

восток Тибета)] [3]. Консенсусные последовательности изолятов Qinghai исследуемого вируса ГП A/duck/Novosibirsk/2/2005 (H5N1) и других российских изолятов совпадают полностью. Отдельные изоляты (как китайские, так и российские) могут нести 1–2 аминокислотные и 2–3 нуклеотидные замены, причем для российских изолятов можно предполагать корреляцию наличия определенных замен с географическим местом выделения вируса.

Обращает внимание то, что озеро Qinghai расположено значительно западней районов Китая, где ВГП H5N1 регистрировался до этого. Можно предположить, что эта вспышка и случаи заболевания ВППП на юге Западной Сибири связаны с миграцией из Южного Китая диких перелетных водоплавающих птиц в северо-западном направлении по Центрально-Азиатскому миграционному пути, пересекающему Новосибирскую область. Анализ случаев заражения ГП домашней и дикой птицы в Новосибирской области показывает, что все населенные пункты, в которых ре-

гистрировались вспышки заболевания, находятся около водоемов, озер, водохранилищ, рядом с реками. Именно здесь происходила передача вируса от диких представителей околотовной фауны к домашним водоплавающим птицам.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что изученный изолят вируса гриппа птиц A/duck/Novosibirsk/2/2005 относится к подтипу H5N1, обладает структурой сайта разрезания PQGRERRRKKR*GLF и относится к единой генетической группе штаммов из юго-восточной части Азии. Определенная структура сайта разрезания белка гемагглютинаина позволяет нам предположить, что он относится к группе высокопатогенных штаммов вируса ГП. Однако, для постановки окончательного диагноза и определения биологических свойств изученного изолята вируса гриппа птиц необходимо проведение тестов на патогенность с использованием чувствительных систем.

РЕЗЮМЕ

При постановке ПЦР с последующим генетическим анализом нуклеотидных последовательностей фрагментов генов H5 и N1 было установлено, что исследуемый изолят вируса гриппа птиц обладает структурой сайта разрезания PQGRERRRKKR*GLF, характерной для вирусов высокопатогенного гриппа птиц, и относится к генетической группе штаммов вируса гриппа птиц из юго-восточной части Азии.

ABSTRACT

PCR with subsequent genetic analysis of H5 and N1 gene fragment nucleotide sequences showed that the examined isolate had the structure of the PQGRERRRKKR* cleavage site characteristic of highly pathogenic avian influenza viruses and belonged to genetic group of South-Eastern Asia influenza viruses.

Литература

1. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных. М.: ВНИИТиБП, 1998. С. 324–336.
2. D.J. Alexander. Orthomyxovirus infections // Virus infections of birds. Amsterdam etc., 1993. P. 287–316.
3. H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl // Nature. 2005. V. 436, № 7048. P. 191–192.
4. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 05.2005.
5. D.E. Swayne. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza viruses for chickens // Vet. Pathol. 1997. V. 34. P. 557–567.
6. D.E. Swayne, D.A. Halvorson. Influenza // Diseases of poultry. 11th ed. Ames, Iowa, 2003. P. 135–160.

УДК 619:578.832.1:636.5.004.12

И.А. Чвала, В.В. Дрыгин

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/DUCK/NOVOSIBIRSK/2/2005 H5N1

Введение

Высокопатогенный грипп птиц — острая контагиозная вирусная инфекция домашних и диких птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, множес-

твенными кровоизлияниями и поражением внутренних органов, мозга и кожи [2, 4, 6]. Гибель птицы, особенно молодняка, может достигать 100%. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий

вирус семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzaevirus, типа А.

В настоящее время грипп птиц (ГП) имеет широкое географическое распространение на Евразийском континенте [5]. На территории ряда субъектов Российской Федерации в 2005 г. выявлено заболевание, в связи с чем был наложен карантин на 62 населенных пункта с последующим уничтожением всего поголовья птицы [3]. В сложившейся ситуации своевременное выявление и идентификация возбудителя при вспышке ГП являются необходимым условием быстрого купирования и ликвидации заболевания. При этом основную роль при характеристике выделенного вируса играют тесты по определению патогенности с использованием чувствительных систем.

Также наряду с классическими методами успешно используется метод индикации и идентификации вируса на основе амплификации в ПЦР и определения первичной структуры фрагмента генома вируса, кодирующего сайт разрезания белка гемоглютинина. Это позволяет на основе первичной структуры сайта разрезания белка НА сделать предположение о степени вирулентности исследуемого штамма вируса [6].

Целью настоящей работы являлось определение биологических свойств полевого изолята вируса ГП A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1, выделенного в Новосибирской области в 2005 году.

Материалы и методы

Вирус. В работе был использован изолят вируса ГП A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1, выделенный от домашней утки в июле 2005 года в с. Копкуль Купинского района Новосибирской области.

Лабораторные животные. Интравенозный индекс патогенности (IVPI) определяли на 6-недельных цыплятах, не иммунных к ГП.

