

На правах рукописи

АЛТУНИН Дмитрий Александрович

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО
ГРИППА ПТИЦ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ В 2014-2017 гг.**

06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Владимир 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Научный руководитель:

ИРЗА Виктор Николаевич
доктор ветеринарных наук

Официальные оппоненты:

Смоленский Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры зоогигиены и птицеводства им. А.К. Даниловой ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина

Джавадов Эдуард Джавадович, доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, директор научно-исследовательского консультативно-диагностического центра по птицеводству ФГБОУ ВО «СПбГАВМ», профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, заслуженный деятель науки РФ

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ ВГНКИ), г. Москва

Защита состоится 10 декабря 2019г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г.Владимир, мкр. Юрьевец). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2019г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова
Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Вирус гриппа А птиц (ВГП) наносит значительный экономический ущерб птицеводству и может представлять угрозу здоровью человека (D.J. Alexander, 2000; T. Horimoto, 2001).

Текущая глобальная эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц (ВПП) характеризуется разнообразием вариантов возбудителя подтипа H5 и его генетических линий. Вирусы ВПП H5Nx евразийской генетической линии (клады) 2.3.2.1 и 2.3.4.4 вызывали в 2014-2017 гг. вспышки болезни и/или были обнаружены у диких птиц во многих странах Азии, Европы и Америки [OFFLU, www.offlu.net]. По данным Всемирной организации охраны здоровья животных (МЭБ) ВПП в 2016-2017гг. нотифицировали более 50 стран [www.oie.int/wahis]. Значительное географическое распространение и множество вспышек болезни, разнообразие штаммов вируса, циркулирующих одновременно в настоящее время, дают основания прогнозировать дальнейшее ухудшение эпизоотической ситуации. Вирус ВПП H5N1 азиатского происхождения в настоящее время реже становится причиной вспышек ВПП по сравнению с вирусом H5N8, но его продолжают выявлять в странах Африки, Центральной и Юго-Восточной Азии. В Российской Федерации последние случаи вспышек болезни, вызванной вирусом H5N1, зарегистрированы в 2014-2015 гг., но с 2014 г. были выявлены вирусы H5N2, H5N6 и H5N8.

Миграционные процессы у диких птиц являются одним из ключевых факторов распространения болезни (Д.К. Львов, 1979). Первое и единственное обнаружение вируса ВПП H5N8 (клада 2.3.4.4a) у отстреленной свиязи в Якутии в сентябре 2014г. не сопровождалось в России последующими случаями болезни ни у домашних, ни у диких птиц, в отличие от многих стран, пострадавших от данного вируса в 2014-2015 гг. В июне 2016 г. в окрестностях озера Убсу-Нур в Республике Тува в пробах от павших и отстреленных птиц разных видов (серые цапли, крачки, чомги, чайки, бакланы) был выявлен вирус ВПП H5N8 (клада 2.3.4.4b). В предыдущие годы в популяциях диких водоплавающих птиц на озере Убсу-Нур обнаруживали вирус ВПП H5N1, относящийся к клладам: 2.2 (2006г.); 2.3.2 (2009-2010 гг.); 2.3.2.1.c (2015г.).

В ноябре-декабре 2016 г. этот новый вирус H5N8 вызвал несколько вспышек болезни у домашних и диких птиц на юге России и Северном Прикаспье, а в 2017 г.

распространился в ряд регионов европейской части страны. В 2017 г. установлен факт реассортации вируса со сменой нейраминидазы: в Костромской области вспышку болезни на птицефабрике вызвал вирус H5N2, относящийся к той же кладе 2.3.4.4, группа В.

В связи с этим мониторинг гриппа среди диких и домашних птиц и исследование биологических свойств вновь выделенных вирусов ВПГП позволяет актуализировать наши знания об эволюции возбудителя, оценить механизмы возникновения и распространения его новых вариантов, что дает возможность прогнозирования эпизоотической ситуации и принятия своевременных мер по контролю над заболеванием.

1.2 Степень разработанности проблемы. Изучению вирусов гриппа птиц посвящено огромное количество научных публикаций. Это обусловлено глобальным распространением вирусов ВПГП, прежде всего, подтипа H5. Особый интерес и озабоченность ученых всего мира вызывает пандемический потенциал, имеющийся у некоторых вирусов гриппа птиц подтипов H5 и H7. Эволюция возбудителя протекает столь быстро, что от одного предшественника - вируса H5N1, впервые изолированного в Китае в 1996 г., к настоящему времени произошли вирусы не менее чем 10 генетических линий, которые, в свою очередь, подразделяются на множество сублиний (клад и групп). Генетическая изменчивость влечет за собой антигенную вариабельность вирусов гриппа птиц и изменения биологических свойств. Методы диагностических исследований, в частности, вирусологических, являются традиционными. Они подробно описаны в Руководстве МЭБ по вакцинам и диагностическим тестам. Однако необходимость постоянного изучения вновь выявленных изолятов вируса ВПГП для своевременного анализа риска и оценки эффективности вакцин продиктована перманентной угрозой промышленному птицеводству страны.

1.3 Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение биологических свойств российских изолятов вируса гриппа птиц H5N1и H5N8, полученных в РФ в 2014-2017 гг. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- получить изоляты вируса ВПГП из проб биоматериала от домашних и диких птиц;
- установить типовую специфичность полученных изолятов;

- определить инфекционную активность изолятов титрованием в развивающихся куриных эмбрионах (СПФ-РКЭ);
- изучить патогенные свойства изолятов ВПГП H5N1, H5N2 и H5N8 при экспериментальном заражении цыплят, утят и индюшат, охарактеризовать клиническую и патологоанатомическую картину болезни у разных видов домашних птиц;
- провести депонирование некоторых изолятов вируса ВПГП в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»;
- изучить протективные свойства серийно выпускаемых в РФ вакцин в отношении новых изолятов вируса.

1.4 Научная новизна исследований.

