

УДК: 619:616-076:578.832.1

**Музика Д.В.**, к.вет.н., старший науковий співробітник ©*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків*

### **УДОСКОНАЛЕННЯ ВІТЧИЗНЯНИХ ЗАСОБІВ СПЕЦИФІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ ПТИЦІ В РЕАКЦІЇ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ**

*У статті представлені результати розробки, апробації та вдосконалення вітчизняних тест-систем для серологічної діагностики грипу птиці в реакції затримки гемаглютинації у сільськогосподарських і диких птахів. Запропоновано додатково ввести до складу біопрепаратів нові інактивовані антигени, виготовлені на основі вітчизняних штампів тиск нтозами ст вірусів грипу підтипів H5N2, H7N3, H15N7, H16N3, які ізольовані від диких водоплавних і тиск нтозами птахів.*

**Ключові слова:** *грип птиці, реакція затримки гемаглютинації, антитіла, дикі та сільськогосподарські птахи.*

**Вступ.** Важливим елементом у системі контролю грипу птиці є лабораторна діагностика захворювання. На сьогоднішній день основним методом серологічної діагностики грипу є реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) [4]. Міжнародне епізоотичне бюро рекомендує використовувати цей метод для виявлення специфічних антитіл у птиці при проведенні серологічних досліджень, для визначення рівня специфічних антитіл та напруженості імунітету у птиці після застосування інактивованих вакцин, крім того він є основним методом серологічної ідентифікації гемаглютинуючих вірусів [3]. Як відомо, віруси грипу мають високу мінливість, в наслідок чого, віруси, які мають, навіть, один тип тиск нтозами відрізняються один від одного [1]. Тому для коректної діагностики захворювання потрібно використовувати нові епізоотично актуальні штами вірусів грипу. Починаючи з 2006 року в Референс-лабораторії з грипу та ньюкаслської хвороби ННЦ «ЛЕКВМ» розроблено та випробувано декілька діагностичних тест-систем в РЗГА для діагностики грипу («АвіФлуТест H5N1», «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів H1-H14»).

Нашою головною метою було вдосконалити вже розроблені вітчизняні тест-системи для серологічної діагностики грипу в РЗГА шляхом оновлення новими виробничими штамми вірусу грипу птиці.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили у Референс-лабораторії з грипу та ньюкаслської хвороби відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Для розробки та виготовлення тест-системи «АвіФлуТест H5N1» використано виробничий штам А/курка/Сиваш/02/05 H5N1. Адаптація та клонування епізоотичного вірусу

тиск нтозами сті грипу птиці для отримання виробничого штаму проводили за методикою, розробленою в ННЦ «ІЕКВМ». Для розробки «Тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипів Н1 – Н14» використали еталонні штами вірусу грипу А: А/свиня/Айова/15/30 (Н1Н1), А/Сингапур/1/57 (Н2Н2), А/качка/Україна/63 (Н3Н8), А/качка/Чехословаччина/56 (Н4Н6), А/крячок/Південна Африка/61 (Н5Н3), А/індик/Масачусетс/65 (Н6Н2), А/курка/Росія/87 (Н7Н7), А/індик/Онтаріо/67 (Н8Н4), А/індик/Вісконсин/66 (Н9Н2), А/курка/Німеччина/Н/49 (Н10Н7), А/качка/Англія/56 (Н11Н6), А/качка/Альберта/60/70 (Н12Н5), А/мартин/Астрахань/1421/79 (Н13Н2), А/мартин/Астрахань/227/84 (Н14Н2). Дослідження з еталонними штамами вірусу грипу А проводила м.н.с. Майорова К.Ф.

Також у дослідженнях використовували нові штами вірусу грипу птиці, що були виділені від диких птахів в ННЦ «ІЕКВМ» протягом 2010-2011 років: А/чирянка/Дж/4-17-11/2010 (Н5Н2), А/крижень/А-Н/23-15-02/11 (Н7Н3), А/мартин звичайний/ Утлюк/2-2-08/11(Н16Н3), А/крижень/Новомихайлівка/2-23-12/10 (Н15Н7).

