

УДК: 619:616.98:578.832.1А:598.252.1(477.72)

**МУЗИКА Д.В.**, д-р вет. наук, ст. наук. сп., email: dmuzyka77@gmail.com,  
**СТЕГНІЙ Б.Т.**, д-р вет. наук, проф., академік НААН,  
email: admin@vet.kharkov.ua,  
**РУЛА О.М.**, канд. вет. наук, email: aleksrula75@gmail.com,  
**ТКАЧЕНКО С.В.**, канд. вет. наук, email: semen270181@gmail.com  
*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»*  
**ПІЩАНСЬКИЙ О.В.**, email: dndildvse@vetlabresearch.gov.ua  
*Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи*  
**НАПНЕНКО О.О.**, канд. вет. наук, email: vetbiotk@i.ua  
*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів*

## БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ H7N3, ІЗОЛЬОВАНОГО ВІД ДИКИХ КАЧОК

*Наведено результати досліджень біологічних властивостей вірусу грипу птиці підтипу H7N3, який ізолювано від диких водоплавних крижнів в 2011 році. Встановлено здатність вірусу викликати утворення специфічних антитіл при щепленні інактивованим антигеном дослідних курей у суміші з ад'ювантом «Монтанід ISA-70» у співвідношенні 1:1 в титрі  $(4,7 \pm 1,3) \log_2$ . За результатами секвенування сайту розрізання гемаглютиніну EIPKGR/GLE даний ізолят віднесено до низькопатогенного. На основі отриманих результатів на цей штам вірусу отримано Деклараційний патент та він запропонований до подальшого використання в якості виробничого штаму для виробництва вакцин і тест-систем.*

**Ключові слова:** *низькопатогенний грип птиці, дикі птахи, епізоотологічний моніторинг.*

**Вступ.** На сьогоднішній день вірус грипу залишається непередбачуваною інфекцією для тварин, птиці та людей. Поява нових штамів та варіантів з новими властивостями та патогенністю до нових хазяїв потребує постійного спостереження та ретельного дослідження нових вірусів.

Особливе занепокоєння міжнародної спільноти викликає той факт, що деякі віруси високопатогенного та низькопатогенного грипу птиці підтипів H5 та H7, які характеризуються високою генетичною мінливістю, швидко мутують, здатні долати міжвидовий бар'єр та інфікувати інші види тварин, у тому числі й людину [1].

Протягом останніх п'яти років зареєстровані спалахи високопатогенного грипу серед сільськогосподарської птиці в США, Англії та Німеччині, які були викликані підтипом H7N8. Слід відмітити, що до 2013 року віруси низькопатогенного грипу підтипів H7N7, H7N2, H7N3, H7N8 викликали у людей слабкі та середньої тяжкості захворювання, але починаючи з 2013 року

вірус грипу з антигенною формулою H7N9, який не викликав захворювання у птиці, виявився надзвичайно патогенним для людей [2–4].

Тому ключовою ланкою у системі раннього попередження та організації заходів із запобігання поширенню даного захворювання є епізоотологічний моніторинг грипу в популяціях диких птахів, оскільки вся територія України знаходиться в межах головних шляхів міграції птахів, а особливо це стосується Азово-Чорноморське узбережжя, так як є однією з найбільш напружених в орнітологічному відношенні територій Східної Європи.

На рисунках 1 та 2 відмічені шляхів перельоту дикої птиці через територію нашої держави та місця скупчення диких птахів, а особливо навколводних в Азово-Чорноморському регіоні України підчас гніздування та зимування: фактично, весь південь України протягом усього року знаходиться в зоні підвищеного ризику поширення збудників інфекцій.

