

М.М. Сайдарова, М. Амирбеков, Г.К. Юров, С.В. Алексеенкова, К.П. Юров
(НПП «Биологические препараты» (Таджикистан), Служба государственного ветеринарного надзора Министерства сельского хозяйства Республики Таджикистан, ГНУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко (ВИЭВ)» РАСХН)

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ H5N1 МЕТОДАМИ ИФА И РТГА У КУР В ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

Введение

Грипп птиц - острая высококонтагиозная вирусная болезнь птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, поражением органов дыхания и пищеварения. Различные штаммы вируса гриппа птиц вызывают заболевание с чрезвычайно разнообразной симптоматикой. Тяжесть болезни зависит от вида, возраста и пола птицы, сопутствующих инфекций, патогенности вируса, стресс-факторов и пр. и часто не зависит от принадлежности вируса к тому или иному серотипу.

Известно, что большинство вирусов гриппа не вызывают никаких признаков или вызывают очень слабые симптомы болезни у диких птиц. Степень выраженности симптомов болезни у птиц широко варьирует в зависимости от штамма вируса и вида птиц. Инфекция сходными вирусами гриппа А (например, некоторые штаммы H5 и H7), может вызвать обширную эпизоотию и гибель среди некоторых видов диких и особенно домашних птиц, таких как куры и индейки (2, 3). В Таджикистане проблема гриппа птиц изучена недостаточно. В различные годы были обнаружены разные штаммы других подтипов - по гемагглютинирующему вирусу гриппа птиц - 6 (1972 г.), 7 (1976-1978 гг.) и 4 (1978-1979, 1983-1984 гг.) Высоко-патогенный подтип вируса гриппа птиц H5N1 до настоящего времени на территории Республики не регистрировали (5). Проблема гриппа птиц остается актуальной для Таджикистана и сегодня. Постоянная циркуляция вируса H5N1 в соседних странах, возможность переноса возбудителей с дикими птицами, маршруты перелета которых пролегают через территорию Таджикистана, требуют постоянного мониторинга в крупных птицеводческих и мелких подворных хозяйствах.

Эпизоотологический мониторинг и эпизоотологическое прогнозирование в большинстве случаев основаны на критериях, связанных с оценкой внешнего проявления эпизоотического процесса, а не

его внутренний сущности. В этой связи крайне необходимо в целях оценки эпизootической ситуации рациональное использование массовых диагностических методов, в том числе современных, позволяющих констатировать не только болезнь, но и ее предвестники. Только тогда появится перспектива объективного прогнозирования болезни (7).

Классическая реакция для типирования гемагглютининов вируса гриппа - РТГА, несмотря на ее высокую специфичность, показала низкую чувствительность при определении антител к вирусу гриппа птиц. Поэтому в настоящее время все чаще используется более чувствительный и специфичный метод - непрямой иммуноферментный анализ (1, 2, 6, 4).

В связи с этим цель нашей работы - изучение циркуляции антител к вирусу гриппа птиц (H5N1) с применением ИФА и РТГА в птицеводческих хозяйствах различных климатогеографических зон Республики Таджикистан.

Материалы и методы

Культивирование вируса в куриных эмбрионах

В работе использовали штамм «A/cK/Skot/59» (H5N1) вируса гриппа птиц, предоставленный Центром ВОЗ в порядке научно-технической помощи Республике Таджикистан по программе «Проект по контролю за птичьим гриппом». Для размножения вируса использовали SPF куриные эмбрионы в возрасте 9 - 10 суток. Накопление вируса контролировали в РГА на планшетах с V - образными лунками в объеме реакции 50 мкл с 1% суспензией куриных эритроцитов.

Иммуноферментный анализ

Для проведения экспериментальных исследований был использован непрямой вариант твердофазного ИФА для выявления антител к вирусу гриппа птиц. Реакцию проводили в объеме 100 мкл. При постановке ИФА антиген (вирионы, очищенные ультрацентрифугированием в градиенте

ОП, усл. ед.