1. Получены современные данные о биологических свойствах 9 изолятов ВГП с разными антигенными формулами, относящихся к разным генетическим линиям. Все изоляты являются высоковирулентными для домашних птиц, что подтверждено экспериментально. Вирусы ВПГП H5N8, широко распространившиеся на территории РФ в 2016-2017 гг., также как и вирус ВПГП H5N2, вызвавший локальные вспышки, обладают более выраженными патогенными свойствами и вызывают болезнь с менее продолжительным инкубационным периодом по сравнению с вирусами, изолированными в 2014-2015 гг.

2. Показана эффективность существующих в РФ вакцин в отношении изученных изолятов ВПГП H5N1 и H5N8.

1.5 Теоретическая и практическая значимость исследований.

1. Разработаны, одобрены Ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие документы:

- «Методические рекомендации по выделению вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни в развивающихся куриных эмбрионах»;
- «Методические рекомендации по выявлению генома вируса гриппа птиц подтипа H9 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени»;
- «Методические рекомендации по получению рибонуклеопротеина вируса гриппа птиц и поликлональных антител».

2. Данные о биологических свойствах штаммов вируса гриппа А, полученных в 2014-2017 гг., включая информацию о сравнительном изучении патогенности для разных видов домашних птиц с описанием клинических признаков и

патологоанатомических изменений, могут быть полезными для ветеринарных специалистов государственной ветеринарной службы и птицеводческих хозяйств.

3. Результаты проведенных исследований послужили основой для составления Стандартов ФГБУ «ВНИИЗЖ» на депонированные в Коллекцию учреждения штаммы вируса ВПП.

4. Полученные в ходе выполнения работы штаммы вируса гриппа А можно использовать в качестве диагностических и вакцинных антигенов и получения диагностических сывороток к ним.

5. Получен патент № 2 647 566 – 2018 на изобретение «Штамм A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 вируса гриппа птиц Influenza virus avicum типа А подтипа H5 для контроля антигенной и иммуногенной активности вакцин против гриппа птиц и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5».

1.6 Методология и методы исследований. При выполнении работы были освоены методы вирусологических исследований: получение вирусосодержащей суспензии из проб патологического материала, заражение РКЭ, культивирование и оценка инфекционного титра вируса; серологические методы (РГА, РТГА, РДП, и РТНА); заражение восприимчивых птиц с учетом патогенного действия вируса, определение индекса внутривенной патогенности на 6-нед. цыплятах; физико-химические (составление растворов заданной молярности и оценка pH); обработка экспериментальных данных биостатистическими методами.

1.7 Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения биологических свойств российских изолятов вируса гриппа А H5N1, H5N2 и H5N8, полученных в 2014-2017 гг.

2. Протективный потенциал вакцин в отношении изолятов вируса гриппа А птиц H5N1 и H5N8.

1.8 Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Автор выражает искреннюю благодарность за практическую и консультативную помощь при выполнении диссертационной работы, которую оказывали к.в.н. Чвала И.А., к.б.н. Сосипаторова В.Ю. к.б.н. Андриясов А.В., к.б.н. Зиняков Н.Г., к.б.н. Андрейчук Д.Б., д.б.н. Мудрак Н.С., к.б.н. Циванюк М.А., а также сотрудники референтной лаборатории вирусных болезней птиц, лаборатории эпизоотологии и мониторинга и лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ

«ВНИИЗЖ». Отдельная благодарность научному руководителю - доктору ветеринарных наук Ирзе Виктору Николаевичу, за неоценимую помощь.

1.9 Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность экспериментальных данных подтверждена соответствующими статистическими критериями и комиссионными испытаниями. Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2015-2017гг.), Международной научно-практической конференции молодых ученых "Достижения молодых ученых в ветеринарную практику" (г. Владимир, 2016 г.).

1.10 Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В диссертации представлены результаты исследований биологических свойств изолятов вируса ВГП, что соответствует 1, 2, 4, 5, 8, 9 пунктам паспорта специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

1.11 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение (выводы), практические предложения, список литературы и приложения. Список литературы состоит из 256 источников, в том числе 229 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 12 рисунками и дополнена приложенной аннотацией документов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2014-2017 гг. Исследования проведены по методам, рекомендованным МЭБ (МЭБ, 2015). Эксперименты с птицей проводили в лабораторно-виварном комплексе ФГБУ «ВНИИЗЖ» в изолирующих боксах, соответствующих уровню биологической безопасности BSL3, с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755), и международных требований по гуманному обращению с животными.

Мониторинг гриппа А птиц осуществляли силами сотрудников ФГБУ «ВНИИЗЖ» и специалистов региональных управлений ветеринарии и Россельхознадзора на территории ряда субъектов РФ. Сбор биоматериала проводили

путем отстрела диких птиц или от обнаруженных павших птиц. От домашних птиц материал поступал во время вспышек болезни. Биологический материал от птиц был представлен клоакальными смывами, фрагментами кишечника и других внутренних органов, или трупами птиц. Выделение вируса гриппа проводили в 9-11-сут. СПФ-РКЭ компании «Valo» (Германия). Изоляты типировали серологическими (РТГА и РТНА) и молекулярно-биологическими (ПЦР и ПЦР-ОТ) методами (МЭБ, 2015).

При постановке РТГА и РТНА использовали панель референс-антисывороток и антигенов Института зоопрофилактики (IZSVe, Италия). Определение подтипа вируса методом ПЦР осуществляли с помощью подтипоспецифичных праймеров (E. Spackman, 2014) и в соответствии с протоколами производителей соответствующих наборов.

Патогенность изолятов изучали на 3-6-нед. цыплятах, индюшатах и утятах. Индекс патогенности - IVPI (Intravenous pathogenicity index), определяли на 6-нед.

цыплятах и вычисляли по формуле: $IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \cdot 1 + TB_i \cdot 2 + P_i \cdot 3)}{10 \cdot N}$, где B_i – количество

больных в сутки i ; TB_i – количество тяжелобольных в сутки i ; P_i – количество погибших в сутки i ; N – общее количество птиц в эксперименте. При значении $IVPI \geq 1,2$ штамм считали высокопатогенным.

