

References

1. Boranbaev A.V., Kravchenko I.A. Monitoring parazitarnykh boleznei maralov v Altaiskom krae i Respublike Altai // Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2011. – № 12 (86). – S. 69-71.
2. Lunitsin V.G. Bolezni pantovykh oleney. – Novosibirsk, 1998. – 207 s.
3. Marchenko V.A., Efremova E.A., Bakh-tushkina A.I., Makaseev V.K., Vasil'eva E.A. Unifitsirovannaya sistema ogranichitel'nykh meropriyatii pri zooparazitozakh maralov v Respublike Altai. – Novosibirsk-Gorno-Altai, 2008. – 78 s.
4. Shuklina E.V. Osobennosti epizootologii i sistema lechebno-profilakticheskikh meropriyatii pri assotsiativnoi invazii maralov: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk. – Barnaul, 2007. – 22 s.
5. Lunitsyn V.G., Terent'ev V.I. Epizooticheskaya situatsiya po invazionnym boleznyam maralov // Organomorfologiya i profilaktika boleznei zhivotnykh: mater. konf., posvyashch. 55-letiyu Altaiskogo GAU (g. Barnaul, 25 dek-abrya 1998 g.). – Barnaul, 2000. – S. 65.
6. Kortly A. Ecology of parasites on game of the Family Cervidae and Bovidae // Prace vyzkumnych ustavu lesnickych CSSR. – 1964. – Vol. 29. – pp. 7-47.
7. Kurinov D.A., Marchenko V.A., Efremova E.A. Dinamika zarazhennosti maralov gel'mintami v khozyaistvakh Tsentral'nogo Altaya // Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami. – M., 2014. – Vyp. 15. – S. 130-134.
8. Marchenko V.A., Efremova E.A., Kurinov D.A. K epizootologii elafostrongileza maralov v Respublike Altai // Veterinarnyi vrach. – 2011. – Vyp. 1. – S. 61-64.
9. Bakhtushkina A.I., Marchenko V.A. Paraziticheskie chlenistonogie pantovykh oleney Gornogo Altaya // Evroaziatskii entomologicheskii zhurnal. – 2010. – Vyp. 9 (1). – S. 24-28.
10. Teterin V.V. Rasprostranenie smeshannoi invazii diktiokaul, varestrongil, elafostrongil u maralov v Altaiskom krae // Byul. VIGIS. – M., 1990. – Vyp. 54. – S. 103-105.
11. Shuklina E.V., Raabe I.Yu., Lunitsin V.G. Epizooticheskaya situatsiya po parazitozam maralov v Gornom Altaye // Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2003. – № 1. – S. 230-233.
12. Kotelnikov G.A. Diagnostika gel'mintozov zhivotnykh. – M.: Kolos, 1974. – 240 s.

Работа выполнена при частичной поддержке проектов РФФИ № 13-04-98079 и 16-44-040043.



УДК 619:616.98:578.831.1БН

Р.Т. Абдылдаева, Э.К. Акматова, И.У. Сааданов
R.T. Abdyldayeva, E.K. Akmatova, I.U. Saadanov

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

COMPREHENSIVE DIAGNOSIS OF NEWCASTLE DISEASE

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, комплексная диагностика, серология, ИФА, РГА, молекулярно-биологический метод, ПЦР, куры, патологический материал.

Возбудители вирусных болезней птиц широко распространены в природе. Использовали патологический материал от павших птиц с клиническими признаками болезни Ньюкасла для выделения вируса. Для подтверждения диагноза применяли серологические и молекулярно-биологические методы диагностики. В лабораторных условиях был проведен анализ сывороток крови от больных животных на наличие антител против вируса болезни Ньюкасла методом ИФА. Методом полимеразной цепной реакции были исследованы материалы от больных кур для идентификации вируса. Обнаружение возбудителя вируса дает возможность поставить соответствующий диагноз на болезнь Ньюкасла. Получили специфические фрагменты ПЦР-продукта, которые дали 356 п.н. вирусного генома вируса Ньюкасла. Для профи-

лактики болезни Ньюкасла владельцы птицы должны выполнять необходимые ветеринарно-санитарные требования по содержанию и уходу за ними.