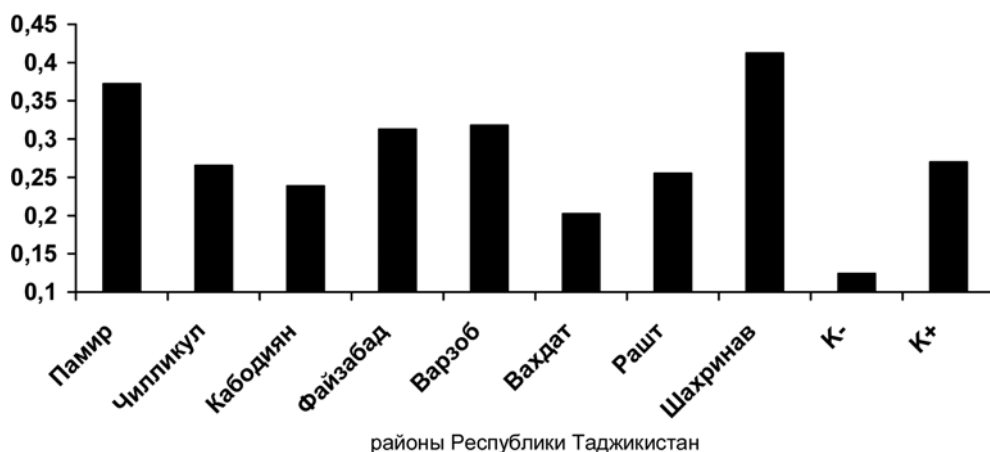


Рис. 1. Выявление антител к вирусу гриппа птиц H5N1 в ИФА (разведение сыворотки 1:200) n=105

сахарозы) адсорбировали на иммунологические планшеты в фосфатном буфере, pH 7,4. После адсорбции лунки планшет промывали ФСБ с добавлением Твина - 20. Готовили ряд последовательных двукратных разведений сывороток. Планшеты с исследуемыми сыворотками инкубировали 1,5 часа при $t +37^{\circ}\text{C}$. Лунки промывали и добавляли иммунопероксидазный конъюгат. В качестве конъюгата использовали анти-тела против иммуноглобулинов кур, конъюгированные с пероксидазой хрена. Инкубацию с конъюгатом проводили в условиях, аналогичных инкубации с сыворотками. По окончании инкубации лунки планшет промывали и проявляли реакцию внесением в каждую лунку субстратной смеси. В качестве субстратной смеси использовали коммерческий препарат «ТМБ» на основе хромогена 3, 3', 5, 5' – тетраметилбензидина (производства фирмы «Биолаб», Россия). Результаты ИФА оценивали на фотометре «Multiscan®MCC/340» с вертикальным лучом при длине волны 450 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП, 450).

Реакция

торможения гемагглютинации

Для постановки РТГА использовали коммерческие препараты производства ФГУ «ВНИИЗЖ», Россия: «Диагностические сыворотки для РТГА»; «Инактивированный антиген вируса гриппа птиц подтипа H5N1», серия № 3, изготовленный 03. 2008 г.

Результаты

Исследования проводились в РТГА с коммерческими диагностикумами и в ИФА. Для постановки ИФА нами была

разработана тест – система, выявляющая антитела к вирусу гриппа птиц (H5N1). За период с октября 2008 года по январь 2009 года исследовали на наличие антител к подтипу H5N1 103 пробы сывороток, полученных от кур из птицефабрик и мелких подворных хозяйств различных районов Республики Таджикистан: Памир, Чилликул, Кабодиян, Файзабад, Варзоб, Вахдат, Рашт, Шахринав. На рис. 1 приведены данные по выявлению антител к вирусу гриппа птиц (H5N1) у кур в различных районах. Как видно из рис. 1, в ИФА наиболее высокие титры антител к вирусу обнаруживали в сыворотках, полученных из районов: Памир и Шахринав, а также в районах Файзабад и Варзоб; минимальные титры выявлены в других регионах. В РТГА антитела в низких титрах выявляли в пробах из района Памир. При этом следует отметить, что в части районов (Памир, Чилликул, Кабодиян, Файзабад, Варзоб) проводилась профилактическая вакцинация кур «Инактивированной эмульгированной вакциной против птичьего гриппа шт. H5N1», производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов», Россия.