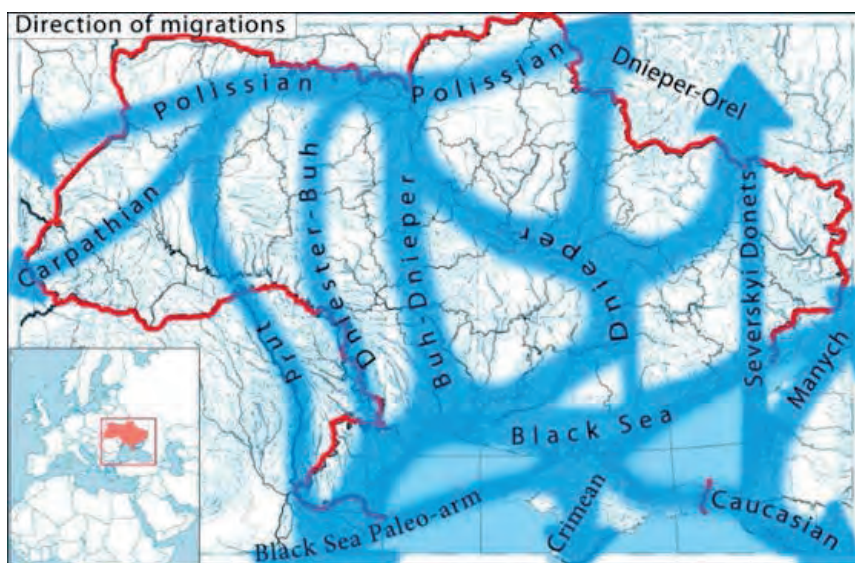


Рис. 1. Основні міграційні шляхи диких птахів в Україні.

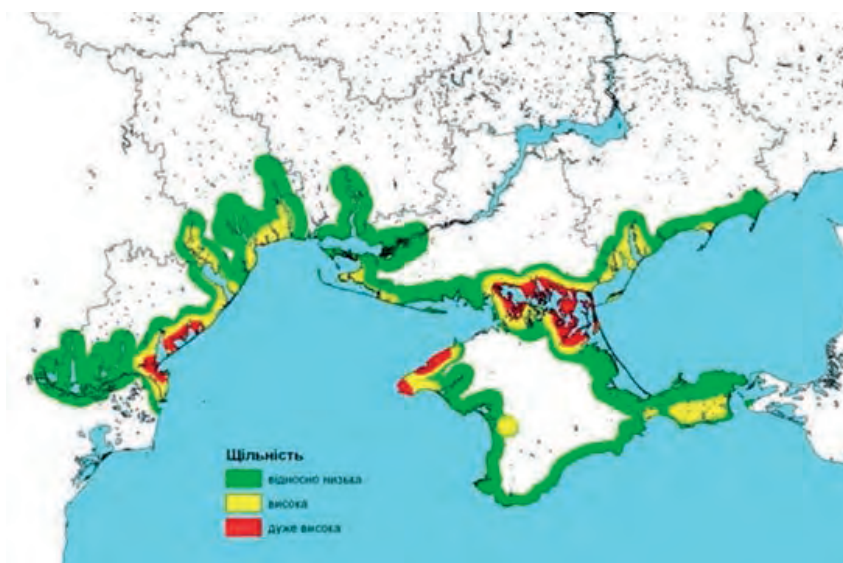


Рис. 2. Місця скупчення диких птахів в Азово-Чорноморському регіоні України.

У відділі з вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» завдяки багаторічним дослідженням створена Колекція вірусів-збудників інфекційних захворювань птиці, що ізолювані від сільськогосподарських, свійських та диких птахів, яка постійно поповнюється та підтримується.

**Метою наших досліджень** було вивчення біологічних властивостей низькопатогенного вірусу грипу птиці із 7 підтипом гемаглютиніну, який виділено від диких качок, встановити перспективність його подальшого використання в якості виробничого штаму для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів.

**Матеріали та методи досліджень.** У дослідженнях використано вірус грипу птиці А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011, який було ізолювано від диких качок. Вірус виділений та ідентифікований співробітниками ННЦ «ІЕКВМ» та зберігається в колекції штамів вірусів відділу з вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ». Усі роботи зі збудником проводили у спеціальних умовах, які виключали потрапляння збудника в навколишнє середовище.