Keywords: Newcastle disease, comprehensive diagnosis, serology, ELISA, hemagglutination, molecular biological methods, polymerase chain reaction (PCR), chicken, pathological material.

The causative agents of viral disease in birds are widespread in nature. We used the pathological material from dead birds with clinical signs on Newcastle disease for virus isolation. To confirm the diagnosis, the serological and molecular biological methods of diagnosis were used. Under laboratory conditions, the serum samples from sick animals were tested by ELISA for the presence of antibodies to Newcastle disease virus. Polymerase chain reaction was used to investigate the material from sick chickens to identify the virus. The detection of the virus enables to diagnose Newcastle disease. We ob-

tained specific fragments of the PCR product that gave the 356 bps of Newcastle virus viral genome. To prevent Newcastle disease in poultry, the owners

should follow the necessary veterinary and sanitary requirements of poultry management.

Абдылдаева Роза Тынайбековна, м.н.с., лаб. эпизоотологии, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: roza.abdyldaeva.80@mail.ru.

Акматова Эльмира Казакбаевна, д.б.н., с.н.с., зав. лаб. болезней домашних животных, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: akmatova_elmira@mail.ru.

Сааданов Искендер Усенбекович, к.в.н., с.н.с., зав. лаб. эпизоотологии, Кыргызский научно-исследовательский ветеринарный институт им. А. Дуйшеева, Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек, Кыргызская Республика. E-mail: isken100@mail.ru.

Abdyldaeva Roza Tynaybekovna, Junior Staff Scientist, Epizootology Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: roza.abdyldaeva.80@mail.ru.

Akmatova Elmira Kazakbayevna, Dr. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Head, Domestic Animal Diseases Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: akmatova_elmira@mail.ru.

Saadanov Iskender Usenbekovich, Cand. Vet. Sci., Senior Staff Scientist, Head, Epizootology Lab., Kyrgyz Research Veterinary Institute named after A. Duysheyev, Kyrgyz National Agricultural University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: isken100@mail.ru.

Введение

Болезнь Ньюкасла (лат. – morbus Newcastle; англ. – Newcastle disease; псевдочума, атипичная чума, азиатская чума, псевдоэнцефалит, болезнь Дойля, болезнь Филарета, болезнь Ранкхета, брауншвейгская чума; ньюкаслская болезнь, БН) – высококонтагиозная болезнь птиц из отряда куриных, проявляющаяся поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы.

В настоящее время болезнь Ньюкасла широко распространена во многих странах Евразии, Африки и Америки и только в странах Океании болезнь не регистрируется [1]. В Европе в течение 80-х годов наблюдались только редкие спорадические вспышки заболевания [2]. Однако после 1991 г. произошла серия вспышек болезни, поразивших птицу в Бельгии, Нидерландах, Люксембурге, Германии, Испании, Мальте и Франции [3]. Крупная эпизоотия болезни Ньюкасла прошла в Европе в 1993-1994 гг., где было зарегистрировано 390 неблагополучных пунктов только в Германии. Там же в 1996 г. было зафиксировано 69 случаев возникновения болезни Ньюкасла, а в 1997 г. – 79 случаев. По данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ) в 1999 г. в мире было зарегистрировано 2709 вспышек заболевания НБ [4, 5]. В СССР болезнь Ньюкасла впервые появилась на территории Украины, Белоруссии, Молдавии во время Второй мировой войны. В первых сообщениях отечественных учёных это заболевание описывалось под названием чумы птиц. Однако дальнейшие исследования показали, что инфекция отличается от классической чумы птиц и является идентичной ранее описанной БН [6, 7].

