

УДК 578.4:598.2(575.3)

МОНИТОРИНГ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

¹Сансызбай А.Р., ¹Кошеметов Ж.К., ²Амирбеков М., ²Аноятбеков М.,
²Махмадшоев А.Н., ¹Богданова М.И., ¹Наханова Г.Д., ¹Нурабаев С.Ш.,
¹Исмагамбетов Б.М., ¹Сейсенбаева М.С., ¹Касенов М.М.

¹Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
РГП НИИПББ КН МОН, Гвардейский, e-mail: Koshemetov2008@mail.ru;

²Институт проблем биологической безопасности ТАСХН РТ, Душанбе, e-mail: baytor@mail.ru

В данной статье представлены результаты изучения эпизоотической ситуации по гриппу тип А и болезни Ньюкасла на территории Республики Таджикистан. Для проведения мониторинга были использованы классические лабораторные методы, такие как реакция торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР). В ходе мониторинга вирус гриппа типа А с антигенной формулой H5N1 выделен в пробах от дикого лебедя, доставленных из Хатлонской области в 2006 г., а также в пробах биоматериала, отобранных в 2014 г. от золотистого шурка был выделен вирус высокопатогенного гриппа птиц с антигенной формулой H5N1, а от золотистого шурка, сороки и пеночки-теньковки вирус гриппа тип А. Также в результате проведенных исследований в пробах патологического материала от грача на территории ГБАО выделен вирус гриппа типа А субтипа H5, а в образцах от пеночки-теньковки и галки обнаружен вирус гриппа птиц тип А.

Ключевые слова: вирус гриппа типа А, болезнь Ньюкасла, мониторинг

MONITORING ON VIRAL AVIAN DISEASES ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF TADJIKISTAN

¹Sansyzybay A.R., ¹Koshemetov Zh.K., ²Amirbekov M., ²Anoyatbekov M.,
²Makhmadshoev A.N., ¹Bogdanova M.I., ¹Nakhanova G.D., ¹Nurabaev S.Sh.,
¹Ismagambetov B.M., ¹Seysenbaeva M.S., ¹Kasenov M.M.

¹Research Institute for Biological Safety Problems RSE RIBSP SC MES RK,
Gvardeiskiy, e-mail: koshemetov2008@mail.ru;

²Institute for Biological Safety Problems TASKhN RT, Dushanbe, e-mail: baytor@mail.ru

Results of studying of the epizootic situation on influenza type A and Newcastle disease on the territory of the Republic of Tadjikistan are presented in this article. Classic laboratory methods such as hemagglutination-inhibition reaction (HAIR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) were used for providing of monitoring. During monitoring influenza virus type A with antigenic formula H5N1 is isolated in samples from wild swan delivered from Khatlonskiy oblast in 2006. Avian high pathogenic influenza virus was isolated from samples of biomaterial selected in 2014 from common bee-eater and influenza virus type A was isolated from magpie and. Also, as the results of the provided researches, in samples of the pathological material from rook on the territory of GBAO is isolated influenza virus type A subtype H5 and in samples of chiffchaff and rook is detected influenza virus type A.

Keywords: influenza virus type A, Newcastle disease, monitoring

Во все времена ситуация по особо опасным инфекциям как человека, так и животных была и остается актуальной проблемой для всего мира. Эпизоотологическое неблагополучие сопредельных стран по особо опасным болезням сельскохозяйственных и диких животных и птиц, интенсификация импортно-экспортных операций, а также наличие естественных путей и способов заноса инфекции, обусловленных природными, географическими, климатическими и метеорологическими условиями, не исключает возможности возникновения различных эпизоотий в Республике Таджикистан [1–3].

Эффективность борьбы с особо опасными заболеваниями, такими как высокопатоген-

ный грипп птиц, болезнь Ньюкасла, зависит от быстроты организации охранно-карантинных мероприятий, скорость проведения которых в значительной мере определяется временем, необходимым для идентификации вируса, вызвавшего заболевание птиц [4, 5].

В связи с этим, на основании генерального соглашения о научно-техническом сотрудничестве между РГП НИИ проблем биологической безопасности КН МОН РК и Институтом проблем биологической безопасности ТАСХН РТ, ежегодно сотрудниками двух организаций проводится мониторинг особо опасных инфекционных заболеваний птиц и животных на территории Республики Таджикистан.

Материалы и методы исследования

РКЭ 10–12 сут. возраста; наборы препаратов для диагностики гриппа тип А методами РТГА и ИФА; набор полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики гриппа тип А, субтипа Н5; набор препаратов для диагностики болезни Ньюкасла методом РТГА; биопробы от диких и домашних птиц, собранных на территории Республики Таджикистан.