Культивування вірусу, визначення біологічної та летальної активності вірусу (розраховували за Рідом і Менчем) проводили з використанням курячих ембріонів віком 9–11 діб згідно з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ). Гемаглютинуючу активність вірусу визначали в реакції гемаглютинації (РГА) з 1% суспензією еритроцитів півня за загальноприйнятою методикою, рекомендованою МЕБ [5, 6]. Ідентифікацію вірусу проводили за допомоги референтних сироваток з антитілами до вірусу грипу А підтипів H1-H16 (табл. 1), а також пташиних параміксовірусів ПМВ1–ПМВ4 та ПМВ6–ПМВ9 (табл. 2) виробництва виробництва OIE/FAO Reference Laboratory for Newcastle disease and Avian Influenza, Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Італія) та Veterinary Laboratories Agency (Великобританія).

Таблиця 1

### Позитивні референтні сироватки до вірусу грипу А підтипів H1–H16

Сироватка	Підтип	Штам вірусу
1	2	3
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H1N1 subtype	H1N1	A/sw/It/558/86
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H2N3 subtype	H2N3	A/Dk/Germ/1215/73
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H3N8 subtype	H3N8	A/Psitt/It/2873/00
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H4N8 subtype	H4N8	A/Cockatoo/Eng/72
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H5N3 subtype	H5N3	A/duck/It/775/04
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H6N2 subtype	H6N2	A/TY/Canada/65
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H7N3 subtype	H7N3	A/ty/It/9289/V02
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H8N4 subtype	H8N4	A/turk/ONT/6118/68
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H9N7 subtype	H9N7	A/turk/Scotland/1/70

Продовження таблиці 1

1	2	3
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H10N1 subtype	H10N1	A/Ostrich/SA/01
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H11N9 subtype	H11N9	A/Duck/ Memphis/546/174
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H12N5 subtype	H12N5	A/Duck/Alberta/60/76
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H13N6 subtype	H13N6	A/Gull/Maryland/704/77
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H14N5 subtype	H14N5	A/Mallard/Gurjev/263/82
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H15N9 subtype	H15N9	A/Shearwater/Australia/2576/79
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H16N3 subtype	H16N3	A/Gull/Denmark/68110/02

Таблиця 2

**Позитивні референтні сироватки до параміксовірусів підтипів ПМВ1–ПМВ9**

Сироватка	Підтип	Штам вірусу
Reference antiserum against Newcastle disease virus (APMV-1), Ulster 2 C	PMV-1	Ulster 2C
Reference antiserum against Paramyxovirus 2 (APMV-2), YUCAIPA	PMV-2	Ck/Yucaipa/56
Reference antiserum against Paramyxovirus 3 (APMV-3) turkey serotype	PMV-3	Ty/1087/82
Reference antiserum against Paramyxovirus 4 (APMV-4)	PMV-4	Duck/Hong Kong D3/75
Reference antiserum against Paramyxovirus 6 (APMV-6)	PMV-6	Duck/Hong Kong/199/77
Reference antiserum against Paramyxovirus 7 (APMV-7)	PMV-7	Dove/Tennessee/4/75
Reference antiserum against Paramyxovirus 8 (APMV-8)	PMV-8	Goose/1053/76
Reference antiserum against Paramyxovirus 9 (APMV-9)	PMV-9	Pintail/Italy/493/04

Визначення антигенних властивостей проводили шляхом введення інактивованого  $\beta$ -пропіолактоном антигену.

Дослідження з секвенування сайту розрізання гемаглютинину зазначеного ізоляту проводили в Південно-Східній лабораторії з хвороб птиці (м. Атенс, штат Джорджія, США.)

**Результати досліджень та їх обговорення.** На першому етапі досліджень перевірено аутентичність ізоляту за допомоги референтних сироваток. За результатами проведених досліджень доведено, що тільки з референтною сироваткою до 7 підтипу гемаглютиніну ізолят затримував аглютинацію еритроцитів в розведенні 1:512 (табл. 3).

