

LAUKINIŲ PAUKŠČIŲ KRAUJO SERUMO SEROLOGINIAI TYRIMAI DĖL PAUKŠČIŲ GRIPO

Ilona Aleksėjūnienė, Almontas Aleksėjūnas, Julija Šilkūnaitė
LVA Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys; tel. (8~346) 60 689;
el. paštas: aleksejuniene@yahoo.com

Santrauka. IFA metodu ištyrėme laukinių paukščių – didžiųjų ančių (*Anas platyrhynchos*), ančių kryklių (*Anas querquedula*), laukinių žąsų (*Anser fabalis*), balandžių (*Columbia livia*), žvirblių (*Passer domesticus*)) kraujo serumą dėl antikūnų prieš paukščių gripo virusą. Nė viename tirtame mėginyje antikūnai prieš PG nenustatyti.

Raktažodžiai: antikūnai prieš paukščių gripo virusą, laukiniai paukščiai.

SEROLOGICAL INVESTIGATION OF AVIAN INFLUENZA IN WILD BIRDS NEIGHBOURING LARGE-SCALE POULTRY FARMS IN LITHUANIA

Ilona Aleksėjūnienė, Almontas Aleksėjūnas, Julija Šilkūnaitė
Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto st. 2, LT-56115 Kaišiadorys,
Phone: 8~346 60 689; e-mail: aleksejuniene@yahoo.com

Summary. It is known, that wild birds may act as carriers of avian influenza viruses. Currently, an increasing number of different wild bird species are being found to be infected with the highly pathogenic H5N1 Asian strain of the virus. Migratory wild birds affected by the disease appear to be responsible for spread of the H5N1 virus. The present study was designed to investigate serologically the presence of avian influenza in wild birds neighbouring large-scale poultry farms in Lithuania. For this purpose sixty wild birds (Mallards, Garganays, White-fronted geese, pigeons, sparrows) were caught in large-scale poultry farms area and screened for the presence of antibodies against avian influenza virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The results from this study have shown that all sera samples were negative to avian influenza virus.

Keywords: avian influenza, wild birds, ELISA.

Ivadas. Paukščių gripo (PG) virusas paplitęs visame pasaulyje. Iki XX a. pabaigos buvo registruojami tik pavieniai šios ligos protrūkiai, ir tai nekėlė tokios grėsmės, kuri atsirado pasaulyje pastaruoju metu. Tarptautinio epizootijų biuro duomenimis, per paskutiniuosius dvejus metus šios ligos protrūkiai užfiksuoti 18 pasaulio valstybių: Honkonge, Vietname, Tailande, Indonezijoje, Korėjoje, Kinijoje, Laose, Malaizijoje, Kambodžoje. 2005 metais susirgimas registruotas ir Filipinuose, Japonijoje, Rusijoje, Kazachstane, Mongolijoje, Turkijoje, Rumunijoje, Kroatijoje, Ukrainoje. Šių metų pradžioje užregistruotas paukščių gripo protrūkis Turkijoje, Kinijoje, Indonezijoje, Irake, Nigerijoje, Kipre, Italijoje, Graikijoje, Bulgarijoje, Rusijoje, Gruzijoje, Azerbaidžane, Slovėnijoje, Švedijoje, Šveicarijoje, Prancūzijoje, Austrijoje, Vokietijoje (OIE, iki 2006 m. kovo 1 d.).

Paukščių gripas, dar kitaip – paukščių maras – ūmus, greitai plintantis paukščių susirgimas, kuris pasireiškia bendru nusilpimu, nervų sistemos pažeidimo požymiais, kvėpavimo ir virškinimo sistemų pažeidimais, dėl kraujo apytakos sutrikimų patinusia tamsiai raudona su melsvu atspalviu barzdele ir skiautere. Jį sukelia *Orthomyxoviridae* šeimos, *Influenzavirus* genties tipo virusas (Manual of diagnostic tests, 2004). Šiuo metu pagal antigeno hemaglutinino (H) variacijas pripažinti 16 potipių, o pagal neuraminidazės (N) – 9 potipiai (Alexander, 2000; Manual of diagnostic tests, 2004). Tai didelius ekonominius nuostolius darantis susirgimas.