По данным Государственной инспекции по ветеринарной и фитосанитарной безопасности при Правительстве Кыргызской республики за последние десять лет регистрируются случаи заболеваемости птиц болезнью Ньюкасла. В соответствии с планом вакцинации против особо опасных инфекций все птицефабрики и частные птицеводства проводят массовые плановые вакцинации против болезни Ньюкасла вакцинами штаммов Н и Ласота конъюнктивальным или аэрозольным методами.

Цель исследования – проведение комплексной диагностики болезни Ньюкасла с применением серологических и молекулярно-биологических методов диагностики.

Объекты и методы

Научно-исследовательская работа началась с лабораторной диагностики патологических материалов от больных птиц. Больные птицы были выявлены в частном хозяйстве Иссык-Атинского района. В закрытом помещении, где не было доступа для мелких птиц и других видов животных, начали болеть куры в возрасте 6-14 мес. У больных кур наблюдались угнетение, отсутствие аппетита, малоподвижность и снижение яйценоскости.

Из 432 кур выявили 6 больных, которых отделили в отдельное изолированное помещение до установления причины заболевания. От больных кур были взяты смывы из трахеи и пробы крови для серологических исследований.

В лабораторных условиях был проведен анализ сывороток крови от больных животных на наличие антител против вируса болезни Ньюкасла методом ИФА.

Материалы, используемые для ИФА: плашки, реагент конъюгата, таблетки субстрата, реагенты буферного субстрата, стоп раствор, образцы реагентов разбавителей, промывочный буфер, отрицательный контроль, положительный контроль, мерная пипетка, одноразовые наконечники, 8-канальные пипетки, дистиллированная или деионизированная вода, микротитровальный планшет-ридер с 405 нм фильтром, микротитрационные плашки с шайбой, NDV ELISA KIT, BioChek, UK Ltd. Co., фирма BIO-LAB.

Вирусы были выделены из мозга, трахеи, печени и селезенки с помощью стандартных методов выделения вируса в куриные эмбрионы.

Для постановки РГА применяли следующие ингредиенты: эритроциты, агглютинированные данным вирусом, гемагглютинирующий вирусный антиген, испытываемые сыворотки, стандарт антител (референс-сыворотка иммунного животного). Аллантаоисную жидкость проверяли на содержание вируса путем агглютинации куриных эритроцитов на стекле (и в пробирках – титрование вируса).

Были использованы куриные эмбрионы 9-11-дневного возраста для инокуляции вирус-содержащим материалом. Инокулированные яйца каждые 24 ч проверялись на жизнеспособность эмбриона. Яйца, содержащие мертвый эмбрион, помещались в холодильник. В течение 4 дней все яйца, включая яйца, содержащие живой эмбрион, были охлаждены до +4°C в течение ночи. Из яиц собирали аллантаоисную жидкость и проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) на его способность гемагглютинации куриных эритроцитов. Качественную оценку РГА проводили в баллах от «+» до «++++».

Для выделения вируса использовали молекулярно-биологический метод диагностики ПЦР.

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR): прямой (5'-GCA GCA GCT GGG GTG ATT GT-3', нуклеотидная позиция 158-177) и обратный (5'-TCT TTGAGCAGGAGGATGTTG-3', нуклеотидная позиция 513-493) наборы праймеров олигонуклеотидов были использованы для амплификации 356 п.н., соответствующих ампликонов активации, сайт расщепления гена NDV-F. Обратную транскрипцию и ПЦР-амплификации с последующим QiAamp одним шагом процедуры RT-PCR (Qiagen). 50 мкл в общей сложности смеси реакции получали с использованием 10 мкл 5X Qiagen RT-PCR буфера, 2 мкл дНТФ, 10 мкл 5X Q-раствора, 6 мкл 5 мкМ F и R праймеров каждый, 2 мкл смесь фермента, 0,5 мкл 20U мкл-1 ингибитор РНКазы, 9 мкл H₂O и MQ 100 мкг РНК вируса. Трехступенчатый метод амплификации 35 циклов, запрограммированных ПЦР машиной (9800 Fast термоцик-

лер), использовали для кДНК-амплификации следующим образом: 50°C в течение 30 мин. (с обратной транскрипцией), 72°C в течение 15 мин. (начальной активации ПЦР), 3-ступенчатая езда на велосипеде 94°C в течение 45 с (денатурация) 58°C в течение 45 с (отжиг) 72°C в течение 45 с (расширение) и 72°C в течение 5 мин. (конечным удлинением).