Таблиця 3

**Результати ідентифікації гемаглютинуючого ізоляту А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011**

Підтип	Титр затримки гемаглютинації з референтними сироватками в РЗГА
позитивні референтні сироватки крові до вірусу грипу А	
H1	_*
H2	_*
H3	_*
H4	_*
H5	_*
H6	_*
H7	1:512
H8	_*
H9	_*
H10	_*
H11	_*
H12	_*
H13	_*
H14	_*
H15	_*
H16	_*
позитивні референтні сироватки крові до параміксовірусів птиці	
ПМВ1	_*
ПМВ2	_*
ПМВ3	_*
ПМВ4	_*
ПМВ6	_*
ПМВ7	_*
ПМВ8	_*
ПМВ9	_*

**Примітка:** «\*» – специфічна затримка аглютинації відсутня.

За результатами досліджень інфекційний титр вірусу становив 7,5 lg ЕІД<sub>50/0,2см<sup>3</sup></sub>, а летальний –1,5lg ЕЛД<sub>50/0,2см<sup>3</sup></sub>.

При імунізації курей 217-добового віку (крос «Хай-Секс коричневий») інактивованим антигеном у суміші з ад'ювантом («Монтанид ISA-70» 1:1) на 14 добу після щеплення середній титр антитіл становив 2,4 log<sub>2</sub> (коливання титрів від 0 до 1:16), а на 30 добу – 4,7 log<sub>2</sub> (коливання титрів антитіл від 1:8 до 1:32).

При проведенні досліджень з секвенування (Південно-Східна лабораторія з хвороб птиці, м. Атенс, штат Джорджія, США) зазначеного штаму встановлено, що сайт розрізання гемаглютинину має вигляд *EIPKGR/GLE*. Він містить одну основну амінокислоту, що дає підстави стверджувати, що цей вірус є низькопатогенним. Також дослідженнями доведено аний вірус споріднений з ізолятом Європейського походження, який виділений в Грузії у 2010 році. При порівнянні штаму з азіатськими високопатогенними вірусами (підтип H7N9) відмічено, що азіатські віруси формують окрему гілку, яка

достатньо далеко генетично розташована від ізоляту А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011. Все це свідчить про те, що ці віруси генетично дуже сильно розрізняються. Таким чином, можна стверджувати, що вірус А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011, який було виділено від крижня є низькопатогенним.

На зазначений варіант вірусу низькопатогенного грипу отримано деклараційний патент на корисну модель № 84136 «Штам вірусу низькопатогенного грипу птиці А/крижень /Асканія-Нова/23-15-02/11 Н7Н3» (Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10 жовтня 2013 року бюлетень №19).

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. За результатами вірусологічних досліджень встановлено, що вірус грипу птиці А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011 Н7Н3, ізолюваний від клінічно здорових диких крижнів, відноситься до низькопатогенних вірусів грипу птиці.

2. При визначенні антигенної активності вірус при одноразовому щепленні викликає напруцювання специфічних антитіл в титрах  $3-5 \log_2$  в РЗГА.

3. При проведенні секвенування зазначеного штаму встановлено, що сайт розрізання гемаглютинину має вигляд *EIPKGR/GLE*, що підтверджує його належність до групи низькопатогенних варіантів вірусу грипу.