Выделение вируса. Вирусовыделение проводили согласно руководству МЭБ на 9–11-суточных куриных SPF-эмбрионах

(КЭ). 10% суспензию органов (головной мозг, легкие, трахея, селезенка, почки, печень) больной птицы вводили в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл/эмбрион. Заражали 10 эмбрионов, контролем служили 5 незараженных. КЭ, погибшие после 48 ч. инкубации и более, использовались для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований.

Определение индекса патогенности.

Для определения интравенозного индекса патогенности (IVPI) использовали общепринятую методику [6]. Исследуемую вирусосодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти 6-недельным SPF-цыплятам в дозе 0,1 мл. За птицами вели ежесуточное наблюдение в течение 10 дней и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 — здорова; 1 — больная (отмечены признаки развития заболевания, такие как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, отеки, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 — тяжелобольная (одновременно наблюдаются несколько ярких клинических признаков инфекции); 3 — птица мертва. Погибшие птицы получали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятого дня опыта. Интравенозный индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \times 1 + N B_i \times 2 + P_i \times 3)}{10 \times N}$$

где B_i — число больных в день i ; TB_i — число тяжелобольных в день i ; P_i — число павших на день i ; N — общее число птиц в эксперименте.

По результатам определения индекса интравенозной патогенности вирусы ГП делятся на высокопатогенные ($IVPI > 1,2$) и низкопатогенные ($IVPI < 1,2$).

РГА и РТГА. РГА и РТГА проводили по общепринятой методике с использованием панели специфических сывороток к виру-

Таблица 1

Результаты РТГА с экстраэмбриональной жидкостью

Специфические сыворотки	Исследуемая проба	Контроль + ¹	Контроль - ²
Грипп птиц подтип Н5	1:256	1:256	-
Грипп птиц подтип Н7	- ³	-	-
Грипп птиц подтип Н9	-	-	-
Ньюкаслская болезнь	-	-	-

Примечание: 1 — антиген ГП инактивированный диагностический подтипа H5N2; 2 — нормальная аллантоисная жидкость; 3 — реакции не выявлено

Результаты наблюдения за группой цыплят после заражения

Клиническое состояние	Дни наблюдения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Здоровые	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Больные	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Парализованные	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Мертвые	3	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Расчет: $IVPI = (3 \times 3 + 1 \times 2 + 6 \times 1 + 10 \times 3 \times 9) / 100 = 2,87$
су гриппа птиц подтипов H5, 7, 9 (Институт зоопрофилактики, г. Венеция, Италия) и ньюкаслской болезни (ФГУ «ВНИИЗЖ»).

Результаты и обсуждение

В июле 2005 года во ВНИИЗЖ был доставлен патологический материал (головной мозг, селезенка, печень, почки, трахея, легкие) от домашней утки в возрасте 1 мес. из Купинского района Новосибирской области. Основанием для отбора патологического материала послужило появление у птицы клинических признаков, характерных для ВПП, и массовый падеж домашних и диких птиц разных видов. У кур и индюков наблюдали в основном нервную клинику, которая проявлялась шейными параличами и парезами лап. У уток отмечали помутнение роговицы, параличи. Для заболевшей птицы всех видов характерна высокая температура тела, гибель наступает на 2–3 день после появления клинических признаков, случаев выздоровления не наблюдалось.

При патологоанатомическом вскрытии у курей отмечали многочисленные кровоизлияния во внутренних органах, в мышцах ног и груди, отек легких и подчелюстного пространства. Также наблюдали посинение гребня, сережек и лап, конъюнктивиты и риниты.

Для успешного вирусовыделения потребовался 1 пассаж на 9-суточных куриных SPF-эмбрионах. После 48 ч. инкубирования была зафиксирована 100% гибель зараженных КЭ. При вскрытии на тушках эмбрионов наблюдались многочисленные кровоизлияния, особенно интенсивные в области головы. Активность полученной ЭЭЖ составляла в РГА 1:256. Результаты постановки РТГА с ЭЭЖ, полученной после 1 пассажа на куриных эмбрионах, представлены в табл. 1.

Определение индекса интравенозной патогенности. Для определения IVPI использовали 10 цыплят. На первые сутки после внутривенного заражения пало 3 цыпленка, у оставшихся наблюдалось угнетение, отказ от корма и диарея, у одно-

го цыпленка также отмечен паралич лап. На 2 сутки пали остальные цыплята. Результаты представлены в табл. 2.

МЭБ в 1992 г. был принят ряд критериев, позволяющих определить степень патогенности вируса гриппа птиц, таких, как определение внутривенного (интравенозного) индекса на цыплятах, способность к росту на культуре клеток без добавления трипсина и определение первичной структуры сайта разрезания гемагглютинина. До настоящего момента все три критерия являются действительными, и среди ученых-вирусологов часто возникают дискуссии о целесообразности проведения трудоемких и порой несущих угрозу для здоровья исследователя опытов на животных. Однако исследования Senne D.E. и коллег показали, что в природе существуют изоляты вируса ГП с молекулярными характеристиками высокопатогенных штаммов, но при этом имеющих только остаточную вирулентность [7]. Поэтому решающую роль при изучении свойств вируса играют тесты с использованием чувствительных биосистем.

