

measles vaccine campaign by oral-fluid surveys in a rural Kenyan district: interpretation of antibody prevalence data using mixture models. *Epidemiol Infect* 137:227-233. **12.** Okamoto et al. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* 83:1291-1297. **13.** Oliveira et al. 1998. Salivary diagnosis of measles for surveillance: a clinic-based study in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:636-638. **14.** Prickett et al. 2008a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest* 20:156-163. **15.** Prickett, J, et al. 2008b. Surveillance of commercial growing pigs for PRRSV and PCV2 infections using pen-based oral fluid samples: A pilot study. *J Swine Health Prod* 16:86-91. **16.** Ramsay, M, et al. 1997. Surveillance of measles in England and Wales: implications of a national saliva testing programme. *Bull WHO* 75:515-521.

НОВІТНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ TORQUE TENO ВІРУСУ (TTV) У КОМЕРЦІЙНИХ ВІДЛУЧЕНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ, ОДНОЧАСНО ІНФІКОВАНИХ РЕПРОДУКТИВНИМ І РЕСПІРАТОРНИМ СИНДРОМОМ ВІРУСУ СВИНЕЙ (PRRSV), ЦИРКОВІРУСОМ СВИНЕЙ 2 ТИПУ (ЦВС2) ТА ВІРУСОМ ГРИПУ

Пограничний Р.², Прікет Дж.¹, Мейн Р.¹, Кларк А.², Зіммерман Дж.¹

¹Коледж ветеринарної медицини, Державний університет, м. Еймс, Айова, ²Лабораторія діагностики хвороб тварин, Відділ порівняльної патобіології, Університет Пердю, Західний Лафейет, Індіана

Метою дослідження було описати циркуляцію Torque Teno вірусу (TTV) у комерційних відлучених популяціях, одночасно інфікованих репродуктивним і респіраторним синдромом вірусу свиней (PRRSV). Вплив TTV та взаємодії з суміжними інфекціями (PRRSV, PCV2 і грип) на зростання якості свиней буде вивчатись з використанням щотижневих даних захворюваності/смертності, лікування, а також даних розпродажу. Попередні дані свідчать про те, що інфекція TTV була загальною для 10 комерційних відлучених когорт, враховуючи ті, що розглянуті у даному спостереженні.

УДК 619:578.832.1:636.5

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА А/Н5N1, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2005 ГОДУ

Абрамова Л.Ю.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), г. Москва

Чвала И.А., Андриясов А.В., Пчелкина И.П., Манин Т.Б., Мудрак Н.С., Ирза В.Н., Борисов А.В., Дрыгин В.В., Старов С.К.

ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных, г. Владимир

Yu Q., Miller P.J.

Юго-восточная лаборатория болезней птиц, США

В июле 2005г. на территории Новосибирской области Российской Федерации были зарегистрированы случаи болезни среди диких и сельскохозяйственных птиц, имевших острое течение и высокую смертность. Позднее вспышки болезни были зафиксированы в Омской, Тюменской, Курганской и Челябинской областях, а затем и в других регионах страны, соседних государствах (2, 3, 4, 8). Стремительное распространение болезни, вызванной вирусом высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1, случаи заболевания и гибели млекопитающих, огромный экономический ущерб потребовали как организации и проведения целого комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий внутри страны, так и их гармонизации на международном уровне.

Одним из направлений научно-исследовательских работ было изучение молекулярно-биологических свойств занесенного инфекционного агента, а также разработка, стандартизация и внедрение в ветеринарную практику современных средств и методов лабораторной диагностики. Одной из острых проблем оказалось своевременное обнаружение, идентификация и характеристика вируса, что существенно затрудняло принятие надлежащих мероприятий по локализации и ликвидации очага болезни.

