

УДК: 619:616-07:576.85

ДИАГНОСТИКА МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦЫ

О. В. ИВЛЕВА

Луганский национальный аграрный университет,
г. Харьков, Украина, 61000

(Поступила в редакцию 04.04.2019)

Развитие птицеводства на промышленной основе требует совершенствования методов диагностики заболеваний. Большая концентрация поголовья на ограниченной территории способствует быстрому распространению ранее неизвестных болезней, которые наносят значительный экономический ущерб. Необходимость разработки и внедрения в практику новых знаний о диагностике малоизученных болезней птицы вызвана также и изменениями эпизоотологии, клинического течения и активизацией тех из них, которые в прошлом не вызывали серьезного экономического ущерба.

В последнее время все больше исследователей отмечает распространение новой инфекционной болезни индеек, цыплят-бройлеров и кур-несушек, которая характеризуется поражением верхних дыхательных путей и «синдромом пухлой головы». Установлено, что этиологическим фактором этой болезни является метапневмовирус [1].

Первичная вирусная инфекция часто осложняется вторичной бактериальной и вирусной инфекцией со сложной симптоматикой. А течение инфекционных болезней в субклинической, латентной и ассоциированной формах, затрудняет их диагностику и профилактику. Особого внимания заслуживают инфекционные болезни, связанные с поражением респираторного тракта, при которых с помощью воздушно-капельной передачи происходит быстрое распространение инфекции на большое поголовье птицы, независимо от системы содержания.

Из новых для нашей страны болезней к этой группе следует отнести метапневмовирусную инфекцию (МПВИ) птицы, которая приводит к значительным экономическим потерям в птицеводческих хозяйствах через общее ослабление организма, что может спровоцировать поражение респираторного тракта, и привести к снижению мясной и яичной продуктивности взрослого поголовья. Также этот вирус может быть вовлечен в мультифакторную болезнь, как, например, «синдром опухшей головы», что очень затрудняет ее диагностику [2].

В хозяйствах Украины зарегистрировано течение метапневмовирусной инфекции на фоне вирусно-бактериозов птицы. Количество положительно реагирующих на заболевание достигало 100 %. Для диагностики инфекции у индеек и кур в Луганском НАУ разработан метод ИФА.

Ключевые слова: мониторинг, инфекция, вторичная микрофлора, индейки, куры, ИФА.

The development of industrial poultry farming requires the improvement of methods for diagnosing diseases. A large concentration of poultry in a limited area contributes to the rapid spread of previously unknown diseases that cause significant economic damage. The need to develop and put into practice new knowledge about the diagnosis of poorly studied poultry diseases is also caused by changes in the epidemiology, clinical course and activation of those that did not cause serious economic damage in the past.

Recently, more and more researchers have noted the spread of a new infectious disease of turkeys, broiler chickens and laying hens, which is characterized by lesions of the upper respiratory tract and "swollen head syndrome". It has been established that the etiological factor of this disease is metapneumovirus.

Primary viral infection is often complicated by a secondary bacterial and viral infection with complex symptoms. And the course of infectious diseases in the subclinical, latent and associated forms makes it difficult to diagnose and prevent them. Of particular note are infectious diseases associated with lesions of the respiratory tract, in which airborne transmission leads to the rapid spread of infection to a large number of poultry, regardless of the housing system.

Of the new diseases for our country, this group should include the metapneumovirus infection (MPVI) of the bird, which leads to significant economic losses in poultry farms through a general weakening of the body, which can trigger respiratory tract damage and lead to a decrease in the meat and egg productivity of the adult poultry. Also, this virus may be involved in a multifactorial disease, such as, for example, «swollen head syndrome», which makes it very difficult to diagnose.

In the farms of Ukraine, a course of metapneumovirus infection is registered against the background of poultry bacteriosis. The number of positive reactions to the disease reached 100%. For the diagnosis of infection in turkeys and chickens, Lugansk NAU developed an enzyme immunoassay method.

Key words: monitoring, infection, secondary microflora, turkeys, chickens.