Вирусы: A/duck/Altai/469/14 H5N1; A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1; A/grebe/Tyva/356/15 H5N1; A/swan/Chita/850/15 H5N1; A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8; A/swan/Voronezh/2/17 H5N8; A/swan/Krasnodar/44/17 H5N8; A/chicken/Chechnya/58/17 H5N8; A/chicken/Moscow/94/17 H5N8; A/chicken/Kostroma/3177/17 H5N2.

Для определения индекса патогенности использовали изоляты, полученные в 2014-2017 гг. Для экспериментального заражения птиц разных видов использовали вирусы ВПП А/duck/Altai/469/14 H5N1, А/pelican/Astrakhan/272/2015 H5N1 и А/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 в дозе 10^6 ЭИД₅₀/0,5 см³.

Контаминацию вирусосодержащего материала чужеродными вирусами исключали методами вирусовыделения на СПФ-РКЭ и ПЦР, бактериальной и грибной микрофлорой - в соответствии с ГОСТ 28085.

Вакцины: - вакцина «РОКРОВ ВЮ Грипп птиц», Покровский завод биопрепаратов, серия 12, дата изготовления – 10.2016 г.;

- вакцина «ФЛУ Протект Н5», Ставропольская биофабрика, серия №13, дата выпуска – 01.2017 г. Обе вакцины изготовлены на основе эпизоотического штамма вируса H5N1, выделенного в 2005г.

Лабораторные животные. Цыплята яичного кросса «Хайсекс белый», «Хайсекс коричневый», утята кросса «Благоварский», индюшата кросса «Бигб» в возрасте от 20 до 45 суток.

Статистическая обработка данных. Использовали общепринятые методы обработки выборок варьирующих переменных: вычисления средних значений, стандартных ошибок ($\pm m$), сравнение средних с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Получение изолятов вируса ВГП из проб биоматериала от домашних и диких птиц

За период с 01.09.2014 г. по 31.12.2017 г. было исследовано 3136 проб, из них 2728 проб от диких и 408 проб от домашних видов птиц (табл. 1). Вирусовыделением исследовали все пробы от диких птиц, от домашних птиц в работу брали только пробы, в которых был выявлен геном ВГП при молекулярно-генетических исследованиях

Таблица 1 - Количество проб патологического материала и изолятов вируса ВГП, полученных в 2014-2017 гг.

| Год | Дикие птицы | | Домашние птицы | |
|--------|-----------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | Количество проб | Получено изолятов ВГП | Кол-во проб, положительных в ОТ-ПЦР | Получено изолятов ВГП |
| 2014 | 423 | 0 | 4 | 4 |
| 2015 | 948 | 7 | - | - |
| 2016 | 532 | 8 | 16 | 10 |
| 2017 | 825 | 19 | 388 | 41 |
| Всего: | 2728 | 34 | 408 | 55 |

Всего было получено 89 изолятов вируса ВГП, при этом от диких видов птиц - 34 изолята, а от домашних - 55 изолятов. Пробы патологического материала, из которых был выделен вирус гриппа А птиц, поступили для исследований из 17 регионов РФ (6 федеральных округов). Наибольшее количество изолятов получено из проб, поступивших из Центрального федерального округа в первой половине 2017

года. Вирус изолировали в 30 случаях, из них 17- в Московской области, 12 – в Воронежской области и 1 – в Костромской обл. Вирус гриппа был выделен от птиц-представителей 9 отрядов, 13 семейств и 17 родов. От домашних птиц вирус чаще всего выделяли от кур (34 изолята) и индеек (8 изолятов), а также от гусей (4 изолята) и уток (3 изолята). Среди диких птиц наибольшее число случаев выделения вируса отмечено у лебедей (10 изолятов) и цапель (4 изолята), а также от уток, чомг и чаек (по 3 изолята). Вирус также обнаруживали в пробах от синантропных птиц: сороки и воробья (по 1 изоляту).

2.2.2 Определение инфекционной активности изолятов ВГП титрованием в СПФ-РКЭ

Из исследуемого вирусосодержащего материала готовили ряд десятикратных последовательных разведений (от 10^{-1} до 10^{-10}) и каждое разведение вируса инокулировали в аллантоисную полость четырех 9-11 сут. СПФ-РКЭ в объеме 0,2 см³. Специфичность гибели эмбрионов подтверждали в РГА. Установлено, что изоляты ВГП способны стабильно репродуцироваться в РКЭ в довольно высоких титрах. Титры инфекционной активности 9 изолятов, определенные по методу Кербера и выраженные в единицах ЭИД_{50/см³}, исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Инфекционная активность изолятов ВГП, полученных в 2014-2017 гг.

| Название изолята | Титр вируса, lg ЭИД _{50/см³} (n=3) |
|---------------------------------|--|
| A/duck/Altai/469/14 H5N1 | 8,58±0,14* |
| A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1 | 9,17±0,29* |
| A/grebe/Tyva/356/15 H5N1 | 8,83±0,14* |
| A/swan/Chita/850/15 H5N1 | 9,17±0,14* |
| A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 | 8,42±0,14* |
| A/swan/Voronezh/2/17 H5N8 | 8,5±0,25* |
| A/swan/Krasnodar/44/17 H5N8 | 8,58±0,14* |
| A/chicken/Chechnya/58/17 H5N8 | 8,67±0,14* |
| A/chicken/Moscow/94/17 H5N8 | 8,75±0,25* |

2.2.3 Определение типовой специфичности по гемагглютинирующему агенту изолятов ВГП, полученных в 2014-2017 гг.

В случае обнаружения гемагглютинирующего агента при исследовании проб вирусомыделением проводили его идентификацию в РТГА. Изоляты ВГП 2014-2017 гг. взаимодействовали только с антисывороткой подтипа H5N1. Отмечено, что изоляты с подтипом нейраминидазы N1 взаимодействовали с антисывороткой лучше, чем изоляты с подтипами N2 и N8 (табл.4).