При изучении молекулярных основ патогенности вируса ГП было выяснено, что вирулентность коррелирует с первичной структурой сайта разрезания гемагглютинина. Предыдущие исследования показали, что первичная структура сайта разрезания белка НА изолята A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1 характерна для группы потенциально высокопатогенных штаммов вируса ГП. Также с помощью филогенетического анализа была определена генетическая группа выделенного изолята гриппа птиц [1]. Определенный нами индекс интравенозной патогенности (IVPI = 2,87) подтвердил эти предположения.

Выводы

В результате комплекса проведенных вирусологических исследований были определены биологические свойства вируса гриппа птиц A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H1N1, которые характеризуют данный изолят как высокопатогенный.

РЕЗЮМЕ

Из патологического материала от домашней утки, полученного при вспышке заболевания в Новосибирской области в 2005 г., был выделен полевой изолят вируса гриппа птиц. После 1 пассажа на куриных SPF-эмбрионах экстраэмбриональная жидкость (ЭЭЖ) имела в РГА активность 1:256, в РТГА взаимодействовала только со специфической сывороткой против вируса гриппа птиц подтипа H5. Гибель эмбрионов наступала через 48 часов после заражения. Индекс интравенозной патогенности был равен 2,87, что подтвердило высокую патогенность вируса.

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены биологические свойства выделенного изолята вируса гриппа птиц, и он был признан этиологическим агентом вспышки заболевания в данном регионе.

ABSTRACT

Field isolate of avian influenza (AI) virus has been recovered from the pathological material from a domestic duck, obtained from the outbreak in the Novosibirsk Oblast in 2005. After the 1st passage on SPF chicken embryos, extraembryo fluid activity in hemagglutination test was 1:256, and in hemagglutination inhibition test this fluid reacted only with the specific serum against AI virus subtype H5. Embryos died after 48 hours post inoculation. Intravenous pathogenicity index was 2.87, it proved that the virus was highly pathogenic. Thus, as a result of the examinations, biological properties of the recovered AI virus isolate were determined, and this isolate was identified as an etiological agent of the disease outbreak in this region.

Литература

1. А.В. Андриясов, Т.Б. Манин, И.П. Пчелкина и др. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса птичьего гриппа, выделенных на территории Российской Федерации и в Автономной Республике Крым в 2005 году // 2-й Международный вет. конгресс по птицеводству. М. 2006. С. 59–65.
2. В.Н. Сюрин, А.А. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных // М.: ВНИИТиБП, 1998. С. 233–238.
3. А.В. Фролов, А.В. Борисов, В.В. Борисов и др. Клинические признаки и патологоанатомические изменения при гриппе птиц в Российской Федерации в 2005 // 2-й Международный вет. конгресс по птицеводству. М. 2006. С. 36–38.
4. D.J. Alexander. Orthomyxovirus infections // Virus Infections of Birds — Amsterdam etc., 1993. P. 287–316.
5. H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl // Nature. 2005. V. 436. P. 191–192.
6. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 2005.
7. D.E. Senne, B. Panigrahy, Y. Kawaoka et al. Survey of the Hemagglutinin (HA) Cleavage Site Sequence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses: Amino Acid Sequence at the HA Cleavage Site as a Marker of Pathogenicity Potential // Avian Dis. 1996. V. 40. P. 425–437.

УДК 619:578.832.1:598.2:657.082.26.

**Н.Н. Луговская, М.А. Циванюк, С.В. Фролов,
Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, А.В. Борисов**

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H5 В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ДИКИХ И ДОМАШНИХ ПТИЦ

Введение

Грипп, или чума, птиц (ГП) — высококонтагиозное заболевание, поражающее птиц разных видов, вызывается вирусом типа А семейства *Orthomyxoviridae*. Вирус гриппа — оболочечный, на своей поверхности несет гликопротеины: гемогглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), которые отвечают за выработку вируснейтрализующих антител и определяют антигенную специфичность вируса. Вирусы гриппа типа А по структуре HA разделяются на 16 подтипов, по NA — на 9 подтипов [2, 3, 5],

наиболее опасные среди них вирусы подтипов H5 и H7. Вирусная оболочка включает слой мембранного, или матричного, белка (M), который является одним из основных структурных белков и составляет 35–45% от массы вириона. Сегментированный геном вируса, представляющий собой отрицательно заряженную одноцепочечную РНК, окружен нуклеокапсидной оболочкой, состоящей из нуклеопротеина (NP). Вирусные белки M и NP — высоко консервативные и являются типоспецифическими антигенами [3, 5].