	0	–
	3	+	+	+	+	±	0	–
	4	+	+	+	±	0	–	–
	5	+	+	+	+	+	±	0
	6	+	+	+	+	+	+	0
	7	+	+	+	+	+	±	0
	8	+	+	+	+	+	0	–
	9	+	+	+	+	+	0	–
	10	+	+	+	+	+	+	0
Ешерихіозна сироватка серогрупи O78	0	0	0	0	0	0	0	–
Мікоплазмозна сироватка (<i>M. gallisepticum</i>)	0	0	0	0	0	0	0	–
Позитивні сироватки до вірусів:								
хвороби Гамборо	0	0	0	0	0	0	0	–
нюкаслської хвороби	0	0	0	0	0	0	0	–
інфекційного бронхіту курей	0	0	0	0	0	0	0	–

Примітка. +, ± – позитивні реакції; 0 – негативна реакція.

курей і 53% курчат-бройлерів за РНГА (табл. 1).

Під час гіперімунізації курчат інактивованим TRT-антигеном були отримані позитивні сироватки крові з титрами антитіл 3825–12 959 за ІФА та 1:64–1:512 за РНГА. Еритроцитарний діагностикум на основі РНГА при TRT-інфекції пройшов міжлабораторну комісійну перевірку на активність та специфічність. Результати досліджень наведено в табл. 2.

Таким чином, результати епізоотологічного моніторингу й міжлабораторної комісійної перевірки еритроцитарного діагностикуму свідчать про те, що розроблений еритроцитарний TRT-антиген на основі РНГА є чутливим та специфічним і може бути використаний для контролю поширення мета-

пневмовірусної інфекції та напруженості імунітету у птиці, щепленої проти цього захворювання.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. – М.: Медицина, 1982. – С. 129–140.
2. 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.
3. Каспарьянц С.А. Ринотрахеит птицы / С.А. Каспарьянц, А.Т. Столляр // Ветеринария. – 2011. – № 1. – С. 18–21.
4. Курбонбекова З.Д. Эпизоотическая ситуация по респираторно-кишечным болезням молодняка крупного и мелкого рогатого

скота в центральных районах Таджикистана. – Автореф. дис. ...канд. вет. наук. – М., 2007. – 22 с.

5. Наливайко Л.І. Епізоотологічне обстеження птахівничих господарств України щодо метапневмовірусної інфекції / Л.І.Наливайко, Ю.Ю. Ніколаєнко, А.Л. Бондаренко, Д.А. Рябека // Вет. мед. України. – № 1. – 2011. – С. 9–11.
6. Сюрин В.Н. Культивирование вирусов в куриных эмбрионах / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина // Вет. вирусология. – М.: Колос, 1984. – С. 107–111.
7. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума на основе вируса диареи крупного рогатого скота / П.А. Красочко, Н.А. Ковалев, И.А. Красочко, С.А. Жидков, В.И. Корольков. – Патент Российской Федерации № 1835659. – М., 1991. – 5 с.

Одержано 10.10.2011

РНГА-диагностика метапневмовірусної інфекції птиці. Л.І. Наливайко, С.В. Рябинин, Д.А. Рябека

С целью усовершенствования методов контроля эпизоотической ситуации в хозяйствах в отношении метапневмовірусной инфекции в Институте птицеводства НААН Украины разработан эритроцитарный диагностикум для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Результаты эпизоотологического мониторинга и межлабораторной комиссионной проверки показали, что эритроцитарный РНГА-диагностикум является чувствительным, специфичным и может использоваться для контроля распространения ринотрахеита и напряженности иммунитета у привитой птицы.

RNGA-diagnostics of the metapneumoviral infection in birds. L.I. Nalyvaiko, S.V. Riabinin, D.M. Riabeka

With the aim of determination of the epizootic situation in economies concerning the metapneumoviral infection in the Poultry Research Institute it was worked out the erythrocyte diagnosticum in the reaction of the not direct hemagglutination (RNGA). Results of the epizootic monitoring and between laboratory commission controls of the erythrocyte diagnosticum showed that erythrocyte TRT-antigen on the base of RNGA is sensitive and specific and can be used for the control of spreading TRT-infection and immunity tension in vaccinated birds. ◉