Таблица 3 - Результаты определения в РТГА типовой специфичности по НА изолятов ВГП, полученных в 2014-2017 гг.

| Исследуемый изолят | Титр в РГА, log ₂ | Титр в РТГА, log ₂ |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| A/duck/Altai/469/14 H5N1 | 8,58±0,14* | 8,58±0,14* |
| A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1 | 9,17±0,29* | 9,17±0,29* |
| A/grebe/Tyva/356/15 H5N1 | 8,83±0,14* | 8,83±0,14* |
| A/swan/Chita/850/15 H5N1 | 9,17±0,14* | 9,17±0,14* |
| A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 | 8,42±0,14* | 8,42±0,14* |
| A/swan/Voronezh/2/17 H5N8 | 8,5±0,25* | 8,5±0,25* |
| A/swan/Krasnodar/44/17 H5N8 | 8,58±0,14* | 8,58±0,14* |
| A/chicken/Chechnya/58/17 H5N8 | 8,67±0,14* | 8,67±0,14* |
| A/chicken/Moscow/94/17 H5N8 | 8,75±0,25* | 8,75±0,25* |
| A/chicken/Kostroma/3177/17 H5N2 | 8,58±0,14* | 8,58±0,14* |

2.2.4 Определение типовой специфичности изолятов ВГП по нейраминидазе

Определение типовой специфичности по нейраминидазе стало особенно актуальным в последние годы ввиду появления большого количества новых реассортантов с различными типами нейраминидазы. В табл. 4 представлены подтипы антисывороток ВГП, которые подавляли нейраминидазную активность исследуемых изолятов. Следует отметить, что в 2014-15 гг. зафиксированы случаи выделения вируса ВГП H5 только с подтипом N1, а в 2016-17 гг. - с подтипами N2 и N8.

Таблица 4 - Результаты определения типовой специфичности по нейраминидазе изолятов ВГП, выделенных в 2014-2017 гг.

| Исследуемый изолят | Подтип антисыворотки ВГП/А |
|---------------------------------|----------------------------|
| A/duck/Altai/469/14 H5N1 | H1N1 («IZSVe», Италия) |
| A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1 | H1N1 («IZSVe», Италия) |
| A/grebe/Tyva/356/15 H5N1 | H1N1 («IZSVe», Италия) |
| A/swan/Chita/850/15 H5N1 | H1N1 («IZSVe», Италия) |
| A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 | H4N8, IZSVe (Италия) |
| A/swan/Voronezh/2/17 H5N8 | H4N8, IZSVe (Италия) |
| A/swan/Krasnodar/44/17 H5N8 | H4N8, IZSVe (Италия) |
| A/chicken/Chechnya/58/17 H5N8 | H4N8, IZSVe (Италия) |
| A/chicken/Moscow/94/17 H5N8 | H4N8, IZSVe (Италия) |
| A/chicken/Kostroma/3177/17 H5N2 | H9N2, IZSVe (Италия) |

Определение типовой специфичности по нейраминидазе стало особенно актуальным в последние годы ввиду появления большого количества новых реассортантов с различными типами нейраминидазы. В табл. 4 представлены подтипы антисывороток ВГП, которые подавляли нейраминидазную активность исследуемых изолятов. Следует отметить, что в 2014-15 гг. зафиксированы случаи выделения вируса ВГП H5 только с подтипом N1, а в 2016-17 гг. - с подтипами N2 и N8.

2.2.5 Генетическая характеристика изолятов ВГП

Методами нуклеотидного секвенирования и филогенетического анализа исследовали 10 изолятов ВГП. Результаты исследований представлены в табл. 5.

Таблица 5 - Результаты генетических исследований и филогенетического анализа

| Название изолята | Генетическая линия | Клада | Сайт расщепления HA |
|---------------------------------|--------------------|---------|---------------------|
| A/duck/Altai/469/14 H5N1 | GS/GD/1/96* | 2.3.2.1 | -RERRRKR- |
| A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1 | GS/GD/1/96 | 2.3.2.1 | -RERRRKR- |
| A/grebe/Tyva/356/15 H5N1 | GS/GD/1/96 | 2.3.2.1 | -RERRRKR- |
| A/swan/Chita/850/15 H5N1 | GS/GD/1/96 | 2.3.2.1 | -RERRRKR- |
| A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -REKRRKR- |
| A/swan/Voronezh/2/17 H5N8 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -REKRRKR- |
| A/swan/Krasnodar/44/17 H5N8 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -KEKRRKR- |
| A/chicken/Chechnya/58/17 H5N8 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -REKRRKR- |
| A/chicken/Moscow/94/17 H5N8 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -REKRRKR- |
| A/chicken/Kostroma/3177/17 H5N2 | GS/GD/1/96 | 2.3.4.4 | -REKRRKR- |

Примечание: * - GS/GD/1/96 - A/goose/Guangdon/1/96

Установлено, что все изучаемые изоляты ВГП относятся к обширной линии штаммов A/goose/Guandon/1/96. Внутри этой генетической линии гемагглютинин изолятов подтипа H5N1 оказался наиболее близкородственным штаммам клады 2.3.2.1. При филогенетическом анализе изолятов подтипа H5N8 наиболее схожими оказались штаммы клады 2.3.4.4. Исследуемые изоляты содержали в сайте расщепления HA основные аминокислоты (аргинин (R) и лизин (K), наличие которых характеризует изоляты как высокопатогенные.

2.2.6 Изучение патогенных свойств ВГП при инфицировании кур

С целью изучения вирулентных свойств ВГП H5N1, H5N2 и H5N8 был проведен ряд опытов. При проведении эксперимента были сформированы группы из десяти 6-нед. серонегативных цыплят. Птиц заражали внутривенно вирусосодержащей ЭЭЖ, разведенной в соотношении 1:10 стерильным ФБР. Контрольную группу инокулировали стерильным ФБР. За птицами вели ежедневное наблюдение в течение 10 сут. Результаты опыта и полученные значения индекса представлены в табл. 6.