Žaibiška forma susirgę paukščiai gaišta staiga, be klinikinių požymių. Sergantys ūmia forma paukščiai pasidaro apatiški, slepia galvą po sparnu, nelesa, viduriuoja žalsvomis išmatomis, skiauterė ir barzdelė pamelsta, ant galvos, kaklo, krūtinės atsiranda edemos. Ilgiau sergantiems atsiranda nervinio pobūdžio sutrikimai. 30–60 proc. susirgusių paukščių gaišta (Easterday et al., 1997; Swayne, Suarez, 2000). 1997 metais Honkonge per 3 dienas sunaikinta apie 1,5 mln. paukščių. 1999 – 2000 metais Italijoje šiuo virusu užsikrėtė 16 milijonų sparnuočių. 2003 metais Nyderlanduose, siekiant užkirsti kelią paukščių gripo plitimui, buvo priverstinai paskersta ketvirtis milijono paukščių. Olandijoje sunaikinta daugiau kaip 30 milijonų (Elbers et al., 2004; Fouchier et al., 2004; FAO, 2006). Ukrainoje, Krymo pusiasalyje esančiuose trijuose paukštynuose sunaikinta apie 172 tūkstančiai paukščių. Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos duomenimis, nuo šių metų sausio mėnesio Azijos regione dėl nuolatinių šios ligos pasireiškimų paskersta 20–25 milijonai paukščių.

Laukiniai paukščiai, ypač gyvenantys vandenu pakrantėse, laikomi natūraliais gripo viruso nešiotojais, net ir neturintys aiškių ligos požymių. Jų organizme virusas dauginsi ir išskiriamas kartu su išmatomis. Nustatyta, kad gripo sukėlėją platina ir praskrendantys laukiniai paukščiai. Migruoja apie 70 paukščių rūšių, daugiausia vandens paukščiai – antys, žąsys ir kiti, labiausiai jautrūs gripo virusui. Ieškodami maisto jie dažnai atskrenda į paukštynus, ūkininkų fermas,

šiukšlynus. Užsienio tyrėjų duomenimis, gripo virusą gali platinti ir balandžiai, kregždės, žvirbliai, žuvėdros (Fouchier et al., 2003; De Marko et al., 2003; Perkins, 2002; Seo, Webster, 2001; Сюрин и др., 1998). Persirgę ir pasveikę paukščiai virusą platina 15–20 dienų, o nešiotojais gali būti iki 3 mėnesių (Kaženiauskas, 2005).

Darbo tikslas – ištirti laukinių paukščių kraujo serumą dėl antikūnų prieš gripo virusą.

Medžiagos ir metodai. Darbas atliktas Lietuvos veterinarijos instituto Virusologijos skyriaus Paukščių ligų laboratorijoje.

Moksliniai tyrimai atlikti laikantis Lietuvos Respublikos gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymo [„Valstybės žinios“, 1997-11-28, Nr. 108] bei poįstatyminių aktų – LR valstybinės veterinarinės tarnybos įsakymų „Dėl laboratorinių gyvūnų veisimo, dauginimo, priežiūros ir transportavimo veterinarijos reikalavimų“ (1998-12-31, Nr. 4 - 361) ir „Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams“ (1999-01-18, Nr. 4 - 16).

Tyrėme laukinių paukščių (balandžių, žvirblių, ančių ir žąsų), pagautų Kauno, Kaišiadorių, Kėdainių, Klaipėdos, Telšių rajonų paukštynuose, pašarų gamyklose bei aplinkinėse teritorijose, kraujo serumą. Kraujas imtas į vienkartinius mėgintuvėlius be antikoagulianto, atskirtas serumas užšaldytas –18°C temperatūroje.