Накопичення біомаси вірусу проводили на СПФ – курячих ембріонах. Підбір оптимальних режимів культивування, концентрування, інактивації вірусної сировини та конструювання тест-системи здійснювали за методами, розробленими колективом авторів ННЦ «ІЕКВМ» з урахуванням рекомендацій МЕБ і ВООЗ [2, 4, 5]. Контроль якості тест-систем проводили згідно з вимогами МЕБ та FAO [4, 5].

**Результати досліджень.** На початку епізоотії тиск нтозами сті грипу птиці Н5Н1 в Україні в АР Крим в 2005-2006 роках однією з проблем була відсутність вітчизняних діагностичних тест-систем для швидкої діагностики цього захворювання. У зв'язку з цим нами у короткі терміни була розроблена тест-система для серологічної діагностики грипу птиці підтипу Н5 в реакції затримки гемаглютинації. Головне завдання при цьому – вибір та отримання виробничого штаму вірусу. Для цього проведено дослідження біологічних властивостей епізоотичного ізоляту вірусу тиск нтозами сті грипу птиці А/курка/Сиваш/02/05 Н5Н1, який було виділено від хворих та загиблих курей в АР Крим. Встановлено, що він є тиск нтозами ст для курячих ембріонів та викликає їх швидку загибель через 24-48 годин після інфікування. Недостатнім був титр гемаглютининів – 1:32 – 1:64 та низьким вихід вірусної сировини. Шляхом селективного клонування на СПФ-курячих ембріонах, підбору умов культивування ми отримали виробничий штам вірусу А/курка/Сиваш/02/05 Н5Н1, який забезпечував отримання якісної вірусної сировини з високим титром гемаглютининів – 1:1024 – 1:2048. За результатами цих наукових досліджень виробничий штам депоновано в Державному науково-контрольному інституті біотехнології та штамів мікроорганізмів за № 383 та на нього отримано патент України на корисну модель № 20245 «Штам вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/05 (Н5Н1) для виготовлення біопрепаратів проти пташиного грипу». Після отримання виробничого штаму були розроблені

основні технологічні елементи діагностичної тест-системи, а саме: підбір інактиванту та регламенту інактивації, які б забезпечували повну інактивацію інфекційних властивостей вірусу та суттєво не впливали на його тиск нтозами, регламент визначення повноти інактивації вірусу, підбір стабілізуючого середовища для тривалого зберігання антигенів, схема отримання специфічних гіперімунних сироваток. Все це дозволило в короткі терміни створити, випробувати та провести апробацію вітчизняної діагностичної тест-системи для серологічної діагностики тиск нтозами сті грипу птиці «АвіФлуТест Н5Н1» (ТУ У24.4-00497087-052:2006). Ця тест-система за результатами державних випробувань була зареєстрована в Україні у 2007 році (РП 2743-14-0301-07). Протягом 2007 – 2012 років «АвіФлуТест Н5Н1» успішно використовувалася державними лабораторіями ветеринарної медицини та науково-дослідними установами для серологічного моніторингу грипу птиці, що викликається вірусами грипу з підтипом гемаглютиніни Н5.