У изолятов вируса подтипа H5N1 значения IVPI были в пределах 2,65- 2,82, у изолятов H5N8 индексы имели значения 2,87-2,97, а у вируса H5N2 было получено максимальное значение – 3,0. На 1 сутки после заражения вирусом H5N2 все 10 голов пали без видимых клинических признаков. В группе птиц, зараженных изолятом A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8, на 1 сутки после заражения пали 8 голов без клинических признаков, оставшиеся птицы были сильно угнетены, цианоз кожных покровов наблюдали только у 1 птицы, на следующие сутки в данной группе пали все птицы. Похожую картину наблюдали в группе цыплят, зараженных вирусом A/goose/Kalmykia/813/16 H5N8: на 1 сутки пали 7 голов. В группах, зараженных вирусами H5N8, все птицы погибали в течение 3 суток.

В группах, зараженных вирусом подтипа H5N1, при внешнем осмотре признаки болезни отмечали уже в первый день после заражения: угнетение, отказ от корма и воды, взъерошенность оперения.

В дальнейшем - отсутствие реакции на внешние раздражители, затрудненное дыхание, хрипы, синюшность гребня, бородок и лап (рис. 1), диарею с фекалиями зеленого цвета. У некоторых птиц наблюдали нарушение координации движений, тремор, атаксию, искривление шеи, после чего птицы погибали. При

патологоанатомическом вскрытии павших птиц отмечали катаральное воспаление инфраорбитальных синусов, а также геморрагии в гортани и трахее.

Таблица 6 - Результаты наблюдений за экспериментально зараженной птицей и полученные индексы IVPI

| Исследуемый изолят | Клин. состояние птиц | Сутки после заражения | | | | IVPI |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|----|----|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4-10 | |
| A/duck/Altai/469/14 H5N1 | Здоровые | 5 | 0 | 0 | 0 | 2,65 |
| | Больные | 3 | 3 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 2 | 1 | 3 | 0 | |
| | Погибшие | 0 | 6 | 7 | 10 | |
| A/pelican/Astrakhan/272/15 H5N1 | Здоровые | 2 | 0 | 0 | 0 | 2,68 |
| | Больные | 6 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 2 | 9 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 0 | 1 | 10 | 10 | |
| A/grebe/Tyva/356/15 H5N1 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,82 |
| | Больные | 6 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 4 | 2 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 0 | 8 | 10 | 10 | |
| A/swan/Chita/850/15 H5N1 | Здоровые | 1 | 0 | 0 | 0 | 2,78 |
| | Больные | 4 | 1 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 5 | 4 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 0 | 5 | 10 | 10 | |
| A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,98 |
| | Больные | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 2 | 0 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 8 | 10 | 10 | 10 | |
| A/goose/Kalmikia/813/2016 H5N8 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,97 |
| | Больные | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 7 | 10 | 10 | 10 | |
| A/swan/Voronezh/2/2017 H5N8 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,89 |
| | Больные | 3 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 2 | 2 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 5 | 7 | 10 | 10 | |
| A/poultry/Chechnya/58/2017 H5N8 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,87 |
| | Больные | 5 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 3 | 9 | 10 | 10 | |
| A/chicken/Kostroma/3177/2017 H5N2 | Здоровые | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Больные | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Тяжелобольные | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | Погибшие | 10 | 10 | 10 | 10 | |

У некоторых птиц наблюдали скопление жидкости в ротовой полости и верхних дыхательных путях. Головной мозг был гиперемирован (рис. 2). В подкожной клетчатке в области головы, шеи и брюшной полости довольно часто регистрировали скопление жидкости соломенного цвета, данный признак свидетельствует о нарушениях функций органов кровообращения.

В подкожной клетчатке в области головы, шеи и брюшной полости довольно



Рис. 1 Выраженный цианоз лап у павшего цыпленка на 3 сутки после заражения



Рис. 2 Гиперемия сосудов головного мозга у павшего цыпленка на 2 сутки после заражения

часто регистрировали скопление жидкости соломенного цвета, данный признак свидетельствует о нарушениях функций органов кровообращения. Легкие были отечны и кровенаполнены, сосуды сердца гиперемированы. Застойную гиперемию регистрировали в печени, почках, брыжейке, селезенке, а также в серозной и слизистой оболочках кишечника. Желчный пузырь был переполнен и увеличен в размере. В железистом желудке отмечали кровоизлияния. Поджелудочная железа имела признаки воспаления, была пронизана точечными кровоизлияниями.

Таким образом, вирусы H5N8 и H5N2 вызвали у зараженных цыплят сверхострое течение болезни, инкубационный период составил менее 24 часов. В группах, зараженных вирусами H5N1 гибель всех цыплят регистрировали в течении 3 суток после заражения, эти данные позволяют сделать вывод об остром течении болезни. Данные клинического осмотра и патологоанатомического вскрытия свидетельствуют о генерализованной манифестной инфекции с вовлечением всех органов в инфекционный процесс.

2.2.7 Изучение патогенности изолятов ВГП при инфицировании утят

Уток обычно содержат на свободном выгуле, и они могут контактировать с дикими водоплавающими птицами, что повышает риск заражения домашней птицы. Для изучения инфекционного процесса интраназально заражали 3-х нед. мускусных уток. Сформировали 2 опытных группы по 10 утят: гр. №№ 1 и 3; 2 контактных - по 5 утят: гр. №№ 2 и 4, и контрольную - №5 из 4 утят. Группу №1 заразили изолятом A/duck/Altay/469/14 H5N1 (клада 2.3.2.1с) по 0,5 см³ в дозе 10⁶ Ig ЭИД₅₀/см³. Группу №3 аналогично заразили изолятом A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8 (клада 2.3.4.4а). Контактные группы птиц помещали к опытным через 1 сутки после заражения. Контрольную группу интраназально инокулировали стерильным ФБР. Первые клинические признаки болезни регистрировали на 2 сутки после заражения: угнетенное состояние, отказ от корма и воды, у нескольких утят тяжелое учащенное дыхание. На 3 сутки после заражения у всех птиц опытной группы помимо вышеуказанных признаков наблюдали тремор, ринит, цианоз лап и клюва. Также наблюдали признаки поражения центральной нервной системы: парез крыльев, манежные движения, широко расставленные лапы. Павшие птицы лежали с запрокинутыми головами. Начиная с 4 сут. после инфицирования наблюдали выраженный цианоз лап и клюва. В контактной группе клинические признаки проявились на 3 сутки эксперимента, все птицы пали в течение 6 дней (табл.7).