Постановку РТГА, ИФА, ПЦР для диагностики гриппа типа А и болезни Ньюкасла проводили согласно наставлению производителя.

Изоляция вирусов гриппа птиц тип А и болезни Ньюкасла. Изоляцию вирусов проводили путем инокуляции каждой пробы исследуемого материала в аллантоисную полость трех 10–12 сут. РКЭ и последующей инкубацией при температуре 36 °С в течение 72 час. Наличие вируса в АЖ РКЭ проверяли в РГА.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью изучения эпизоотической ситуации и сбора данных по гриппу птиц с 2006 года организованы и проведены экспедиционные выезды практически по всей территории Республики Таджикистан.

Была проведена работа по отстрелу диких птиц (с целью отбора проб материала и сыворотки крови от диких птиц), отбору проб материала и сыворотки крови от больных домашних птиц, определению видового состава перелётных птиц водоёмов, обследованию хозяйств, где наблюдаются вспышки инфекционных заболеваний среди домашних и диких птиц.

Во время экспедиционных выездов в различные регионы Республики Таджикистан проведен выборочный отбор проб сыворотки крови птиц в различных регионах страны. В дальнейшем были проведены работы по экспертизе биоматериалов и постановке диагноза.

Первая экспедиция была организована в 2006 году в Хатлонскую область.

С целью определения возможной циркуляции штаммов вируса гриппа среди птиц были собраны биоматериалы: трахеальные и клоачные смывы, мозг, легкие, печень, кишечник от отстреленных и павших диких птиц, а также от домашней птицы – трахеальные, клоачные смывы и сыворотка крови (рис. 1).

В лаборатории проводили исследования доставленных проб методами традиционного ПЦР, ИФА и вирусывыделение на РКЭ. В результате вирусывыделения в первом и втором слепом пассаже проб на РКЭ от образцов патологических материалов павшего лебедя Хатлонской области, был выделен гемагглютинирующий агент (ГАА) с титром в РГА 1:1024.

Предварительная дифференциация выделенного ГАА проводилась в РТГА с ис-

пользованием специфической сыворотки к вирусу гриппа тип А. По результатам исследований выделенный ГАА был отнесен к семейству ортомиксовирусов.

Дифференциацию ГАА проводили с помощью тест-системы Directigen Flu A. Исследуемый изолят при нанесении на диагностические мембраны с моноклональными антителами к вирусу гриппа А вызывал образование окрашенных равнобедренных треугольников, свидетельствующее о положительной реакции и принадлежности ГАА к этому серотипу. Результаты исследований однозначно позволили отнести выделенный изолят к вирусу гриппа тип А. Подтип гемагглютинина выделенного изолята вируса гриппа А определяли в РТГА с использованием диагностических сывороток Н1-Н15.

ГАА выделенного изолята вируса гриппа А в титрах 1:80 подавлялась иммунной сывороткой к Н5, что свидетельствовало о близком антигенном родстве изучаемых вирусов. Полученный изолят, выделенный от павшего лебедя, был отнесен к вирусу гриппа А с подтипом гемагглютинина Н5.

С целью определения возможной циркуляции низко- и высокопатогенных штаммов вируса гриппа в популяции домашних птиц Хатлонской области от птиц населенных пунктов были отобраны свыше 20-и образцов сыворотки крови. Исследование сывороток крови проводили РТГА с использованием антигенов вируса гриппа подтипа Н5, Н7 и вируса болезни Ньюкасла. В пробах сыворотки крови птиц, антитела к вирусу гриппа подтипов Н5, Н7 обнаружены не были, однако в титрах от 1:64 до 1:512 в РТГА обнаружены антитела к вирусу болезни Ньюкасла, что объясняется систематической вакцинацией против этой болезни в регионе.

Одновременно в 2006 г. проводился экспедиционный выезд по Горно-Бадахшанской автономной области (ГБАО) и районам республиканского подчинения (РРП).

За период экспедиционного выезда от домашней птицы были собраны 119 из ГБАО и 375 от диких птиц из РРП проб биоматериала.

Также лабораторные исследования собранных проб проводили методами ИФА, ПЦР и вирусывыделение на РКЭ. В результате проведенных исследований наличие вируса гриппа птиц в исследуемых образцах не обнаружено.

В 2007 г. в лабораторных условиях были проведены серологические исследования сывороток крови и экспертиза патологического материала от больных, павших и клинически здоровых домашних птиц, доставленных из разных хозяйств Республики Таджикистан.



