

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.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных // М.: ВНИИТыБП, 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 (НА) и нейраминидазу (НА), которые отвечают за выработку вируснейтрализующих антител и определяют антигенную специфичность вируса. Вирусы гриппа типа А по структуре НА разделяются на 16 подтипов, по НА — на 9 подтипов [2, 3, 5],

наиболее опасные среди них вирусы подтипов H5 и H7. Вирусная оболочка включает слой мембранного, или матриксного, белка (М), 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 М и NP — высоко консервативные и являются типоспецифическими антигенами [3, 5].

Хозяином и естественным резервуаром для вируса служат дикие водоплавающие птицы, чаще всего, утки, но они и наиболее устойчивы к вирусу, в то время, как домашние птицы, включая кур, уток, индеек, особенно восприимчивы к данной инфекции [1]. Заболевание, вызванное вирулентными формами, наносит колоссальный экономический ущерб в промышленном птицеводстве, что подтверждают недавние эпизоотические вспышки «куриного гриппа» в Сибирском, Центральном и Южном регионах нашей страны. Появляются сообщения о новых очагах заболевания, как на территории Российской Федерации, так и дальнего, и ближнего зарубежья.

Вакцинация — один из важнейших элементов борьбы с высокопатогенными подтипами вируса гриппа птиц. Для иммунизации используют инактивированные вирусные или рекомбинантные вакцины, включающие ген гемагглютинина. Гемагглютинин — один из основных структурных белков вируса гриппа, который вызывает выработку вируснейтрализующих антител и принимает основное участие в формировании иммунитета у домашней птицы. Однако вакцины обеспечивали защиту у кур и индеек от заражения только гомологичным подтипом вируса гриппа птиц. При секвенировании наблюдали 87% гомологии в аминокислотной последовательности гена гемагглютинина между вакцинным и полевым вирусом. После однократной иммунизации вакцины обеспечивали защиту от заражения гомологичным вирусом гриппа более 20 недель [5].

В настоящее время в Центральном и Южном регионах проводится иммунизация домашних птиц, принадлежащих частным владельцам, эмульгированными вакцинами на основе инактивированного вируса гриппа подтипа H5.

В нашей работе мы использовали комплекс диагностических методов РДП, РТГА и ИФА для выявления антител к вирусу гриппа подтипа H5N1 в сыворотках крови диких и домашних птиц, не вакцинированных против гриппа, из разных регионов Российской Федерации, в том числе и неблагополучных по гриппу, а также иммунизированных препаратами инактивированной вакцины против вируса гриппа подтипа H5N1.

Материалы и методы

Референтные антигены и контрольные сыворотки. При проведении РТГА использовали антигены вируса гриппа типа А подтипов H5N2, H7N7, H9N2 (Инсти-

тут зоофилактики, г Венеция, Италия), H5N1 (ВНИИЗЖ) и специфические сыворотки к данным подтипам; при проведении РДП — антигены и сыворотки, полученные из Референтной лаборатории, г Вейбридж, Великобритания. В качестве отрицательной сыворотки использовали сыворотку крови от СПФ-цыплят.

Исследуемые сыворотки. Исследовали в РТГА и РДП более 450 сывороток крови домашних птиц: кур, уток, гусей, индеек, павлинов, голубей; диких птиц: уток, лебедей, гусей, чаек, крякв, куликов, красно-головых нырков, грачей, ворон, скворцов; в ИФА — около 3500 сывороток крови не вакцинированных против гриппа птиц кур, полученных из разных регионов Российской Федерации, в том числе Новосибирской, Астраханской, Курганской, Тюменской, Тульской, Нижегородской, Владимирской, Пермской, Самарской, Ивановской, Костромской, Орловской областей, Ставропольского края, Республики Калмыкия, Республики Дагестан, Хабаровского края и др.. В РТГА тестировали 234 сыворотки крови от птиц разных возрастов, иммунизированных инактивированной вакциной против гриппа птиц, из 5 групп. Группы включали кур, гусей, уток, индеек из частных хозяйств Южного и Центрального федеральных округов, вакцинированных препаратами инактивированной вакцины против гриппа подтипа H5N1. Вакцину вводили внутримышечно по 0,5 мл.