Введение

Впервые новое респираторное заболевание, которое сопровождалось респираторными симптомами и отеком в области головы – «синдром пухлой головы» («swollen head syndrome» – «SHS») у кур-несушек и индеек в возрасте 3–4 недель, было зарегистрировано в 1978 году в Южной Африке. В 1985 году – в Англии, а затем и в других странах мира [3].

Значительной экономической проблемой для фермеров, которые занимались разведением индеек, явилась МПВИ в штате Миннесота за период 1997–2002 годы [4].

В Украине это заболевание впервые было зарегистрировано в 2008 году в филиале «Рассвет» А/Ф «Шахтер» Донецкой области на индейках кросса «Биг-6», которых суточным молодняком завезли из Германии (фирма «Карцфейн»). Почти одновременно (2009–2011 гг.) аналогичные

симптомы болезни наблюдали на птице этого же кросса в возрасте 43 суток, завезенных из той же фирмы в Черновицкую область Украины. В обоих случаях течение болезни происходило на фоне вторичной бактериальной инфекции – колибактериоза. За 5 месяцев выращивания индюшат хозяйство ООО «Украинская продовольственная группа» понесло убытки в размере 405 тыс. грн. [5].

Результаты эпизоотологического обследования птицы возрастом от 310 до 500 дней в ОАО «Лисичанская п / ф» свидетельствовали о снижении яичной продуктивности на 20 % и появление яиц с тонкой скорлупой у кур-несушек с положительными антителами к МПВ на уровне 1: 1888 (ИФА фирмы «BioChek », Нидерланды) [6, 7].

Тяжесть болезни и ее распространение зачастую зависели от нарушений ветеринарно-санитарных правил, ослабление резистентности организма птицы.

В последнее время МПВ-инфекция все больше распространяется среди птицы, особенно индеек, частных хозяйств Украины, где не проводятся диагностические исследования.

В настоящее время на вооружении научно-исследовательских и производственных ветеринарных лабораторий в Украине отсутствуют стандартные отечественные диагностические наборы для экспресс-диагностики МПВИ птицы, а зарубежные аналоги не доступны для широкого круга ветеринарных лабораторий. Поэтому, перед нами стала задача разработать отечественный метод ИФА, который по своим характеристикам не уступали бы импортным тест-системам. Таким образом, целью наших исследований было изучить распространение метапневмовирусной инфекции в птицеводческих хозяйствах разных форм собственности в Харьковской области и усовершенствовать диагностику данного заболевания.

За последние три года в приусадебных хозяйствах восточных регионов Украины проводили обследования приусадебных хозяйств по инфекционным заболеваниям среди индюков кросса «Биг-6», «Бют-8» (1–480 дн.), кур-несушек (250 дн) и гусей местных пород (170 дн.) с использованием эпизоотологических, вирусологических и серологических методов исследований, которые проводили на базе Государственной исследовательской станции птицеводства Национальной академии аграрных наук (ГИСП НААН – в прошлом – Институт птицеводства) в отделе обеспечения качества кормов и ветеринарного благополучия и Национальном научном центре «Института экспериментальной и клинической ветеринарии (НИЦ «ИЭКВМ»). Для серологических исследований использовали ELISA тест («IDEXX», США) и РНГА (эритроцитарный диагностикум, разработанный в Институте птицеводства НААН).

Вирусологические и бактериологические исследования проводили по общепринятым методикам [8]. Для бактериологических исследований использовали типоспецифические колибактериозные и сальмонеллезные сыворотки, глюкозу, сыворотку лошадей; питательные среды МПБ, МПА, Эндо, Висмут-Сульфитный агар. Для вирусологических исследований – куриные 9–10-суточные, перепелиные 6-суточные и гусиные 12-суточные коммерческие эмбрионы, свободные от патогенной микрофлоры и специфических антител к метапневмо- и реовирусу, изоляты вирусов, первичную культуру клеток куриных и гусиных эмбрионов (КК ФЭК, ФЕГ). Патологический материал, отобранный от клинически больной или погибшей птицы, хранили при минус 20 °С. С целью накопления вируса использовали фибробласты 10-суточных куриных, 6-суточных перепелиных эмбрионов, свободных от специфических антител к метапневмовирусу, и лиофилизированный штамм РVT–09/В метапневмовируса индеек. Для ИФА-метода наработанный антиген инактивировали этиленимином производства института физической химии (г. Москва), очищали и концентрировали по схеме: первичная очистка вируса (при 1000-2000 г в течение 20 мин), концентрирование (с ПЭГ-6000 в концентрации 7 % и центрифугированием в течение 30 мин. при 12000 g.) и завершающая очистка (при 70000–76000 g при + 4 °С через 20 % раствор сахарозы в течение 2 час.). Степень очистки контролировали с помощью электронной микроскопии методом негативного контрастирования [9].