Antikūnams prieš gripo virusus nustatyti paukščių kraujo serumas buvo tiriamas netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Tyrimui naudojome komercinį diagnostikos rinkinį. IFA buvo atliekama pagal gamintojo metodines rekomendacijas. Tiriami kraujo serumai buvo atskiedžiami 500 kartų. Į kiekvieną plokštelės duobutę pylėme po 100 µl tiriamo serumo. Plokšteles inkubavome 30 min kambario temperatūroje. Po to plovėme 3–5 kartus su 350 µl

bidistiliuoto vandens. Imuninei reakcijai antigenas-antikūnas atpažinti į kiekvieną akutę pylėme po 100 µl konjugato ir vėl inkubavome 30 min kambario temperatūroje. Vėl plovėme 3–5 kartus su 350 µl bidistiliuoto vandens. Imunofermentinės analizės rezultatams išryškinti pylėme į kiekvieną akutę po 100 µl substrato. Dabar jau inkubavome 15 min +20 °C temperatūroje. Reakciją stabdėme stabdymo tirpalu. Ar antikūnai yra, ar jų nėra nustatėme spektrofotometru („SLT Spektra“, bangos ilgis 650 nm) pagal tiriamo serumo ir teigiamos kontrolės optinio tankio santykį (S/TK), kuris apskaičiuojamas pagal formulę:

$$S/TK = \frac{S - \text{vid. NK}}{\text{vid. TK} - \text{vid. NK}}$$

kur S – tiriamo serumo optinis tankis;

vid. TK – teigiamų kontrolių optinio tankio vidurkis;

vid. NK – neigiamų kontrolių optinio tankio vidurkis.

Jeigu S/TK buvo mažesnis arba lygus 0,2, mėginiai buvo laikomi neigiamais. Jei S/TK didesnis už 0,2, t. y. titras didesnis negu 1:396, mėginys yra teigiamas ir rodo prieš virusą susidariusius antikūnus.

Tyrimų rezultatai. Kadangi paukštynuose bei pašarų gamyklose neįmanoma išvengti laukinių paukščių (balandžių, žvirblių, čiurlių ir kt.) patekimo į teritoriją, ištyrėme šiose teritorijose sugautų paukščių kraujo serumo mėginius dėl gripo sukėlėjo. Taip pat ištyrėme ir medžiotųjų sumedžiotų laukinių ančių bei žąsų kraujo serumą (Lentelė), iš viso – 60 paukščių kraujo serumo mėginių. Visi mėginiai buvo neigiami gripo viruso atžvilgiu, t. y. nė viename mėginyje antikūnai prieš gripo virusą nustatyti nebuvo.

Lentelė. IFA tyrimų rezultatai

Eil. nr.	Paukščio rūšis	Mėginių skaičius, vnt.	Antikūnai kraujo serume
1	Balandis	19	nerasta
2	Žvirblis	3	nerasta
3	Didžioji antis	17	nerasta
4	Antis kryklė	12	nerasta
5	Laukinė žąsis	9	nerasta

Aptarimas ir išvados. Paukščių gripas – pavojingas susirgimas, keliantis didžiulę grėsmę ne tik paukščiams, bet ir žmonių sveikatai, galintis sumažinti paukštininkystės pelningumą. Situacija dėl šios ligos visame pasaulyje greitai keičiasi, paukščių gripas grėsmingai artėja prie Lietuvos sienų, ir didžiausią riziką kelia migruojantys laukiniai paukščiai. Kai kurios viruso padermės laukiniams paukščiams gali nesukelti ypatingų klinikinių simptomų arba jie gali būti išreikšti silpnai, tačiau naminiai vištiniai paukščiai labiau jautrūs šioms padermėms. Nemažas vaidmuo platinant virusą tenka antims ir žąsims. Kaip teigia D. J. Alexander (2000), apie 15 proc. visų tirtų atvejų žemo virulentiškumo virusą perdavė antys ir žąsys, kai tuo tarpu kitos paukščių rūšys – tik 2 proc.. Reikia atsižvelgti į tai, kad ančių ir žąsų

migracijos keliai kerta Lietuvos teritoriją, tad didžiausia paukščių gripo rizika tenka tose vietose laikomiems paukščiams.

Remdamiesi užsienio literatūros duomenimis, antikūnams prieš gripo virusą nustatyti taikėme IFA metodą (Sala et al., 2003; Manual of diagnostic tests, 2004), vieną perspektyviausių atliekant didelių paukščių grupių monitoringus, nes tyrimus galima atlikti labai operatyviai: reikalingas nedidelis tiriamų mėginių kiekis o visos reakcijos stadijos gali būti automatizuotos (Jackwood et al., 1999).