Протягом цього ж часу в Референс-лабораторії з грипу птиці та ньюкаслської хвороби відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» проводилась активна моніторингова та пошукова робота щодо виділення інших вірусів грипу птиці з гемаглютинінам Н5. Це було обумовлено декількома причинами. По-перше, згідно з рекомендаціями МЕБ, у діагностиці грипу необхідно використовувати антигени, виготовлені з сучасних актуальних штамів вірусів грипу, що пов'язано з високою мінливістю та здатністю до мутації цього збудника. По-друге, при виборі виробничих штамів бажано перевагу надавати штамам вірусів грипу з низькою патогенністю. У 2010 році широкомасштабні моніторингові дослідження основного природного резервуару вірусів грипу – диких птахів дозволили виділити вірус грипу птиці підтипу Н5Н2 А/чирянка/Дж/4-17-11/2010. За результатами серії дослідів встановлено, що цей вірус є тиск нтозами ст вірусом грипу, який не викликає захворювання у сприйнятливої птиці ні при інтравенозному, ні при інтраназальному інфікуванні. Репродукція вірусу в організмі птиці є дуже низькою, виділення збудника в навколишнє середовище не встановлено. Це було підтверджено і негативними результатами досліджень контактних неінфікованих курчат, які були підсажені до курчат інфікованих інтраназально. У той же час вірус при інфікуванні птиці викликав імунну відповідь у курчат. При імунізації курчат інактивованим антигеном цього вірусу в суміші з масляним ад'ювантом через 7-14 діб після одноразового введення рівень специфічних антитіл становив 1:32 – 1:64. Всі ці дані дозволили нам вважати штам вірусу грипу А/чирянка/Дж/4-17-11/10 Н5Н2 перспективним штамом-кандидатом до виробничих штамів, як основний, або додатковий виробничий штам для виробництва діагностичних тест-систем. Наявність у цього вірусу іншого підтипу нейрамінідази є додатковим аргументом для можливого його подальшого використання у діагностичних цілях, тому що, за рекомендаціями МЕБ, у разі виявлення антитіл до вірусу грипу в РЗГА обов'язково необхідно провести додаткові дослідження з використанням антигену того ж самого підтипу гемаглютиніни, але з іншим

підтипом нейрамінідази для виключення можливих перехрестних реакції. У даному випадку, в зв'язку з тим, що основним виробничим штамом вірусу є H5N1 необхідно мати актуальний штам вірусу грипу підтипу H5, але з іншим підтипом нейрамінідази. У колекції штамів ННЦ «ІЕКВМ» зберігається інший виробничий штам вірусу тиск нтозами сті грипу птиці H5N3 А/крячок/Південна Африка/61, який використовується при виробництві тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1-Н14. Головним недоліком цього вірусу є його антигенні відмінності від сучасних штамів вірусу H5, що циркулюють в теперішній час. Штам, отриманий від диких птахів в 2010 році є більш епізоотично актуальним. Описані вище дослідження дозволили нам внести певні зміни у регламент виготовлення тест-систем, що підвищило їх специфічність. На штам вірусу тиск нтозами сті грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 отримано рішення про видачу деклараційного патенту (№ заявки у 201210776).

Також в арсеналі засобів специфічної діагностики грипу птиці, що розроблені у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ», є «Тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипу Н1-Н14». Для розробки цього діагностичного було використано еталонні штамми вірусу грипу А підтипів з Н1 до Н14, які були отримані Референс-лабораторією з грипу птиці та ньюкаслської хвороби відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» з Інституту вірусології т. Д.І. Івановського (Російська Федерація). Необхідно зазначити, що на сьогоднішній день за антигенними властивостями двох поверхневих глікопротеїнів ідентифіковано 16 підтипів за гемаглютинінам та 9 за нейрамінідазою, а за деякими даними виділяють один новий підтип вірусу грипу за тиск нтозами – Н17 та нейрамінідазою – Н10. Цей вірус було ізолювано від нових хазяїв – від кажанів [6]. Ураховуючи тиск нтозами факти, ми запропонували вдосконалити цю тест-систему за рахунок оновлення інактивованих антигенів підтипу вірусу Н7 та шляхом додавання нових антигенів з підтипами гемаглютинінів Н15, Н16.