Гипериммунизацию птицы осуществляли путем трехкратного введения полученного метапневмовирусного антигена (МАГ) по схеме: двукратное его введение в объеме 0,5 см³ с интервалом в 14 дней; третья иммунизация – антиген смешивали с адьювантом «Монтанид» ISA-70 в соотношении 1: 3 и после второй иммунизации (через 14 дней) вводили внутримышечно в объеме 1,5 см³. Нормальную сыворотку получали от интактных цыплят в возрасте 90 дн. методом тотального обескровливания [10].

Во время исследований использовали 0,05 М Трис – HCl з 0,2 М NaCl pH 7,4 – 7,6; 0,01 М карбонатно – бикарбонатный буфер pH 9,5–9,6 для сенсibilизации антигена на планшет; опытные, контрольные сыворотки и антиген, 0,1 % твин-20 с 10 % сывороткой крови лошади;

отмывку сорбента от компонентов, которые не связались, проводили раствором 0,05 М трис – HCl с 0,2 М NaCl и 0,1 % твин 20, pH 7,4–7,6; в качестве субстрата использовали: 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) с перекисью водорода; для остановки реакции – 1 % раствор додецилсульфата натрия (ДСН). Использовали коммерческий конъюгат фирмы «IDEXX» (США).

Сенсибилизацию планшетов, внесение исследуемых сывороток на планшет, определение рабочих разведений антигена проводили по методике, разработанной в ГИСП НААН (2012) [10].

Диагностическую ценность испытуемого ИФА устанавливали в сравнении с ИФА-методом фирмы «IDEXX» (США). Комиссионную и производственную проверку диагностикума проводили в отделе обеспечения качества кормов и ветеринарного благополучия и на «Экспериментальной ферме сохранения государственного генофонда птицы» ГИСП НААН, где было привито 5315 голов цыплят в возрасте 7 дней и 574 головы индюшат в возрасте 10 дней живой сухой вакциной против МПВИ птиц, пневмовирусного ринотрахеита индеек, «синдрома опухшей головы» кур (МПВИ), производства ХИПРАВИАР SHS (Испания), зарегистрированной в Украине (№ ВА-00559-02-13 от 18.12.2017 г.).

Основная часть

Эпизоотологический мониторинг вирусных и бактериальных заболеваний проводили в течение 2016–2018 гг. в частных птицеводческих хозяйствах различных регионов Харьковской области, где птицу против вирусных инфекций не прививали.

В 2017 серологическими исследованиями от индюков и кур было выявлено 90–100 % положительно реагирующих на МПВИ с титрами антител соответственно 2843 – 21580 и 1380 – 7350 (ИФА), на реовирусную инфекцию (АРВИ) – 1278–7430 и микоплазмоз (60–80 %) – 1757–21769. С помощью эритроцитарного диагностикума в РНГА были выявлены положительные титры антител к МПВ и АРВ как у индюков, так и гусей, которые колебались от 1: 8 (3 log) до 1: 128 (7 log) (табл.1).