Таблица 7 - Учет клинического состояния 3-недельных утят после заражения изолятом A/duck/Altay/469/14 H5N1 (клада 2.3.2.1с)

| Группа | Клиническое состояние птиц | Сутки после заражения | | | | | | МТО ¹ | МДТ ² |
|---------------------|----------------------------|-----------------------|---|---|---|---|----|------------------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| № 1 (опытная) | Здоровые | 10 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,3 | 3,7 |
| | Больные | 0 | 5 | 4 | 3 | 2 | 0 | | |
| | Погибшие | 0 | 2 | 6 | 7 | 8 | 10 | | |
| № 2 (контактная) | Здоровые | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3,6 | 4,2 |
| | Больные | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 | | |
| | Погибшие | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 | | |

Примечания: ¹ – mean time of onset of signs (среднее время появления клинических признаков), ² – mean death times (среднее время гибели)

При патологоанатомическом вскрытии погибших утят наблюдали гиперемии сосудов головного мозга и кишечника, отек легких, гипертрофию и реномегалию почек, увеличение селезенки, в поджелудочной железе наблюдали множество

точечных кровоизлияний. При вскрытии мышечного желудка некоторых утят была обнаружена слизь.

Таким образом, среднее время появления клинических признаков при интраназальном заражением составило 2,3 дня, инкубационный период болезни составил не менее 48 часов. Все зараженные птицы погибли в течение 6 дн., среднее время гибели составило 3,7 дня. У утят, зараженных изолятом A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8, клинические признаки начали проявляться у нескольких птиц на 1 сутки после заражения (отказ от корма и воды, угнетение). На следующие сутки здоровой птицы не осталось, у утят регистрировали такие признаки, как тремор, атаксия, парез, свидетельствующие о поражении ЦНС, у некоторых птиц отмечали затрудненное дыхание и ринит. Цианоз клюва и лап не наблюдали. У большинства павших птиц голова была запрокинута. В контактной группе клинические признаки начали регистрировать на 3 день опыта, гибель утят происходила с 4 по 7 сутки эксперимента (табл. 8).

При вскрытии павших утят регистрировали увеличение почек, множественные точечные кровоизлияния в поджелудочной железе. Легкие кровенаполнены и отечны, наблюдали застойную гиперемии печени у некоторых павших утят. Желчный пузырь был переполнен и увеличен в объеме.

Таблица 8 - Результаты клинического состояния 3-недельных утят после заражения изолятом A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8 (клада 2.3.4.4а)

| Группа | Клиническое состояние птиц | Сутки после заражения | | | | | | | МТО ¹ | МДТ ₂ |
|------------------|----------------------------|-----------------------|---|---|---|---|---|----|------------------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| № 3 (опытная) | Здоровые | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,8 | 3,8 |
| | Больные | 0 | 8 | 6 | 3 | 2 | 1 | 0 | | |
| | Погибшие | 2 | 2 | 4 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| № 4 (контактная) | Здоровые | 5 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,4 | 5,6 |
| | Больные | 0 | 0 | 3 | 4 | 3 | 1 | 0 | | |
| | Погибшие | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 5 | | |

Примечания: ¹ – mean time of onset of signs (среднее время появления клинических признаков),
² – mean death times (среднее время гибели)

Таким образом, среднее время появления признаков составило 1,8 дня, инкубационный период болезни при интраназальном заражении утят составил около 24 часов. Вся птица погибла в течение 7 суток, а среднее время гибели составило 3,8 дня. При инфицировании утят изолятом ВГП A/duck/Altay/469/14 H5N1, начиная с 4

суток, наблюдали выраженный цианоз лап и клюва, чего не наблюдали при инфицировании утят изолятом A/wigeon/Sakha/1/14 H5N8.

2.2.8 Изучение патогенных свойств изолятов ВГП при инфицировании индюшат

Формировали 2 опытных группы по 10 индюшат и контрольную - 5 индюшат. Группу №№ 1 и 2 интраназально заразили изолятами ВГП A/duck/Altay/469/14 H5N1 (клада 2.3.2.1с) и A/goose/Kalmykia/813/17 H5N8 (клада 2.3.4.4b), соответственно, по 0,5 см³ в дозе 10⁶ lg ЭИД_{50/см³}. Группе контроля (№3) ввели интраназально стерильный ФБР в объеме 0,5 см³. Среднее время гибели проявления клинических признаков рассчитывали аналогично предыдущим экспериментам.

Результаты наблюдения за клиническим состоянием птиц представлены в табл. 9. Первые клинические признаки болезни в гр. № 1 наблюдали у половины птиц уже на 2 сутки после заражения (угнетение, отказ от корма и воды, взъерошенность оперенья, диарея). На 3 сутки после заражения здоровых птиц не наблюдали, описанные клинические признаки были более выраженными, также, у некоторых особей отмечали помутнение роговицы глаза, у павших птиц отмечали выраженный цианоз лап. При патологоанатомическом вскрытии павших птиц наблюдали гиперемию сосудов кишечника, точечные кровоизлияния в поджелудочной железе, легкие отечны и наполнены кровью, также отмечали гипертрофию и анемию селезенки и почек.