Результаты и их обсуждение

Полученные данные ИФА при исследовании сывороток крови больных кур на наличие специфических антител к вирусу Ньюкасла показали, что титр антител варьирует от 1:128 до 1:512 (табл. 1). Учитывая тот факт, что животные ранее не были вакцинированы, можно предполагать, что специфические антитела к вирусу Ньюкасла были выработаны на действие патогенного антигена.

Таблица 1
Результаты исследований на наличие антител к вирусу болезни Ньюкасла в ИФА

| № образца | Вид животного | Возраст, мес. | Результат |
|-----------|---------------|---------------|-----------|
| 1 | курица | 6 | 1:128 |
| 2 | курица | 6,5 | 1:256 |
| 3 | курица | 6 | 1:256 |
| 4 | курица | 14 | 1:512 |
| 5 | курица | 10 | 1:128 |
| 6 | курица | 8 | 1:128 |

Из данных таблицы 1 также можно наблюдать, что у самой взрослой курицы (14 мес.) наблюдается самый высокий титр антител. Следовательно, организм данного животного не был устойчив к воздействию патогенного вируса, несмотря на предполагаемый иммунитет во взрослом организме, и вирус может поражать как взрослых птиц, так и молодняк. По клиническим признакам данные животные особых различий не имели.

Для более глубокого исследования у 2 кур взяли образцы внутренних органов, прибегнув к вынужденному забою.

По результатам РГА было установлено, что во всех органах содержится патогенный вирус, вызвавший заболевание у птиц, но для идентификации вируса этого было недостаточно (табл. 2).

Таблица 2
Результаты исследований РГА

| № образца | Результат в титрах | | | |
|-----------|--------------------|--------|--------|-----------|
| | мозг | трахея | печень | селезенка |
| 1 | 1:32 | 1:64 | 1:64 | 1:128 |
| 2 | 1:16 | 1:32 | 1:128 | 1:128 |
| 3 | 1:16 | 1:32 | 1:128 | 1:128 |
| 4 | 1:32 | 1:128 | 1:128 | 1:256 |
| 5 | 1:8 | 1:32 | 1:128 | 1:128 |
| 6 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:128 |

Методом полимеразной цепной реакции были исследованы материалы от больных кур для идентификации вируса (рис.).

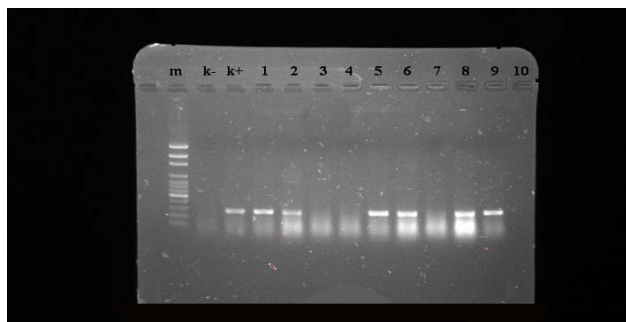


Рис. Электрофореграмма продукта амплификации вируса Ньюкасла (образец №1): m – маркер 100-1000 п.н.; K- – отрицательный контроль; K+ – положительный контроль; 1 – мозг; 2, 3, 4 – печень; 5, 6 – селезенка; 7, 8, 9 – трахея

Специфические фрагменты ПЦР-продукта дали 356 п.н. для вирусного генома вируса Ньюкасла, они были выявлены в мозге, печени, селезенке и трахее.