Выводы

Представленные данные свидетельствуют о том, что чувствительность иммуноферментного метода существенно превосходит РТГА. За счет более высокой чувствительности этого метода удастся проследить распространение вируса H5N1, несмотря на отсутствие видимых признаков заболевания среди кур. Положительные результаты в районах Памир, Чилликул, Кабодиян, Варзоб и Файзабад, по – видимому, объясняются проведенной вакцина-

ций, также как и положительный результат в РТГА с пробами из района Памир. При этом данные, полученные в ИФА при исследовании проб от не вакцинированной птицы по районам Вахдат, Рашт, Шахри-
SUMMARY

From October, 2008 up to January, 2009 103 probes of sera from the hens based at the integrated poultry farms and household facilities various regions of Republic Tadjikistan were tested with purpose to reveal antibodies to avian influenza H5N1 in HI and ELISA. Nonvaccinated poultry from several regions (Vakhdat, Rasht, ShakhriNAV) also were tested. Data received in HI and ELISA shows circulation of strains virus H5N1, which were nonpathogenic into absence of outbreaks in regions. In regions Pamir, Chillikul, Kabodijan, Varzob and Faisabad this results received positive that may be explained by vaccination of poultry.

Литература

1. Aleksandr S. Lipatov, Scott Krauss, Yi Guan, Malik Peiris, Jerold E. Rehg, Daniel R. Perez and Robert G. Webster. Neurovirulence in Mice of H5N1 Influenza Virus Genotypes Isolated from Hong Kong Poultry in 2001. // Journal of Virology, Mar. 2003, Vol. 77, No. 6, p. 3816 – 3823.
2. Кельмик Д. У. Грипп (чума) птиц. // Болезни домашних и сельскохозяйственных животных. // Москва – изд. Аквариум – 2003. С. 679-690.
3. Конопаткин А. А., Бакулов И. А., Нуйкин Я. В., и др. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных. // Москва - Изд. Колос - 1983. С. 461 - 466.
4. Луговская Н. Н., Циванюк М. А., Фролов С. В., Мудрак Н. С., Дрыгин В. В., Борисов А. В. Комплексное использование серологических методов для обнаружения антител к вирусу гриппа H5 в сыворотках крови диких и домашних птиц. // Ветеринарный консультант № 20 (135), октябрь 2006. С. 19 - 21.
5. Салимов Т. М., Фатхудинова М. Ф., Тиллоев Т. Обзор: Грипп птиц в Таджикистане. // ДУШАНБЕ, 2008. С. 247 - 251
6. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. // Москва, ВНИТИБП, 1998. С. 333.
7. Тихонов З. В. Развитие учений об инфекционных болезнях животных и птичьему гриппе (исторический аспект). // Москва - Изд. ЮгоВосток - Сервис - 2006. С. 22 - 25.

УДК: 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

В.И. Семенихин, А.С. Донченко, С.А. Юрик

(Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, п. Краснообск, Новосибирская область)

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Некробактериоз – широко распространенное инфекционное заболевание, которым болеют все виды животных и птиц, а также и человек. Первичным агентом в возникновении данного заболевания является *Fusobacterium necrophorum* – грамотрицательная, полиморфная, неподвижная палочка, растущая в строго анаэробных условиях, не образующая спор и капсул. Болезнь причиняет экономический ущерб из-за снижения многих показателей, в том числе молочной продуктивности на 5–25%, интенсивности роста на 15–25% [1–3].

Основным способом лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота в настоящее время является бактериологическое исследо-

вание: микроскопия мазка, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных. Эти методы диагностики имеют свои минусы. Так, из очагов поражения наряду с *Fusobacterium necrophorum*, обладающей вирулентностью, выделяют и неvirulentные биотипы: *Fusobacterium pseudonecrophorum*, находящиеся в рубце, а также атипичные формы, которые никогда не вызывают заболевание, но по морфологическим признакам очень схожи с вирулентными вариантами. Одновременно в больших количествах выделяется сопутствующая микрофлора: стафилококки, стрептококки, микрококки, картофельная, кишечная палочки и другие микроорганизмы. Поэтому выделить возбудителя заболевания сложно. В целом на постанов-