Перед исследованием в РТГА пробы прогревали при 56° С в течение 1 часа для инактивирования вируса ГП и термолабильных ингибиторов.

Реакция диффузной преципитации (РДП). Реакцию проводили в геле, приготовленном из 1% агарозы (Sigma, США), 8% NaCl и 0,1M фосфатно-буферного раствора, pH 7,2 (ФБР), согласно рекомендациям МЭБ [4]. В лунки диаметром 0,5 мм вносили по 50 мкл антигена и контрольных и испытуемых сывороток. Реакцию проводили во влажной камере в течение 24–48 часов при температуре 37° С. Результат считали положительным, если между лунками с антигеном и испытуемой сывороткой обнаруживали видимую полосу преципитации. При отсутствии полосы результат квалифицировали как отрицательный.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Реакцию проводили микрометодом в лунках 96-луночного круглодонного планшета для иммунологических исследований согласно рекомендациям МЭБ [4]. Титр антител более 1:8 считали положи-

тельным.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Сыворотки крови кур исследовали в ИФА с использованием коммерческого набора «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit» (Synbiotics, США) согласно наставлению по применению набора.

Результаты и обсуждение

За период с июля 2005 года по апрель 2006 года исследовали на наличие антител к вирусу гриппа типа А более 450 сывороток крови от диких и домашних птиц, около 3500 сывороток крови кур, поступивших из личных хозяйств и птицефабрик Российской Федерации и 234 пробы от вакцинированной птицы. Для этой цели были разработаны тест-системы на основе РДП, выявляющей антитела к типоспецифическим антигенам М и NP вируса гриппа, и РТГА для определения подтипа гемагглютинина, с использованием антигенов и сывороток, полученных из референтных лабораторий. В таблице 1 приведены данные по оценке специфичности использованных компонентов в РТГА и РДП и гетерологичных сывороток к антигенам вирусов ньюкаслской болезни (НБ), синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) и микоплазмы галлисептикум (МГ), обладающим гемагглютинирующей активностью. Как видно из таблицы 1 в РТГА дифференцировали антитела к разным подтипам вируса гриппа, в то время как в РДП выявляли антитела к вирусу гриппа всех трех подтипов с одинаковой чувствительностью.

Наивысшие титры в РТГА демонстрировали сыворотки к гомологичным по ге-

магглютинирующим антигенам, также наблюдали небольшую перекрестную реакцию с антигенами, принадлежащими к одному и тому же или близкому по структуре типу нейраминидазы. Гетерологичные сыворотки были отрицательными в обеих реакциях. Сыворотки кур также исследовали в ИФА с использованием набора «Avian Influenza Virus Antibody Test Kit» (Synbiotics, США). Достоверными считали лишь те результаты, которые совпадали в двух и более реакциях. Данные приведены в таблицах 2 и 3.

Как видно из таблицы 2 результаты РТГА, РДП и ИФА имели высокую степень корреляции. При исследовании 3500 сывороток крови не вакцинированных против гриппа птиц кур в ИФА в некоторых случаях получали положительные результаты, однако ни в одной пробе не были выявлены антитела к вирусу H5N1, который был выделен на территории РФ. Этот вирус являлся высокопатогенным для не вакцинированной домашней и промышленной птицы и вызывал гибель в течение 1-2 дней после заражения. В серологических реакциях антитела регистрировали лишь на 7 день.

В данном случае в ИФА обнаруживали антитела к другим слабопатогенным подтипам, так как данная тест-система позволяет выявлять типоспецифические антитела и не пригодна для дифференциации антител.