Необхідність оновлення виробничого штаму вірусу грипу Н7 полягає в тому, що еталонний штам вірусу А/курка/Росія/87 (H7N7) був виділений в 1987 році та за антигенними властивостями відрізняється від тих вірусів, що циркулюють тепер, та є також тиск нтозами ст. Ураховуючи особливе значення цього вірусу для птахівництва, ми запропонували додатково новий виробничий штам вірусу грипу цього підтипу – А/крижень/А-Н/23-15-02/11 (H7N3). Це новий, оригінальний в антигенному відношенні тиск нтозами ст вірус, перший вірус грипу птиці А з тиск нтозами Н7, що було ізолювано від диких птахів в Україні у 2011 році з проб фекалій клінічно здорових крижнів (*Anas platyrhynchos*). Вірус добре культивується в курячих ембріонах 9-11-добового віку при інфікуванні в алантоїсну порожнину з накопиченням гемаглютинінів у титрі 1:64 – 1:256. Біологічна активність 4,5 Іg ЕІД<sub>50</sub>/0,2 мл та 4,66 Іg ЕІД<sub>50</sub>/0,2мл. Вірус може викликати загибель від 25 до 100% курячих ембріонів через 48-96 годин після інфікування.

Що стосується вірусів грипу підтипів Н15 та Н16, то вони не входили до складу діагностичної тест-системи до цього часу, у зв'язку з відсутністю вітчизняних ізолятів. Хоча віруси цих підтипів не мають великого значення для птахівництва, тому що на сьогоднішній день не відомо жодного випадку природного інфікування та захворювання свійських птахів, але для серологічної діагностики, особливо серологічної ідентифікації нових ізолятів, дуже важливим є наявність специфічних сироваток та антигенів до усіх існуючих вірусів грипу. Протягом широкомасштабних моніторингових досліджень диких птахів в 2010 -2011 роках нами було ізольовано перші українські ізоляти вірусу грипу птиці підтипів Н15 та Н16. Після цього були ретельно вивчені біологічні властивості цих вірусів, що дозволило нам запропонувати їх до включення до складу діагностичної тест-системи та використовувати ці віруси для виробництва нових інактивованих антигенів.

Штам вірусу грипу А/мартин звичайний/Утлюк/2-2-08/11 (Н16N3) за результатами секвенування дуже близький за генетичними властивостями до вірусу грипу птиці А/мартин звичайний/Монголія/1756/2006, але по суті являє собою новий, оригінальний в антигенному відношенні вірус. Крім того, це перший вірус цього підтипу, який було ізольовано в Україні та Східній Європі у серпні 2011 році з клоакального змиву дорослого клінічно здорового мартина звичайного (*Larus ridibundus*). Вірус культивується в курячих ембріонах 9-11-добового віку при інфікуванні в алантоїсну порожнину з накопиченням гемаглютинінів в титрі 1:128 -1: 512. При титруванні вірусу на курячих ембріонах інфекційна активність його становить 6 Іг ЕІД<sub>50</sub>/0,2мл, а летальний титр 6,33 Іг ЕІД<sub>50</sub>/0,2мл. Вірус може викликати загибель до 25% курячих ембріонів через 48-96 годин після інфікування. Вірус володіє добрими антигенними властивостями. Так, імунізація курей 217 добового віку інактивованим вірусом грипу А/мартин звичайний/Утлюк/2-2-08/11 (Н16N3) в суміші з ад'ювантом в дозі 1,0 см<sup>3</sup> викликає утворення специфічних антитіл до вірусу грипу Н16 через 30 діб після імунізації в титрах 1: 128 – 1:1024 в РЗГА. За результатами РЗГА та ІФА перші антитіла виявляються у 10-20% курей через 7 діб.

Віруси грипу птиці підтипу Н15 є достатньо рідкісними вірусами грипу, що були виділені від диких водоплавних та тиск нтозами птахів. Вперше ці віруси були ізольовані в період 1979-1983 років в Австралії від тиск нтозами птахів різних видів ряду Сивкоподібні. На сьогоднішній день, за даними GeneBank існує тільки 7 відомих вірусів грипу цього підтипу з наступними антигенними формулами Н15N2, Н15N4, Н15N6, Н15N8, Н15N9. Останній вірус грипу цього підтипу А/teal/Chany/7119/2008 (Н15N4) було ізольовано в Російській Федерації в 2008 році від чирянки малої в Західному Сибіру [7]. Штам А/крижень/Новомихайлівка/2-23-12/10 є першим вітчизняним вірусом грипу птиці А з антигенною формулою Н15N7. Необхідно зазначити, що це перший вірус цього підтипу з такою антигенною формулою Н15N7, які до сьогоднішнього дня не були ізольовані у світі від диких птахів, ізольований у 2010 році з проб фекалій дорослих клінічно здорових крижнів (*Anas*