Таблица 9 - Результаты учета клинического состояния индюшат, зараженных вирусами гриппа А птиц

| Группа | Название изолята | Клиническое состояние птиц | Сутки после заражения | | | | | МТО ¹ | МДТ ² |
|--------|------------------|----------------------------|-----------------------|---|---|---|----|------------------|------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| № 1 | A/469/14 H5N1 | Здоровые | 10 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 3,9 |
| | | Больные | 0 | 5 | 8 | 1 | 0 | | |
| | | Погибшие | 0 | 0 | 2 | 9 | 10 | | |
| № 2 | A/813/17 H5N8 | Здоровые | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,1 | 3,7 |
| | | Больные | 0 | 9 | 7 | 3 | 0 | | |
| | | Погибшие | 0 | 1 | 3 | 7 | 10 | | |

Примечания: ¹ – mean time of onset of signs (среднее время появления клинических признаков),
² – mean death times (среднее время гибели)

Инкубационный период при инфицировании индюшат ВГП H5N1 составлял 24-48 часов, вся птица погибла в течение 5 сут. Среднее время появления клинических признаков составило 2,5, а гибели - 3,9 суток. В гр. № 2 клинические признаки (отказ

от корма и воды, угнетение, взъерошенность оперения, конъюнктивит, диарея) появились на 2 сутки после заражения. Через 3 сутки после заражения отмечали учащенное ротовое дыхание и признаки поражения ЦНС - искривление шеи и парезы.

При вскрытии павших птиц отмечали кровенаполненность легких, гиперемии сосудов кишечника, почек, точечные кровоизлияния в поджелудочной железе и селезенке. Инкубационный период составил не менее 24 часов, гибель всех птиц наблюдали в течение 5 суток. Среднее время появления признаков и гибели составили 2,1 и 3,1 сут., соответственно. В гр. № 1, начиная с 3 сут. после инфицирования, наблюдали цианоз лап, у птиц в гр. № 2 данный признак отсутствовал в течение опыта. Результаты показывают, что при инфицировании индюшат изолятом A/goose/Kalmykia/813/17 H5N8 гибель и появление клинических признаков происходили быстрее, чем при заражении изолятом A/duck/Altay/469/14 H5N1.

2.2.9 Изучение протективных свойств серийно выпускаемых вакцин в отношении вирусов H5N1 и H5N8, выделенных в РФ в 2015-2017 гг.

В связи с обострением ситуации по ВГП H5N8 в ФГБУ «ВНИИЗЖ» были проведены испытания протективных свойств отечественных инактивированных эмульсионных вакцин на основе эпизоотического штамма H5N1, полученного в 2005 г., в отношении вирусов гриппа птиц H5N8 и H5N1.

Сформировали 7 групп 1-мес. цыплят кросса «Хайсекс коричневый». 2 группы по 12 гол в каждой иммунизировали вакциной «POKROV BIO Грипп птиц»; 2 группы по 13 гол в каждой – вакциной «ФЛУ Протект H5». Вакцины вводили однократно внутримышечно в область груди в дозе 0,5 см³. 2 группы по 10 гол служили положительным контролем, и 1 группа (10 гол) оставалась интактной. Через 14 и 21 сутки после заражения были отобраны сыворотки крови для выявления антител к ВГП в РТГА и ИФА. Заражение высоковирулентными ВГП A/goose/Kalmykia/813/2016 H5N8 и A/pelican/Astrakhan/272/2015 H5N1 проводили через 21 сут. после вакцинации в дозе 10⁶ lg ЭИД₅₀/см³. Результаты наблюдений представлены в таблице 10. Учет патогенного действия вируса проводили по специфической гибели птиц и наличию клинических признаков инфекции. У вакцинированных птиц всех опытных групп, которые не погибли в течение 10 суток после заражения и были отнесены к категории «больные», отмечали угнетенное состояние, анорексию и взъерошенность оперения.

В контрольной группе кур, инфицированных вирусом ВПГП H5N1, первые клинические признаки заболевания регистрировали через 48 часов, первые случаи гибели птиц - через 72 часа, через 5 сут. пало 100 % птиц. Болезнь проявлялась сильным угнетением, отказом от корма и воды, атаксией, диареей, взъерошенностью оперения, цианозом гребня и сережек, выраженными подкожными кровоизлияниями на голени.

Таблица 10 - Учет клинического состояния цыплят после заражения вирусом ВПГП H5N1 и H5N8

| Вакцина | Кол. гол. | Вирус заражения | Сутки после заражения | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|-----------------|-----------------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------------|-------------|-------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| «РОК ROV BIO Грипп птиц» H5N1 | 12 | H5N1 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 11-3 1-Б | 10-3 2-Б | 10-3 2-Б | 10-3 1-Б 1-П | 10-3 1-Б | 10-3 1-Б | 10-3 1-Б |
| | 13 | H5N8 | 13-3 | 13-3 | 12-3 1-Б | 11-3 2-Б | 10-3 3-Б | 9-3 4-Б | 9-3 1-П 3-Б | 8-3 1-П 3-Б | 8-3 3-Б | 8-3 3-Б |
| «ФЛУ Протект H5» H5N1 | 12 | H5N1 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 | 12-3 |
| | 13 | H5N8 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 | 13-3 |
| Контроль | 10 | H5N1 | 10-3 | 10-Б | 10-Б | 6-П 4-Тб | 4-П | - | - | - | - | - |
| | 10 | H5N8 | 10-3 | 10-Б | 10-П | - | - | - | - | - | - | - |

Примечание: З - здоровые; Б – больные; Тб – тяжело больные; П – павшие

В контрольной группе кур, инфицированных вирусом ВПГП H5N8, наблюдали клинические признаки через 48 ч., через 72 ч. все птицы погибли. У зараженных птиц отмечали только угнетение, диарею, атаксию, взъерошенное оперение. Суммарная оценка протективных свойств испытанных препаратов приведена в табл. 11.