Дикие водоплавающие птицы более устойчивы к вирусу, что связано, видимо, с длительной персистенцией вируса в природе, часто заболевание протекает бессим-

Таблица 1

Исследование референтных и гетерологичных сывороток крови кур в РТГА с референтными антигенами вируса ГП

№ п/п	Сыворотки крови кур против	Титр в РТГА (\log_2) с антигеном вируса ГП подтипа							РДП
		H5N2	H5N3	H5N9	H7N1	H7N3	H7N7	H9N2	
1	H5N2	11	10	10	- ¹	-	-	6	+ ²
2	H5N3	11	12	12	3	7	-	-	+
3	H5N9	9	10	11	-	-	-	-	+
4	H7N1	4	-	4	11	9	10	-	+
5	H7N3	3	7	4	12	11	10	-	+
6	H7N7	3	4	5	11	9	10	-	+
7	H9N2	6	3	3	-	-	3	11	+
8	Вирус НБ	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Вирус ССЯ-76	-	-	-	-	-	-	-	-
10	МГ	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Сыворотка от СПФ-цыплят	-	-	-	-	-	-	-	-

1 — отрицательный результат; 2 — положительный результат

Сравнение результатов тестирования сывороток крови домашних и диких птиц на наличие антител к вирусу ГП птиц в серологических реакциях

№ п/п	Сыворотки	РДП	ИФА (куры)	РТГА (H5N2)
1	Дикие птицы (Омская обл.)	6/10 ¹	Н/н ²	7/10
2	Куры (Омская обл.)	0/128	0/128	0/128
3	Куры (Тюменская обл.)	0/20	5/20	0/20
4	Домашние утки (Тюменская обл.)	0/20	Н/н	19/20
5	Дикие утки (Тюменская обл.)	1/5	Н/н	1/5
6	Дикие лебеди (Калмыкия)	1/2	Н/н	1/2
7	Дикие утки (Челябинская обл.)	0/4	Н/н	0/4
8	Дикие лебеди (Астраханская обл.)	3/3	Н/н	2/3
9	Домашние утки, гуси, куры (Курганская обл.)	0/11	0/4	0/13
10	Домашние гуси и индейки (Тульская обл.)	0/11	Н/н	0/11

1 — количество положительных проб к общему количеству исследованных проб; 2 — не исследовали

Таблица 3

Исследование сывороток крови диких птиц из Омской, Астраханской, Тюменской областей и Республики Калмыкия

№ п/п	Сыворотки	РДП	Титр в РТГА (log ₂) с антигеном		
			H5N2	H7N3	H9N2
1	Кряква	+	5	2	-
2	Красноголовый нырок	-	-	-	-
3	Кряква	+	4	-	-
4	Красноголовый нырок	+	3	-	-
5	Чайка	+	3	-	-
6	Чайка	-	4	-	-
7	Кулик	-	-	-	-
8	Красноголовый нырок	-	-	-	-
9	Чайка	+	4	-	-
10	Кряква	+	4	-	-
11	Лебедь	+	-	-	-
12	Лебедь	+	9	-	-
13	Лебедь	+	8	-	-
14	Лебедь	-	-	-	-
15	Лебедь	+	8	-	-
16	Утка	+	5	-	-
17	Контрольная сыворотка	+	8	9	8

1 — положительный результат; 2 — отрицательный результат

птомно или требуется продолжительный инкубационный период, в течение которого вырабатываются специфические антитела. Результаты исследования в РДП и РТГА сывороток крови диких водоплавающих птиц показаны в таблице 3.

Все сыворотки, положительные, как в РТГА, так и в РДП, имели антитела к вирусу гриппа подтипа H5, в то время как в реакции с антигенами подтипов H7 и H9 были получены отрицательные результаты.