Таблица 1. Серологические исследования

№ п/п	№ хоз-в	Вид птицы	К-во проб	Возраст птицы	Титры антител			
					ИФА		РНГА	
					МПВИ (IDEXX)	АРВИ (ИП НААН)	МПВИ	АРВИ
1	1	индейки	50	170	2843 – 21580	–	1:8 (3 log) – 1:128 (7log) 5,75+ 0,59	1:16 (3log) – 1:64 (7log) 4,1+0,68
2		гуси	50	170–180	–	–	1:16 (3 log) – 1:64 (7log) 4,1+0,68	1:8 (3 log) – 1:128(7 log) 5,75+ 0,59
3		гуси	50	210	–	–	1:16 – 1:128 5,1+0,74	1:8 – 1:64 5,05+ 0,79
4	2	куры	30	250	483–7235	1278–7430	–	–
5	3	индейки	30	480	1380 – 7350	–	–	–

Таким образом, согласно результатам серологических исследований, выявлены титры антител были подобные как при использовании РНГА, так и ИФА-метода, а полученные показатели свидетельствовали циркуляции полевого метапневмовируса в хозяйствах среди индеек и гусей.

При клиническом осмотре птицы выявляли особей с синуситами, конъюнктивитами, кашлем, хрипами. Количество погибших индеек колебалось от 1,7 % до 8 %. Среди кур и гусей погибших не наблюдали, но были обнаружены особи с хромотой и отставшие в развитии.

В течение двух лет в этом же хозяйстве наблюдали гибель индюшат (2 %) и гусят 5-суточного возраста (1,8 %), полученных от родителей положительно реагирующих на МПВ- и АРВ-инфекции, патологоанатомические изменения которых характеризовались слабым скелетом, пневмонией, энтеритами, точечными или полосчатыми кровоизлияниями на мышцах груди или голени или бедра, подкожной воспалительной инфильтрацией.

Бактериологическими исследованиями от больной птицы изолировали патогенные серотипы *E.coli* (O115, O78, O126), стафилококки, стрептококки, которые были низко чувствительны к испытуемым антибиотикам (13–16 мм), *Pseudomonas aeruginosa* – (18–20 мм).

При изоляции МПВ нарушения 80-90% монослоя ФЭК наблюдали на 4–5 сутки после заражения. Инфекционный титр вируса на КК ФЭК составил 2,8 lg ТЦД₅₀/см³. Вирусу, изолированному от цыплят, присвоено название шт.РVCh-16.

Изоляцию реовируса от индюшат и гусят осуществляли на 9-суточных эмбрионах кур и 12-суточных эмбрионах гусей, проведением 3 слепых пассажей. При вскрытии инфицированных эмбрионов были обнаружены патогномичные для реовируса изменения (увеличение и

кровенеполнение печени с желтым цветом ее правой доли, точечные кровоизлияния на мышцах груди) (рис.1).



Рис. 1. Точечные кровоизлияния на мышцах груди гусяного эмбриона

Для идентификации изолированных вирусов были использованы положительные сыворотки к МПВ и АРВ, входящих в состав наборов ИФА («Bio-Chek», Нидерланды, «IDEX», США и «ИП НААН»). Установлено, что изолированные вирусы являются возбудителями МПВИ и АРВИ.

Ассоциированное течение вирусных (АРВИ и МПВИ) и бактериальных (*E.coli*, стафилококк, стрептококк, синегнойная палочка) инфекций и патогномичность их признаков затрудняет диагностику из-за отсутствия тест-систем, которые были бы доступны для лабораторий ветеринарной медицины, что привело к необходимости разработать отечественный ИФА-метод для контроля МПВ-инфекции.

Основными этапами разработки было: изготовление специфических (антиген, контрольные сыворотки крови) и подбор неспецифических (буферные растворы, субстрат, конъюгат) компонентов и определение оптимальных условий проведения реакции.

Для изготовления МПВ-антигена в качестве сенситина использовали производственный штамм PVT-09 / В метапневмовируса, который хранили в лиофилизированном состоянии при температуре плюс 8 °С. Для инактивации штамма PVT-09 / В использовали 0,1 % концентрацию этиленimina при температуре 37,5 (0,5) °С в течение 24 часов. Штамм антигенно активный, и после 3-кратной иммунизации очищенным, концентрированным и инактивированным пневмовирусным антигеном с инфекционным титром $4,33 \pm 0,5 \lg \text{LD}_{50}/\text{см}^3$ в сыворотке крови цыплят были обнаружены специфические АТ в титрах 1: 3200, индюшат - 1: 6400 (ИФА, IDEXX). Антигенные свойства штаммов PVCh-16 и PVT-09/В метапневмовируса изучали на цыплятах в возрасте 30 суток. За индукцией специфических антител наблюдали каждые 14 дн. при 3-кратной их иммунизации (рис. 2).