Используя молекулярно-генетические методы диагностики, такие как ПЦР и нуклеотидное секвенирование, можно определить нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт нарезания белка гемагглютинина (НА), что позволяет оценить вирулентность исследуемого изолята вируса гриппа птиц (ВГП). Результаты молекулярно-генетических исследований позволяют поставить диагноз в сжатые сроки, однако решающее значение при изучении патогенных свойств вируса имеют эксперименты с использованием лабораторных животных. В настоящее время одним из основных методов оценки вирулентности изолятов ВГП (5, 8) является определение индекса патогенности при внутривенном заражении цыплят (IVPI).

Из различных регионов России и ближнего зарубежья в ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных поступали для лабораторного исследования пробы патологического материала, отобранные как при вспышках заболевания, так и в результате мониторинговых мероприятий. Благодаря предпринятым мероприятиям, а также организации прямого сотрудничества между ФГУ ВНИИЗЖ и региональными ветеринарными службами, были изучены некоторые клинические признаки и патологоанатомические изменения у различных видов диких и сельскохозяйственных птиц в полевых условиях, собраны пробы биоматериала. В данной работе рассмотрены четыре случая болезни, произошедшие в период с июля по декабрь 2005г. в различных субъектах России, изучены вирулентные свойства выделенных изолятов вируса гриппа птиц А/Н5N1, описаны особенности течения болезни.

Материалы и методы. Вирус гриппа. В работе использовали изоляты ВГП А/Н5N1:

– A/wild duck/Tumen/233/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, трахеи и головного мозга дикой утки, отобранной в Армизонском районе Тюменской области в июле 2005г.;

– A/turkey/Tula/551/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, отобранной в д. Яндовка Ефремовского района Тульской области в октябре 2005г.;

– A/swan/Astrakhan/598/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, кишечника, трахеи и головного мозга лебедя, отобранной в Камызякском районе Астраханской области в ноябре 2005г.;

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

– A/swan/Kalmykia/540/05, выделенный из пробы паренхиматозных органов, трахеи и головного мозга павшего лебедя, отобранной в Лаганском районе Республики Калмыкия в декабре 2005г.;

Лабораторные животные. В экспериментах использовали 6-недельных цыплят по десять птиц в группе, неиммунных к вирусу гриппа птиц.

Выделение вируса. Вирусовыделение проводили в 10-11-суточных эмбрионах СПФ-кур (КЭ) (7). Из патологического материала готовили 10 % суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) и вводили в аллантаоисную полость КЭ в объеме 0,2 мл. Эмбрионы, погибшие после 24 ч. инкубации и более, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований.

РТГА. Для идентификации изолятов вируса применяли РТГА в соответствии с общепринятой методикой (7) с использованием антигенов и гипериммунных сывороток к вирусам гриппа и ньюкаслской болезни птиц производства ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир) и Института зоофилактики (IZSve, Италия).

Определение индекса патогенности (IVPI). Для определения IVPI использовали общепринятую методику (7). Исследуемую вирусосодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти цыплятам в дозе 0,1 мл. За птицами вели ежесуточное наблюдение в течение 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 – птица клинически здорова; 1 – больная (отмечены некоторые признаки заболевания, такие, как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 – тяжелобольная (одновременно наблюдаются несколько ярких клинических признаков инфекции); 3 – птица погибла. Погибшим птицам присваивали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятых суток опыта. Индекс патогенности 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.

ПЦР. Суммарную РНК выделяли, используя набор реактивов производства ООО «Компания Биокор», (Россия), в соответствии с инструкцией к набору. ОТ-ПЦР проводили по стандартной методике с использованием AMV Reverse Transcriptase, Taq DNA Polymerase (Promega, США). Нуклеотидные последовательности фрагментов генов определяли с применением автоматического секвенатора ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение. При изучении эпизоотологических данных, полученных из различных регионов России, были установлены некоторые особенности течения болезни. Прежде всего, заболевание, протекавшее в острой форме, регистрировали у различных видов диких и сельскохозяйственных птиц, которое имело тенденцию к генерализации и приводило, как правило, к гибели животных. При клиническом осмотре птиц в полевых условиях регистрировали угнетенное состояние, затрудненное дыхание, признаки поражения нервной системы (нарушение координации движений, тремор, а также искривление шеи у водоплавающих птиц), конъюнктивиты, диарею. У индейки, кроме того, отмечали цианоз кожи и ее производных, отечность подкожной клетчатки, особенно выраженные в области головы.