Заключение

За последние годы все большее значение в диагностировании болезни Ньюкасла птиц приобретают лабораторные методы исследования. Болезнь Ньюкасла остается одним из основных вирусных заболеваний среди птиц. В результате проведения РГА и ИФА было установлено, что во всех органах содержится патогенный вирус, вызвавший заболевание у птиц.

Результаты ИФА при исследовании сывороток крови больных кур на наличие специфических антител к вирусу болезни Ньюкасла выявили у 6 больных кур, где титр антител варьирует от 1:128 до 1:512. Птицы ранее не были вакцинированы, и специфические антитела к БН были выработаны на основе действия патогенного антигена БН.

Для дальнейшего подтверждения анализа применили полимеразную цепную реакцию на наличие РНК в вирусном материале.

Учитывая результаты исследований специфических фрагментов нуклеиновых кислот вируса БН, можно сделать вывод, что на данной птицеферме циркулировал вирус БН. После выделения нуклеиновых кислот на электрофореграмме видно, что амплификат выявлен на уровне 356 п.н. Этому свидетельствует распространение вируса по всем жизненно важным органам больных птиц.

Для профилактики болезни Ньюкасла владельцы птицы должны выполнять необходимые ветеринарно-санитарные требования по содержанию и уходу за ними. Два раза в год дезинфицировать с профилактической целью

птичники. Всю вновь завозимую птицу необходимо в течение месяца содержать изолированно от остального поголовья.

Библиографический список

1. Бакулов И.А. Эпизоотология с микробиологией. – М.: Агропромиздат, 1987.
2. Гусева Е.В., Сатина Г.А. Вирусные болезни кур // Современные аспекты ветеринарной патологии животных. – Владимир, 1998. – С. 128.
3. Ирза В.Н. Материалы межправительственного совещания по сотрудничеству в области ветеринарии. – М., 2003. – С. 17.
4. Родин Ю.В., Руденко Т.В., Смоленский В.Н. Оценка эпизоотологической ситуации и особенности специфической профилактики при ньюкаслской болезни // Вестник ветеринарии. – 1998. – № 2. – С. 66.
5. Timms L., Alexander D.J. Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines // Avian Pathol. – 1977. – Vol. 6 (1). – R. 51-59.
6. Ghuman J.S., Bancovski R.A. In vitro DNA synthesis in lymphocytes from turkey vaccinated with LaSota, TC and inactivated Newcastle disease vaccines // Avian Dis. – 1975. – Vol. 20. – R. 18-31.
7. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses, 4th edn. (University of Pennsylvania, 1998. American Association of Avian Pathologists).

References

1. Bakulov I.A. Epizootologiya s mikrobiologiei. – M.: Agropromizdat, 1987.
2. Guseva E.V., Satina G.A. V kn.: Virusnye bolezni kur. Sovremennye aspekty veterinarnoi patologii zhivotnykh. – Vladimir, 1998. – S. 128.
3. Irza V.N. Materialy mezhpriavitel'stvennogo soveshchaniya po sotrudnichestvu v oblasti veterinarii. – M., 2003. – S. 17.
4. Rodin Yu.V., Rudenko T.V., Smolenskii V.N. Otsenka epizootologicheskoi situatsii i osobennosti spetsificheskoi profilaktiki pri n'yukaslskoi bolezni // Vestnik veterinarii. – 1998. – № 2. – S. 66.
5. Timms L., Alexander D.J. Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines // Avian Pathol. – 1977. – Vol. 6 (1). – R. 51-59.
6. Ghuman J.S., Bancovski R.A. In vitro DNA synthesis in lymphocytes from turkey vaccinated with LaSota, TC and inactivated Newcastle disease vaccines // Avian Dis. – 1975. – Vol. 20. – R. 18-31.
7. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses, 4th edn. (University of Pennsylvania, 1998. American Association of Avian Pathologists).