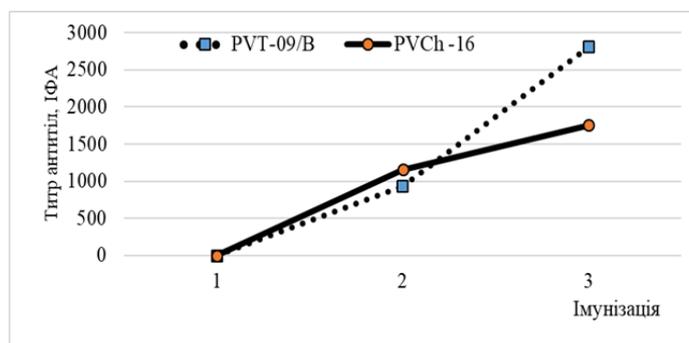


Рис. 2. Индукция специфических антител при иммунизации цыплят штаммами PVCh-16 и PVT- 09 / В метапневмовируса

При разработке отечественной тест-системы нами было подготовлено лабораторную панель диагностических сывороток с различными титрами антител к МПВ. Специфичность очищенного и концентрированного антигена (АГ) МПВ проверяли в непрямом варианте ИФА с использованием различных положительных референтных сывороток крови кур (табл. 2).

Таблица 2. Определение метапневмовирусного антигена на специфичность

№ з/п	Гипериммунная сыворотка к возбудителям	Титры антител (ИФА)
1	реовирусная инфекция кур	<1:100
2	инфекционный бронхит кур	1:100
3	инфекционная бурсальная болезнь	<1:100
4	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1:100
5	метапневмовирусная инфекция птицы	1:6400
6	синдром снижения яйценоскости-76	<1:100

7	нюкаслская болезнь	<1:100
---	--------------------	--------

Согласно полученным результатам, положительные титры антител (1: 6400) были получены только в МПВ. С другими гипериммунными сыворотками реакция была отрицательной (<1 100, 1: 100). При изучении рабочей концентрации антигена исследовали эффективность реакции контрольной референтной сыворотки в разведении 1:400 с разными концентрациями иммобилизованного антигена, который вносили в каждую лунку по 100 мкл. При этом распределение средних оптических показателей (ОП) реакции относительно исследуемых разведений антигена постепенно изменялся (рис. 3).

Диагностический титр в ИФА устанавливали методом последовательных разведений различных сывороток, начиная с разведения 1: 100 до 1: 12800 при стандартной концентрации (0,025 мкл лунку) сорбированного антигена. Коэффициент корреляции составил для разведенных 1: 100 – 75,60 %; 1: 200 – 83,90 %; 1: 400 – 92,14 %; 1: 800 – 82,89 %.

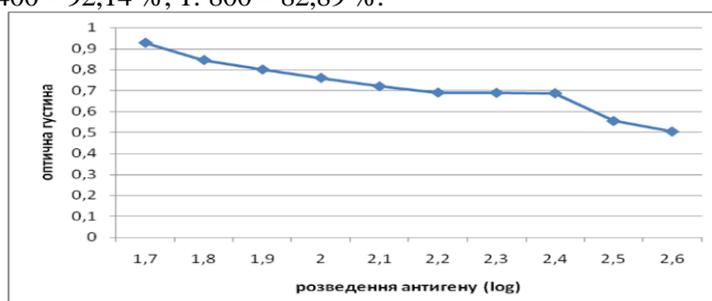


Рис. 3. Распределение средних (ОП) положительной контрольной сыворотки в разведении 1:400 относительно разведениям (log x) иммобилизованного антигена

Разведение сыворотки 1: 400 имело высокий коэффициент корреляции, и было взято за рабочее. В соответствии со значениями ОП исследуемых сывороток с помощью компьютерной программы Statistica (Correlation matrices) была построена калибровочная кривая и выведено уравнение линейной регрессии для расчета логарифмического значение титров исследовательских сывороток $\lg T = 3,8071 + 0,8420 \lg (S/P 400)$.