При вскрытии водоплавающих птиц обнаружены кровоизлияния в кишечнике (двенадцатиперстная и прямая кишки) и поджелудочной железе, инъекция сосудов головного мозга и сердца. Множественные кровоизлияния и гиперемия сосудов отмечены в большинстве органов (головной мозг, трахея, кишечник, паренхиматозные органы), отечность легких. Полученные данные позволяют предположить наличие высоковирулентных и пантропных свойств вируса, способного вызвать острую генерализованную болезнь у различных видов птиц.

В результате вирусовыделения в эмбрионах СПФ-кур из проб патологического материала были изолированы гемагглютинирующие агенты в титрах 1:64-1:128, реагирующие в РТГА только со специфической гипериммунной сывороткой к вирусу гриппа А/Н5. Полученные изоляты вызывали гибель эмбрионов кур в период 24-48 часов после заражения.

Таблица 1 – Результаты наблюдений за птицами после заражения

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птиц, гол.	Период наблюдений, сут.			IVPI
		1	2	3 - 10	
A/wild duck/Tumen/233/05 H5N1	Здоровые	1	0	0	2,86
	Больные	3	0	0	
	Тяжелобольные	4	1	0	
	Погибшие	2	9	10	
A/swan/Kalmykia/540/05 H5N1	Здоровые	1	0	0	2,84
	Больные	5	0	0	
	Тяжелобольные	2	1	0	
	Погибшие	2	9	10	
A/turkey/Tula/551/05 H5N1	Здоровые	0	0	0	2,93
	Больные	2	0	0	
	Тяжелобольные	3	0	0	
	Погибшие	5	10	10	
A/swan/Astrakhan/598/05 H5N1	Здоровые	0	0	0	2,87
	Больные	4	0	0	
	Тяжелобольные	3	2	0	
	Погибшие	3	8	10	

С применением молекулярно-генетических исследований выделенные изоляты были идентифицированы как вирус гриппа А/Н5N1. В результате определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов НА, NA и М изоляты были отнесены к генетической линии Guangdong, сублинии Qinghai (клад 2.2.) высокопатогенного гриппа, сформировавшейся летом 2005 года на северо-западе Китая (6). Сайт нарезания гемагглютинаина содержал основные аминокислоты (аргинин и лизин), и имел структуру RRRKKRGLF, характерную для штаммов вируса высокопатогенного гриппа птиц (5, 7).

Были проведены эксперименты по определению индексов патогенности выделенных изолятов, в которых неиммунным 6-недельным цыплятам (n=10) внутривенно инъецировали вирусосодержащую суспензию. При клиническом осмотре у зараженных птиц наблюдали следующие клинические признаки болезни: отказ от корма и воды, гиподинамию, диарею, затрудненное дыхание и хрипы, синюшность гребня, бородак и лап, конъюнктивиты, риниты, синуситы, отек подкожной клетчатки в области головы и шеи. У некоторых птиц удалось наблюдать признаки поражения нервной системы: искривление шеи, нарушение координации движений, тремор, парезы и параличи. Результаты оценки клинического состояния и учета гибели птиц, а также определенные значения индексов представлены в табл. 1.

При внешнем осмотре павших птиц отмечали катаральные конъюнктивиты, риниты, синуситы, цианоз видимых слизистых оболочек, гребня, бородак и лап. Также наблюдали обширные отеки в подкожной клетчатке головы и шеи. При патолого-анатомическом вскрытии установлены множественные кровоизлияния в паренхиматозных органах, особенно выраженные в селезенке, почках и поджелудочной железе. Отмечены обширные геморрагические поражения как слизистой, так и серозной оболочек на всем протяжении желудочно-кишечного и респираторного трактов. Венозный застой (гиперемия) подкожной клетчатки, мышечной ткани, выраженная инъеция сосудов сердца, желудка и кишечника, интерстициальная пневмония и отек легких обнаружены у большинства птиц. Также отмечено скопление в полостях тела серозной жидкости с отеком прилегающих тканей.