При исследовании сывороток крови кур, иммунизированных против гриппа

птиц подтипа H5 образцами инактивированной вакцины, в ИФА, РДП и РТГА также были получены результаты, хорошо согласующиеся между собой (Таблица 4). Через 18-20 дней после вакцинации средний уровень антител составлял в РТГА с антигеном H5N1 5,5 log₂, на 28-35-й день после вакцинации — 7,0 log₂, все пробы сывороток кур, положительные в РТГА также были положительны в РДП и ИФА.

Выводы

Таким образом, комплексное исследование сывороток крови от диких и домашних

Исследование сывороток крови домашних птиц, иммунизированных инактивированной вакциной против гриппа птиц подтипа H5

№ группы	Дни после вакцинации	Титр в РТГА (\log_2) с антигеном вируса ГП H5N1	ИФА Syn-biotics	РДП
1	35	7,1 (10/10 ¹)	10/10	10/10
2	35	8,9 (24/24)	н/и ²	н/и
3	28	6,0 (9/10)	9/10	9/10
4	18–20	5,5 (37/45)	н/и	н/и
5	28	8,0 (10/10)	10/10	10/10
Положительный контроль (H5N1)		9,0	1:6300	+ ³
Отрицательный контроль		- ⁴	-	-

1 — количество положительных проб к общему количеству проб; 2 — не исследовали; 3 — положительный результат; 4 — отрицательный результат

птиц в серологических реакция, таких как реакция торможения гемагглютинации, реакция диффузной преципитации и иммуноферментный анализ, позволяло получать достоверные результаты о наличии анти-тел к вирусу гриппа типа А подтипа H5 у диких птиц и определять уровень специфических антител у вакцинированных птиц.

РЕЗЮМЕ

Специфические антитела к высоковирулентному вирусу гриппа типа А подтипа H5 обнаруживали в сыворотках крови диких водоплавающих птиц при комплексном исследовании в серологических реакциях, в то время как в сыворотках крови кур не вакцинированных против гриппа не выявляли антитела к данному подтипу. После иммунизации домашних птиц инактивированной вакциной против гриппа птиц подтипа H5N1 специфические антитела регистрировали на 28–35 день в РТГА в титрах не ниже 7 \log_2 .

ABSTRACT

Specific antibodies to highly virulent avian influenza virus type A subtype H5 were detected in blood sera from wild waterfowl by serological tests during a complex study, while in blood sera from chickens non-vaccinated against avian influenza antibodies to that subtype were not detected. After immunization of poultry with inactivated H5N1 avian influenza vaccine specific antibodies were detected on day 28–35 using hemagglutination inhibition test at titres not less than 7 \log_2 .

Литература

- Лагуткин Н., Лутовинов В. Непредсказуемость гриппа // Птицеводство. 2001. № 6. С. 27–30.
- Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M. et al. Fouchier, R.A.M. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // Journal of Virology. 2005. Mar. P. 2814–2822.
- Hinshaw V.S., Shreerar M.G., Larsen D. Specific antibody responses and generation of antigenic variants in chickens immunized against a virulent avian influenza virus // Avian Disease. 1990. V. 34. P. 80–86.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) // OIE. Fifth Edition. 2004.
- Swayne D.E., Garcia M., Beck J.R., Kinney N., Suarez D.L. Protection against diverse highly pathogenic avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowl pox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert // Vaccine. 2000. V. 18. P. 1088–1095.

УДК 619:578.832.1:598.2:657.082.26

М.А. Циванюк, В.В. Дрыгин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК MDCK ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

Введение

Вирус гриппа птиц относится к семейству Orthomyxoviridae, который, в свою очередь, включает в себя вирусы гриппа типа А, В, С [1]. Вирус гриппа типа А разделяют на подтипы по строению поверхностных протеинов: гемагглютинина и нейра-

минидазы. Всего известно 16 гемагглютинирующих и 9 нейраминидазных подтипов, но из 135 пар комбинаций в природе встречаются только 46, и лишь 22–25 из них найдены у птиц [2].

Для диагностики гриппа птиц применяют методы выделения вируса и иден-