Europoje ištyrus 15 058 mėginius dėl PG, daugiausia teigiamų nustatyta tarp šių paukščių rūšių: didžioji antis (*Anas platyrhynchos L.*) – 7,9 proc., antis kryklė (*Anas querquedula L.*) – 3,4 proc., laukinė žąsis – 2,6 proc.

(EFSA, 2004). Švedijoje ištyrus migruojančias Didžiąsias antis, rasta 20 proc. užsikrėtusių paukščių, Olandijoje – 7,8 proc. (EFSA, 2004).

Visi mūsų tirti mėginiai buvo neigiami. Remiantis serologiniais tyrimais galima įvertinti epizootinę situaciją, tačiau tokius tyrimus reikia atlikti nuolat. Rekomenduojama tirti tiek paukščių laikymo vietų, kad būtų galima aptikti bent vieną užkrėtą 95 proc. patikimumo intervalu (EC direktyvos, 2005). Tačiau antikūnų nustatymas kraujo serume netinka detaliam sukėlėjo identifikacijai, tam naudojami molekuliniai metodai.

Literatūra

- Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*. 2000. Vol. 74. P. 3–13.
- De Marco M. A., Foni G. E., Campitelli L., Raffini E., Di Trani L., Delogu M., Guberti V., Barigazzi G., Donatelli I. Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993–99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases*. 2003. Vol. 47. P. 861–866.
- Easterday B. C., Hinshaw V. S., Halvorson D. A. Influenza. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, Barnes H. J., Beard C. W., McDougald L. R., Saif Y. M. Iowa State University Press, Ames, I A. 1997. P. 583–605.
- EC Council Directive 2005/94/EC of 20 December 2005 on Community measures for the control of Avian influenza and repealing Directive 92/40/EEC. OJL 10, 14. 10. 2005, p. 16.
- EFSA Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. (question N° EFSA-Q-2003-093) adopted on 15 June 2004.
2006. – [žiūrėta 2006. kovo mėn. 3 d.] – Internetė: <http://www.efsa.eu.int/science>
- Elbers A. R. W., Fabri T. H. F., de Vries T. S., de Wit J. J., Pijpers A., Koch G. The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in the Netherlands in 2003-lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Diseases*. 2004. Vol. 48. P. 691–705.
- Food and Agriculture organization of the United nations (FAO), 2006. – [žiūrėta 2006. kovo mėn. 3 d.] – Internetė: <http://www.fao.org>.
- Fouchier R. A. M., Olsen B., Bestebroer T. M., Herfst S., van der Kemp L., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D. M. E. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. *Avian Diseases*. 2003. Vol. 47. P. 857–860.
- Fouchier R. A. M., Schneeberger P. M., Rozendaal F. M., Broekman J. M., Kemink S. A. G., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G. F., Schutten M., van Doornum G. J. J., Koch G., Bosman A., Koopmans M., Osterhaus A. D. M. E. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2004. Vol. 101. P. 1356–1361.
- Jackwood D. J., Sommer S. E., Odor E. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*. 1999. V. 43 (2). P. 189–197.
- Kaženiauskas E. A., Užkrečiamos paukščių ligos. Kaunas, VŠĮ „Terra Publica“, 2005. P. 33–36.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004. Chapter 2.7.12.
- Perkins L. E. L., Swayne D. E. Pathogenicity of a Hong Kong-Origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. // *Avian diseases*. 2002. Vol. 46. P. 53–63.
- Sala G., Cordioli P., Moreno-Martin A., Tollis M., Brocchi E., Piccirillo A., Lavazza A. Elisa test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera. // *Avian Diseases*. 2003. Vol. 47. P. 1057–1059.
- Seo S. H., Webster R. G. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *Journal of Virology*. Vol. 2001. 75. P. 2516–2525.
- Swayne D. E., Suarez D. L. Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique-office International des Epizooties*. 2000. Vol. 19. P. 463–482.
- The Office International des Epizooties (OIE). OIE daily update on avian influenza situation in birds, 2006. – [žiūrėta 2006. kovo mėn. 3 d.] – Internetė: <http://www.oie.int>
- Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьёв Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. Москва, ВНИТИБП, 1998. С. 324–338.