Рис. 1. Виды диких и домашних птиц, от которых собраны биопробы в Хатлонской области

Из биоматериалов были приготовлены 20–33% суспензии на физиологических растворах. В дальнейшем эти пробы исследованы на обнаружение антигена вирусов болезни Ньюкасла, подтипов Н1-Н15 гриппа. Также сыворотки крови птиц исследованы в РТГА на наличие антител против вышеуказанных инфекций.

В результате проведенных опытов установлено, что на грипп птиц антител и антигена в исследуемых пробах не выявлено, однако в исследованных сыворотках крови кур в количестве 30 проб, взятых из птицефабрик, выявлены антитела против вируса болезни Ньюкасла с активностью в РТГА 1:40–1:1280 в 21 пробе, которые составляют 70% от общих проб. Также в пробах патологических материалов, взятых от павшей домашней курицы, выявлен антиген вируса болезни Ньюкасла в РТГА и подтверждено электронной микроскопией наличие вируса болезни Ньюкасла в патологических материалах.

В 2008 г. для проведения эпизоотологического мониторинга гриппа птиц были собраны следующие патологические материалы (трахеальные, клоачные смывы, мозг, легкие, печень, кишечник) от отстреленных диких водоплавающих птиц. С Рушанского и Горного Масчохского районов собраны 399 биоматериалов.

Для определения возможной циркуляции вируса гриппа в популяциях домашних

птиц Республики Таджикистан, кроме трахеальных и клоачных смывов, от птиц населенных пунктов близлежащих к водоемам, были отобраны 36 проб сыворотки крови от кур, 18 проб от домашних гусей и 13 проб от уток. Исследование сыворотки крови проводили РТГА с использованием антигенов вируса гриппа подтипа Н5, Н7 и вируса болезни Ньюкасла. В результате исследований в пробах сывороток крови птиц, антител к вирусу гриппа подтипов Н5, Н7 не обнаружены.

В 2009 г. был организован экспедиционный выезд по территории Хатлонской области.

Учитывая вероятность циркуляции штаммов вируса гриппа среди диких птиц (грач, ворона, чирок-свистун, шилохвость, утка-нырок, чернеть, лысуха, голубь) были собраны 117 биоматериалов, а также были отобраны 32 пробы смывов от домашних птиц (гусь, курица, индоутка) на частных подворьях области.

Было проведено вирусовыделение отобранных проб от диких и домашних птиц из Хатлонской области на РКЭ по общепринятой методике. АЖ инфицированных и инкубированных эмбрионов проверяли на наличие ГАА в РГА. В результате проведенных работ по вирусовыделению выявлен 1 ГАА. Предварительная дифференциация выделенного ГАА проводилась в РТГА с использованием специфической сыворотки

к вирусу болезни Ньюкасла. По результатам исследований выделенный ГАА был отнесен к семейству парамиксовирусов.

В 2010 и 2011 гг. была организована экспедиция в Хатлонской области и РПП, от диких птиц собраны трахеальные и клоачные смывы и другие биоматериалы в количестве 190 проб.

По результатам двух последовательных пассажей полевых материалов на РКЭ гемагглютинирующий агент не выявлен.

В дальнейшем в 2013 г. с целью изучения возможности распространения вируса гриппа организованы и проведены экспедиционные выезды по территории РПП Республики Таджикистан. Была проведена работа по отбору проб 80 проб сыворотки крови кур и 25 проб сыворотки крови цыплят.

Проведено исследование в ИФА по обнаружению антител к вирусу гриппа птиц в сыворотке крови кур, закрепленных за работниками РПП Республики Таджикистан.

У обследованных птиц антитела в ИФА к вирусу гриппа не обнаружены.

Также в 2013 г. был организован экспедиционный выезд в ГБАО Республики Таджикистан. Целью экспедиции являлся отбор проб от диких перелетных птиц в период их массовой осенней миграции в места зимовки. Пробы отобраны от диких птиц семейства ласточковые, славковые, орлиные и соколиные, с общим количеством проб – 220.

В результате проведенных исследований в пробах патологического материала и сыворотке крови антигена и антител вируса гриппа птиц не обнаружено.

Результатом проведенной работы в период с 2006 по 2013 годы является проведение 12 экспедиционных выездов и получение 2420 проб, при исследовании которых вирус гриппа птиц с антигенной формулой H5N1 выделен в пробах от дикого лебеда, доставленного из Хатлонской области.