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Increased pathogenicity and shedding in chickens of a wild bird-origin low pathogenicity Avian influenza virus of the H7N3 subtype following multiple in vivo passages in quail and turkey / F. Cilloni [et al.] // Avian Diseases. — 2010. — Vol. 54, suppl. 1. — P. 555–557.
2. Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks [Text] / M. E. Arnold [et. al.] // Epidemiol Infect. – 2018. – Vol. 146 № 3 – P. 306-313.
3. Antibody Immunity Induced by H7N9 Avian Influenza Vaccines: Evaluation Criteria, Affecting Factors, and Implications for Rational Vaccine Design [Text] / Z. Hu [et. al.] // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 26, № 8. – P. 1898.
4. Prevalence and control of H7 avian influenza viruses in birds and humans [Text] / E.M. Abdelwhab [et. al.] // Epidemiol Infect. – 2014. – Vol. 142, № 5. – P. 896–920.
5. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) / Office International des Épizooties (Ed.). – 6<sup>th</sup> ed. – Paris: OIE, 2008. – Vol. 1–2. – 1343 pp.
6. L. Dufour-Zavala. A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens / American Association of Avian Pathologists (Ed.) – 5<sup>th</sup> ed. – Athens, GA : American Association of Avian Pathologists, 2008. – 249 p.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦЫ Н7Н3, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ ДИКИХ УТОК** / Музыка Д. В., Стегний Б. Т., Рула А. Н., Ткаченко С. В., Пищанский А.В., Напненко А. А.

*Представлены результаты исследований биологических свойств вируса гриппа птицы подтипа Н7Н3, изолированного от диких водоплавающих диких уток в 2011 году. Установлена способность вируса к наработке специфических антител при введении инактивированного антигена опытным курам в смеси с адьювантом «Монтанид ISA-70» в соотношении 1:1 в титре  $(4,7 \pm 1,3) \log_2$ . По результатам секвенирования сайта разрезания*

гемагглютини́на EIPKGR/GLE даний ізольований віднесено до групи низкопатогенних. На основі отриманих даних на вказаний штамм отримано Деклараційний патент і він пропонується для подальшого використання в якості виробничого для наработки вакцин і діагностических тест-систем.

**Ключевые слова:** низкопатогенный вирус групп подтипа H7N3, дикие птицы, эпизоотологический мониторинг.

# **BIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS H7N3 ISOLATED FROM WILD DUCKS** / Muzyka D., Stegnyy B., Rula O., Tkachenko S., Pishchanskyi O.V., Napnenko O.

**Introduction.** To date, the influenza virus remains an unpredictable infection for animals, birds and humans. The emergence of new strains and variants with new properties and pathogenicity to new hosts requires constant observation and thorough investigation of new viruses.

Some highly pathogenic and low pathogenic avian influenza viruses of H5 and H7 subtypes, characterized by high genetic variability, are concern to the national community as they rapidly mutated, capable of overcoming the interspecific barrier and infecting other animals, including humans

**The goal of the work** was to study the biological properties of a low-pathogenic avian influenza virus with 7 subtypes of hemagglutinin isolated from wild ducks, to establish the prospects of its further use as a production strain for the production of veterinary immunobiological preparations.

**Materials and methods.** The study was carried out using the avian influenza virus A/Mallard/AN/23-15-02/2011, isolated from wild ducks. All work with the pathogen was conducted in special conditions, which excluded the pathogen exposure to the environment.

The cultivation of the virus, the determination of the biological and lethal activity of the virus (based on Reid and Mench method) was carried out using chicken embryos at the age of 9-11 days in accordance with the recommendations of the International Office of Epizootics (OIE). The hemagglutinin activity of the virus was determined in the hemagglutination inhibition test with a 1% suspension of red blood cells of the rooster according to the generally accepted method recommended by the FEM. The identification of the virus was carried out using the reference serum antibodies to the influenza A virus subtypes H1-H16 and avian paramyxoviruses PMV1-PMB4 and PMV6-PMV9 produced by the OIE/FAO Reference Laboratory for Newcastle disease and Avian Influenza, the Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Italy) and the Veterinary Laboratories Agency (UK).

**The results of research and discussion.** The results of studies of the biological properties of the bird flu virus subtype H7N3, isolated from wild waterfowl wild ducks in 2011, presented in the title. The ability of the virus to produce specific antibodies was established when the inactivated antigen was administered to experimental chickens in a mixture with the adjuvant "Montanide ISA-70" in the ratio 1:1 in titer  $(4.7 \pm 1.3) \log_2$ . The results of the study of infectious and lethal activity of the indicated antigen are also  $7.5 \lg \text{EID}_{50/0,2\text{cm}^3}$  and  $1.5 \lg \text{ELD}_{50/0,2\text{cm}^3}$ .