Как видно из данных табл. 1, клинические признаки болезни и гибель цыплят отмечали уже через сутки после внутривенного заражения, что говорит об остром течении инфекции. Гибель всех птиц произошла в интервале 2-3 суток с момента заражения. Полученные значения индексов патогенности характеризуют все изучаемые изоляты как высоковирулентные. Ранее сотрудниками ФГУ «ВНИИЗЖ» были изучены биологические свойства изолята A/duck/Novosibirsk/02/05 H5N1 (1), выделенного в июле 2005 года от домашней утки в Новосибирской области, который также был признан высоковирулентным (индекс патогенности имел значение 2,87). Следует отметить, что наиболее высокое значение индекса (2,93) было получено для изолята A/turkey/Tula/551/05 H5N1, выделенного от индейки, тогда как индексы патогенности изолятов, выделенных от водоплавающих птиц, были ниже (2,84-2,87). Таким образом, у цыплят наблюдали острую системную инфекцию с характерными клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями.

Выводы. Описаны клинические признаки и патологоанатомические изменения при высокопатогенном гриппе птиц, зарегистрированные в полевых условиях в различных субъектах России в 2005г. В результате лабораторных исследований были выделены и идентифицированы возбудители болезни. Установлена структура сайта нарезания гемагглютинаина (-RRRK-KRGLF-), характерная для вируса высокопатогенного гриппа А/Н5N1. Определены индексы патогенности выделенных изолятов, установлены их высоковирулентные свойства.

Список литературы

1. Биологические свойства изолята вируса гриппа птиц A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1 / И.А. Чвала, В.В. Дрыгин. // Вет. патология. – 2006. – № 4. – С. 60-63.
2. Изоляция штаммов вируса гриппа А/Н5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 г.) и их депонирование в государственную коллекцию вирусов (08 августа 2005 г.) / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, П.Г. Дерябин [и др.] // Вопр. вирусологии. – 2006. – № 1. – С. 11-14.
3. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов вируса птичьего гриппа, выделенных в Сибирском, Уральском федеральных округах и Республике Калмыкия в 2005 г. / А.В. Андриясов, Т.Б. Манин, И.П. Пчелкина [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 370-380.
4. Эпизоотия среди лебедей-шипунгов (*Cygnus olor*) в нижней дельте Волги (ноябрь 2005 г.), вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1 / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, П.Г. Дерябин [и др.] // Вопр. вирусологии. – 2006. – № 3. – С. 10-16.
5. Alexander, D.J. Orthomyxovirus infections / D. J. Alexander // *Virus Infections of Birds*. – Amsterdam etc., 1993 – P. 287-316.
6. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl/ H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 436. – P. 191-192.
7. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 2009.
8. WAHID Interface – OIE World Animal Health Information Database, 2010.

STUDY OF VIRULENCE PROPERTIES OF A/H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUSES ISOLATED IN RUSSIAN FEDERATION IN 2005

Abramova L. Yu.¹, Chvala I.A.², Andriyasov A.V.², Pchelkina I.P.², Manin T.B.², Mudrak N.S.², Irza V.N.², Borisov A.V.², Drygin V.V.², Starov S.K.², Q. Yu³, P.J. Miller³

¹ – Rosselkhoz nadzor, Moscow, Russia

² – FGI ARRIAH, Vladimir, Russia

³ – South-East Poultry Research laboratory, Athens, USA

Avian influenza viruses A/H5N1 were isolated and identified from July to December 2005 in different regions of Russian Federation. As a result of laboratory investigations all isolates were classified as highly virulent.