Первый экспедиционный выезд в 2014 г. был организован в Хатлонскую область в места наибольшего зимнего сезонного скопления диких птиц. Целью экспедиции было проведение постоянного мониторинга для изучения эпизоотической ситуации по высокопатогенному гриппу птиц, слежение за путями сезонных перелетов птиц, определение возможных контактов домашней и дикой перелетной птицы, сбор данных ветеринарной отчетности, изучение факторов возникновения и распространения заболевания, отбор проб патматериала и сыворотки крови.

По результатам экспедиционного выезда в лабораторию из Хатлонской области был доставлен патматериал в количестве 205 проб от диких и 34 от домашних птиц.

В результате проведенных лабораторных исследований в пробах патологического материала антиген вируса гриппа птиц не обнаружен.

В период с 07 марта по 18 мая 2014 года для сбора полевых материалов от диких птиц организована экспедиционная поездка в Хатлонскую область и ГБАО. Во время экспедиций от диких наземных птиц было собрано 364 пробы из Хатлонской области и 250 проб из ГБАО.

В результате проведенных лабораторных исследований в пробах материала от золотистого шурка № 7 был выделен вирус высокопатогенного гриппа птиц с антигенной формулой H5N1, а от золотистого шурка № 9, сороки и пеночки-теньковки вирус гриппа типа А, табл. 1 и рис. 2.

Были проведены исследования по вирусовыделению отобранных проб от диких и домашних птиц на территории ГБАО с использованием методов двукратного слепого вирусовыделительного пассажа проб на РКЭ, постановкой РГА, традиционного ПЦР и электронной микроскопией (табл. 2, рис. 2).

Таблица 1

Результаты лабораторных исследований

№ п/п	Вид птицы	Результаты				электронная микроскопия
		РГА	ПЦР			
			Тип А	H5	N1	
1	Золотистая шурка	+	+	+	+	+
2	Золотистая шурка	+	–	н/и	н/и	н/и
3	Сорока	+	+	–	н/и	н/и
4	Пеночка-теньковка	+	+	–	н/и	н/и

Примечания: 1. «+» – положительный результат. 2. «–» – отрицательный результат. 3. «н/и» – не исследовали.

Таблица 2

Результаты лабораторных исследований

№ п/п	Вид птицы	Результаты исследований				
		РГА	ПЦР			электронная микроскопия
			Тип А	H5	N1	
1	Пеночка теньковка	+	+	–	–	+
2	Галка	+	+	–	н/и	+
3	Грач	+	+	+	н/и	+



Рис. 2. Виды диких птиц, от которых выделен вирус гриппа типа А

В результате проведенных исследований в пробах патологического материала от грача выделен вирус гриппа тип А субтипа H5, а в образцах от пеночки-теньковки и галки обнаружен вирус гриппа типа А.

Для подтверждения полученных результатов проводились электронномикроскопические исследования и во всех пробах были обнаружены вирусные частицы округлой и удлинённой формы размером от 80 до 200 нм, при этом поверхность вирионов покрыта шипиками длиной 7–9 нм, что полностью совпадает с морфологией вирусов гриппа в научной литературе.

Заключение

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать следующее заключение, что в результате мониторинга в 2006 году на территории Хатлонской области Республики Таджикистан в пробах от дикого лебедя был выделен вирус гриппа тип А с антигенной формулой H5N1. В 2014 году в пробах материала от золотистого шурка № 7 был

выделен также вирус гриппа тип А с антигенной формулой H5N1, а от золотистого шурка № 9, сороки и пеночки-теньковки вирус гриппа тип А. Иммунологическими и молекулярными методами в пробах патологического материала от грача, отобранных на территории ГБАО, выделен вирус гриппа тип А субтипа H5, а в образцах от пеночки-теньковки и галки обнаружен вирус гриппа птиц тип А.

Список литературы

1. Львов Д.К. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций // Д.К. Львов, В.Д. Ильичев. – М.: Наука, 1979. – 270 с.
2. Каверин Н.В. Межвидовая трансмиссия вирусов гриппа А и проблема пандемии / Н.В. Каверин, Ю.А. Смирнов // Вопр. вирусол. 2003. – Т. 48, № 3. – С. 4–10.
3. Колосов А.А., Димов С.К. Прогностическая факторная модель проявления эпизоотического процесса классических инфекционных болезней // Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с болезнями животных. – Новосибирск, 1997. – С. 63–67.
4. Гуленкин В.М. Эпизоотологическое прогнозирование особо опасных болезней / В.М. Гуленкин, П.А. Яременко, Е.В. Гусева и др. // Ветеринария. 2001. – № 12. – С. 3–5.
5. Monne I, et al. Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor // J Virol. – 2014. – № 88(8). – P. 4375–4388.