Таблица 11 - Протективный потенциал вакцин по результатам заражения птиц вирусами ВПГП H5N8 и H5N1

| Вакцина | Протективный уровень (%) | | | | | |
|----------------|--------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------|----------|------|
| | H5N8 | | H5N1 | | Контроль | |
| | От гибели | От клинического проявления | От гибели | От клинического проявления | H5N8 | H5N1 |
| ФЛУ Протект H5 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Покров BIO H5 | 84,6 | 61,5 | 91,7 | 83,3 | | |

В процессе эксперимента была изучена динамика формирования поствакцинального иммунитета. Средний титр антител в РТГА с набором ФГБУ «ВНИИЗЖ» (H5N1) составил у цыплят, привитых вакциной ФЛУ Протект Н5 через 21 сутки $8,26 \log_2$ (в диапазоне от 6 до $11 \log_2$), а в группе птиц, привитых вакциной Покров БИО Н5 - $5,2 \log_2$ (в диапазоне от 3 до $9 \log_2$). Результаты серологических исследований свидетельствуют о выраженной антигенной активности вакцин. При этом вакцина производства Ставропольской биофабрики обеспечила 100% защиту птиц при заражении как гомологичным, так и гетерологичным вирусом гриппа птиц.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Выводы

1. При исследовании 2728 проб биоматериала от диких и 408 проб от домашних птиц, поступивших в 2014-2017 гг., получено 89 изолятов ВГП, наибольшее количество обнаружений вируса отмечено во время эпизоотии в 2016-2017 гг. в регионах Южного и Центрального федеральных округов.

2. Титрованием в СПФ-РКЭ определена инфекционная активность 9 изолятов, которая составила от $8,42 \pm 0,14$ - $9,17 \pm 0,29$ ЭИД₅₀/см³.

3. С использованием панелей референтных антисывороток установлена типовая специфичность полученных 10 изолятов ВГП по гемагглютиниру и нейраминидазе, что также подтверждено методом ПЦР. По результатам филогенетического анализа вирусы отнесены к кладам 2.3.2.1 и 2.3.4.4.

4. Определены индексы внутривенной патогенности для 9 изолятов, которые охарактеризованы как высоковирулентные. Значения индекса составили от 2,65 до 3,0.

5. 9 изолятов вируса ВГП после подтверждения отсутствия их контаминации чужеродными агентами депонированы в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

6. Изучены патогенные свойства изолятов ВПГП H5N1, H5N2 и H5N8 при экспериментальном заражении цыплят, утят и индюшат. Установлено, что вирус H5N1 вызывает болезнь с острым течением и гибелью птиц через 3-4 суток, а для вируса H5N8 характерно сверхострое течение у кур и индеек, при котором клинические признаки в виде цианоза кожных покровов не всегда успевают

проявиться. Патологоанатомическая картина болезни у разных видов домашних птиц характеризуется генерализованной инфекцией с поражением всех органов и кровеносной системы.

7. Экспериментально показана эффективность серийно выпускаемых в РФ вакцин на основе штамма H5N1, полученного в 2005 г., в отношении новых изолятов вируса H5N1 и H5N8, циркулировавших на территории РФ в 2015-2016гг. При этом вакцина производства Ставропольской биофабрики обеспечила 100%-ю защиту птиц при заражении как гомологичным, так и гетерологичным вирусом гриппа птиц.

3.2 Перспективы дальнейшей разработки темы

Необходимо проведение активного мониторинга на территории РФ и всестороннее изучение вновь выделенных вирусов гриппа птиц для своевременного анализа риска. Для лучшего понимания инфекционного процесса необходимо дальнейшее изучение биологических свойств вирусов высокопатогенного гриппа птиц (H5N1, H5N2, H5N8) при заражении различных видов домашних птиц (курицы, утки, гуси, перепела, куропатки, индейки) разных возрастов.

4. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГП – вирус гриппа птиц

ВПГП – высокопатогенный грипп птиц

ИФА – иммуноферментный анализ

МЭБ – Всемирная организация охраны здоровья животных

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция

РГА – реакция гемагглютинации

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

РТНА – реакция торможения нейраминидазной активности

РДП – реакция диффузной преципитации

СПФ РКЭ – свободные от патогенной флоры развивающиеся куриные эмбрионы

ЭИД_{50/см³} – 50%-ная эмбриональная инфицирующая доза

ЭЭЖ – экстраэмбриональная жидкость

IVPI – внутривенный индекс патогенности

MDT – среднее время гибели

МТО – среднее время развития клинических признаков

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1 / В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, М.А. Циванюк, И.А. Чвала // Ветеринария сегодня. - 2016. - № 1. - С. 51-54.
2. Изучение инфекции у уток при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1 / В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, Ил.А. Чвала // Достижения молодых ученых в вет. практику: материалы 4-й Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию аспирантуры ФГБУ "ВНИИЗЖ". - Владимир, 2016. - С. 179-183.
3. Оптимизация условий получения рибонуклеопротеина вируса гриппа птиц / В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, М.А. Волкова, Ил.А. Чвала // Проблемы теории и практики соврем. вет. науки: сб. науч. тр. - Алматы, 2016. - Т. 62. - С. 160-165.
4. Особенности диагностики низкопатогенного гриппа птиц / Ил.А. Чвала, А.В. Шагурина, Д.А. Алтунин, А.В. Андриясов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - 2016. - Т. 14. - С. 101-106.
5. Результаты мониторинговых исследований по гриппу среди диких и синантропных птиц на территории Российской Федерации в 2015 году / М.А. Циванюк, В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - 2016. - Т. 14. - С. 107-118.
6. Выделение и изучение вируса гриппа птиц A/H5N1, вызвавшего вспышки болезни в Алтайском крае в 2014 г. / Ил.А. Чвала, А.В. Андриясов, Н.Г. Зиняков, Д.А. Алтунин [и др.] // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 1. - С. 23-29.
7. Протективные свойства отечественных серийных и экспериментальных вакцин в отношении вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипов H5N1 и H5N8, изолированных в 2015-2016 г. / В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин, С.В. Фролов, Д.А. Алтунин // Птица и птицепродукты. – 2017. - № 6. – С. 12-15.

Подписано в печать 07.10.2019 г.

Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»