*platyrhynchos*). За результатами секвенування цей вірус є спорідненим з Евразійською генетичною лінією вірусів грипу птиці підтипу H15 та є спорідненим з новим російським вірусом 2008 року. Вірус культивується в курячих ембріонах 9-11-добового віку при інфікуванні в алантоїсну порожнину з накопиченням гемаглютининів в титрі 1:512 протягом 4-5 днів. При титруванні вірусу на курячих ембріонах встановлено, що інфекційний титр становить 6,5 lg ED<sub>50</sub>/0,2 мл. Вірус не викликає загибелі курячих ембріонів протягом 120 годин після інфікування. Цей вірус володіє добрими антигенними властивостями. Так, імунізація курей 217 добового віку інактивованим вірусом грипу А/крижень/Новомихайлівка/2-23-12/10 (H15N7) в суміші з ад'ювантом у дозі 1,0 см<sup>3</sup> викликає утворення специфічних антитіл до вірусу грипу H15 через 30 днів після імунізації в титрах 1: 64 – 1:1024 в РЗГА. За результатами РЗГА та ІФА перші антитіла виявляються у 10-60% курей через 7 днів.

#### **Висновки:**

1. Протягом 2007-2012 років у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» розроблені, апробовані на практиці вітчизняні тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці за допомогою РЗГА. Тест-системи «АвіФлуТест H5N1» та «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів H1-H14 в РЗГА» пройшли державні випробування, зареєстровані на території України та використовуються у практиці лабораторій ветеринарної медицини.

2. За результатами широкомасштабного епізоотологічного моніторингу диких птахів в 2010-2011 роках ізольовано віруси грипу птиці підтипів H5N2, H7N3, H15N7, H16N3. Дослідження патогенності, біологічних та молекулярно-генетичних властивостей показали перспективність їх використання як виробничих вірусів для виготовлення діагностичних тест-систем.

3. Для вдосконалення специфічної серологічної діагностики грипу в РЗГА запропоновано додатково ввести до складу зазначених тест-систем нові інактивовані віруси підтипів H5N2, H7N3, H15N7, H16N3.

#### **Література**

1. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов тиски и птичьего гриппа, выделенных на территории Российской Федерации и Автономной республике Крым [Текст] / А.В. Андриясов, [и др.] // Материалы II Междунар. Вет. конгресса по птицеводству. – М., 2006. – С. 59-65.

2. WHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organization. Avian influenza A (H5N1) infection in humans [Text] // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 1374-1385.

3. Lee C.W. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination [Text] / C. W. Lee, D.L. Suarez // Anim. Health Res. Rev. – 2005. – Vol. 6. – P. 1-15.

4. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.oie.int>. – Title of the screen.

5. Food and agriculture organization of the United Nations [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.Fao.Org>. – Title of the screen.

6. A distinct lineage of influenza A virus from bats [Text] / S. Tong [at al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012/ - Vol.109, № 11. – P. 4269-4274

7. Influenza A (H15N4) virus isolation in Western Siberia, Russia [Text] / M. V. Sivay [at al.] // J. Virol. – 2013. – Vol.87, N 6. – P. 3578-3582

### Summary

*The paper presents the results of the development, validation and improvement of the domestic system test for serological diagnosis of avian influenza in hemagglutination inhibition test at poultry and wild birds. It was prompted additionally to enter new inactivated antigens produced and based on domestic strains of low pathogenic influenza virus subtypes H5N2, H7N3, H15N7, H16N3, which are isolated from wild waterfowl and shorebirds.*

**Key words:** *avian influenza, hemagglutination inhibition test, antibodies, wild birds and poultry .*

Рецензент – д.б.н., професор Маслянюк Р.П.