According to the results of the sequencing of the EIPKGR/GLE haemagglutinin cutting site, this isolate is classified as a group of low pathogenic ones. Based on the data obtained, a Declaration patent for this strain was received and it was proposed for further use for vaccine production and diagnostic test kits creation. The further conduct of epizootic surveillance activity of the circulation of the influenza virus among waterfowl and synanthropic birds was substantiated.

**Conclusions and prospects for further research.** The conducted studies proved the belonging of the influenza virus to low-pathogenic variants and the possibility of its use as a component of diagnostic test kits has been proved.

**Keywords:** low pathogenic avian influenza, wild birds, epizootologic monitoring.

## REFERENCES

1. Cilloni, F., Toffan, A., Giannecchini, S., Clausi, V., Azzi, A., Capua, I. et al. (2010). Increased pathogenicity and shedding in chickens of a wild bird-origin low pathogenicity Avian influenza virus of the H7N3 subtype following multiple *in vivo* passages in quail and turkey. *Avian Diseases*, 54(s1), 555–557.
2. Arnold, E., Slomka, M. J., Breed, A. C., Hjulager, C. K., Pritz-Verschuren S., Venema-Kemper, S. et al. (2018). Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks. *Epidemiol Infect.* 146(S3), 306–313.
3. . Hu, Z., Jiao, X., Liu, X. (2017). Antibody Immunity Induced by H7N9 Avian Influenza Vaccines: Evaluation Criteria, Affecting Factors, and Implications for Rational Vaccine Design. *Front Microbiol.*, 26(8), 1898.
4. Abdelwhab, E. M., Veits, J., Mettenleiter, T. C. (2014). Prevalence and control of H7 avian influenza viruses in birds and humans. *Epidemiol Infect.*, 142(5), 896–920.
5. Office International des Épidémiologies (Ed.). (2008). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* (6<sup>th</sup> ed., Vols. 1–2). Paris: OIE.
6. Dufour-Zavala, L., American Association of Avian Pathologists (Ed.). (2008). *A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens* (5<sup>th</sup> ed.). Athens, GA: American Association of Avian Pathologists.

УДК 636.2.053.09:615.24

**НЕМОВА Т.В.**, канд. вет. наук, email: nemova\_tv@ukr.net,  
**ПАЛЮХ Т.А.**, канд. вет. наук, email: tetiana.paliukh@ukr.net,  
**СОЛОМОН В.В.**, канд. вет. наук, email: solomon80slava@gmail.com,  
**ЦВІЛІХОВСЬКИЙ М.І.**, академік НААН, д-р біол. наук, email: m\_tsvilikhovsky@ukr.net  
 Національний університет біоресурсів і природокористування України  
**ГУДЗЬ Н.В.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., email: gudznataly@gmail.com  
 Інститут ветеринарної медицини НААН

## ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТУ «БІПОЛІН-ЕКО» ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТЕЛЯТ ЗА ДИСПЕПСІЇ

Описані результати порівняльного клінічного дослідження препаратів «Енроксил 5%» та «Біполін-Еко» під час комплексної терапії телят за диспепсії. Встановлено, що застосування препарату «Біполін-Еко» в якості етіотропної терапії телят за диспепсії нормалізує клінічний стан, морфологічні та біохімічні показники крові тварин і сприяє швидкому та ефективному їх лікуванню.

Результати проведених досліджень вказують на відсутність негативної дії препарату «Біполін-Еко» на організм тварин та його високу терапевтичну ефективність за диспепсії новонароджених телят.

**Ключові слова:** диспепсія, телята, «Біполін-Еко», лікування, профілактика.

**Вступ.** Шлунково-кишкові захворювання молодняку тварин завдають значних економічних збитків тваринницьким господарствам різних типів власності [1, 2]. У 80% діагностованих випадків шлунково-кишкових