Учет результатов реакции проводили спектрофотометрично при длине волны 405 нм против 450 нм. Определен ПНП – отрицательные сыворотки с титром от 0–950, от 950 и более – положительные.

Чувствительность и специфичность разработанной тест-системы к коммерческому набору IDEXX (США) составила 100 % и 97,4 % соответственно. Воспроизводимость, которую определяли по проценту разбежности среднего значения ОП образцов одной сыворотки в 15 повторах, составила 3,26 % для положительной сыворотки. Гипериммунные сыворотки в ИБК, ИББ, РЕО, НХ, ССЯ не имели титров при тестировании. На основании проведенных исследований разработана нормативная документация –ТУ У 24.4-00497169-001-2018 по приготовлению и контролю «Тест-системы для выявления антител к метапневмовирусной инфекции в сыворотках крови кур и индеек иммуноферментным методом».

Заключение

Разработанный нами ИФА метод является количественным, простым в использовании, проводится в одном разведении сыворотки. По сравнению с зарубежным аналогом («IDEXX») набор компонентов отечественной ИФА-тест-системы дешевле в 3 раза, и может быть доступным для специализированных лабораторий ветеринарной медицины. На основании полученных результатов отечественный ИФА-метод является конкурентоспособным и импортозамещающим.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова, И. А. Метапневмовирусная инфекция птиц / И. А. Борисова, А. В. Борисов // РацВетИнформ. – 2009. – № 12. – С. 9 – 11.
2. Дмитриев, Д. В. Непрямой метод иммуноферментного анализа в диагностике метапневмовирусной инфекции птиц: дис. ... канд. вет. наук: 06. 02. 02/ Д. В. Дмитриев. – СПб., 2010. – 126 с.
3. Каспарьянц, С. А. Ринотрахеит птицы / С. А. Каспарьянц, А. Т Столяр // Ветеринария. – 2009. – № 9. – С. 18–21.
4. Борисова, О. А. Метапневмовирусная инфекция птиц / О. А. Борисова, И. А. Борисова // ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2007. – С. 14 – 61.
5. Наливайко, Л. І. Епізоотологічне обстеження птахівничих господарств України щодо метапневмовирусної інфекції / Л. І. Наливайко, Ю. Ю. Ніколаєнко, А. Л. Бондаренко, Д. А. Рябека // Ветеринарна медицина України. – 2011. – № 1. – С. 9– 11.
6. Пархоменко, Л. І. Серологічний моніторинг птиці щодо метапневмовирусної інфекції / Л. І. Пархоменко, Р. А. Дубін // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького: зб. наук. праць / редк. склад В. В. Сتيبель. – Львів, 2011. – С. 349–353.
7. Дубін, Р. А. Виявлення збудника метапневмовирусної інфекції у декоративної птиці. / Р. А. Дубін // Промислове і декоративне птахівництво: проблеми та перспективи: матеріали міжнародної науково-практичної конференції,

Кам'янець-Подільський, 12–13 жовтня 2011 р. / Подільський державний аграрнотехнічний університет ; редкол.: М. І. Бахмат [та інш.]. – Кам'янець-Подільський, 2011. – С. 19–21

8. Головко, А. Н. Способы и методы культивирования вирусов / А. Н. Головко // Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине : справочное пособие / А. Н. Головко – Харьков, 2007. – С. 173– 192.

9. Рябінін, С. В. Очищення та концентрування антигену реовірусної інфекції птиці для конструювання діагностичного ІФА / С. В. Рябінін // Проблеми зооінженерії та вет. медицини. – 2011.– № 23.– С. 203–205.

10. Рябінін, С. В. Тест-система для определения антител к возбудителю реовирусной инфекции кур / С. В. Рябінін // Вестник ветеринарии. – 2013.– № 66.– С. 11–14.