

УДК 619:616.98:578.832.1:636.5

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПОДТИПА H15N7, ВПЕРВЫЕ ВЫДЕЛЕННОГО В ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЕ**Музыка Д.В.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, e-mail: dmuzyka77@gmail.com

В статье представлены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств низкопатогенного вируса гриппа А подтипа H15, который был выделен в 2010 году от диких водоплавающих птиц в Украине. Установлены филогенетические связи этого изолята с вирусами гриппа из Западной Сибири и Северо-Западной Азии. Вирус активно репродуцируется в куриных эмбрионах с накоплением гемагглютининов в высоких титрах. Инактивированный антиген при однократном внутримышечном введении вызывает выработку специфических антител у кур.

Ключевые слова: низкопатогенный грипп птиц, дикие птицы.

Постоянный мониторинг эпизоотической ситуации среди диких птиц в отношении гриппа А является одним из основных составляющих системы контроля, раннего предупреждения и прогнозирования развития эпизоотической ситуации по гриппу, так как многие виды диких птиц являются природным резервуаром и переносчиком вируса в природе. Кроме того эти исследования позволяют получить много ценной информации об особенностях циркуляции, экологии вирусов гриппа А в разных регионах мира и возможной интродукции новых вирусов в новые географические регионы. За последнее время постоянный эпизоотологический мониторинг дикой фауны позволил установить новые экологические ниши для вирусов гриппа и выявить новые подтипы. Так, при исследовании летучих мышей выявили вирус гриппа, который имеет новый подтип гемагглютинина H17, а также новый подтип нейраминидазы – N10. [1]. Все это свидетельствует о необходимости проведения постоянных мониторинговых исследований, так как они позволяют не только получать новые знания об экологии тех или иных вирусов, но и прогнозировать развитие эпизоотической ситуации.

Материалы и методы. В работе использован вирус гриппа А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 (H15N7), изолированный от диких мигрирующих уток в Азово-Черноморском регионе в 2010 году во время широкомасштабного эпизоотологического мониторинга диких птиц. Вирус идентифицирован в ННЦ «ИЭКВМ» и хранится в коллекции отдела изучения болезней птиц.

Культивирование вирусов проводили согласно рекомендациям МЭБ [2]. Инфекционный титр вируса определяли путем титрования на куриных эмбрионах 9–11 суточного возраста, подсчет титра проводили по Риду и Менчу [2, 3]. Гемагглютинирующие свойства изучали в реакции гемагглютинации с 1% суспензией эритроцитов петуха по общепринятой методике [2]. Инактивацию вирусов гриппа проводили по общепринятой методике бетапропиолактоном. В качестве адьюванта использовали Монтанид ISA 70 (Seppic, Франция). Для иммунизации использовали взрослых кур 217-суточного возраста. Инактивированные препараты вируса гриппа вводили однократно внутримышечно в дозе 1,0 см³. Серологические исследования сыворотки крови проводили в РЗГА и ИФА по общепринятой методике через 14 и 30 дней после иммунизации [2]. В исследованиях использовали тест-системы IDEXX для выявления антител к вирусу гриппа А.

Результаты исследований. В период с 2009 по 2011 годы в Азово-Черноморском регионе Украины нами был проведен широкомасштабный мониторинг циркуляции вирусов гриппа А в популяциях диких птиц различных экологических групп. За этот период были исследованы дикие птицы 66 различных видов, которые относятся к 8 отрядам: *Pelecaniformes*, *Ciconiiformes*, *Anseriformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Charadriiformes*, *Coraciiformes*, *Passeriformes*. По нашим данным инфицированность диких птиц различных видов вирусами гриппа А колебалась в разные сезоны и разные годы от 0,42 до 1,83 %. В результате вирусологических исследований от диких птиц был изолирован целый ряд низкопатогенных вирусов гриппа А пятнадцати из известных шестнадцати подтипов по гемагглютинину и 9 известных подтипов нейраминидазы. В том числе был изолированы вирус гриппа А подтипа H15, который является достаточно редким подтипом. До недавнего времени циркуляция этого вируса была ограничена территорией Австралии. Впервые они были выделены в период с 1979 до 1983 года в Австралии от крачек и других представителей отряда Ржанкообразные: клинохвостого буревестника (*Puffinus pacificus*), темной крачки (*Onychoprion fuscatus*), а также от диких уток в Австралии: австралийского огаря (*Tadorna tadornoides*) и др. На сегодняшний день согласно данным GeneBank существует только 7 известных вирусов гриппа этого подтипа со следующими антигенными формулами H15N2, H15N4, H15N6, H15N8, H15N9. Последний вирус этого подтипа А/чирок/Чаны/7119/2008 (H15N4) был изолирован в Российской Федерации в 2008 году в Западной Сибири. Хотя он и относится к вирусам гриппа подтипа H15, но по результатам секвенирования и филогенетического анализа он не является родственным вирусам этого подтипа австралийского происхождения, а относится к отдельной евразийской генетической линии. Этот вирус является реасортантом и имеет новые гены гемагглютинина H15

и нейраминидазы N4, а также в его составе есть внутренние гены эндемических вирусов гриппа H8N8, H3N6 и H3N8, которые циркулировали в Западной Сибири в предыдущие годы. По антигенным характеристикам этот вирус значительно отличается от австралийских вирусов, которые были изолированы в 1979–1983 г. [6].

Не смотря на то, что вирус гриппа подтипа H15 не имеет большого значения для птицеводства, на сегодняшний день не известно ни единого случая природного инфицирования и заболевания сельскохозяйственных птиц вирусами гриппа этого подтипа, но для серологической диагностики, особенно для идентификации новых гемагглютинирующих изолятов, очень важным является наличие специфических сывороток и антигенов всех известных подтипов. Кроме того важным моментом является изучение происхождения и филогенетических связей вирусов гриппа, особенно новых подтипов, которые могут проникать из других географических регионов.

После того, как изолят А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 был идентифицирован с использованием референтных сывороток крови как вирус гриппа подтипа H15N7, нами были изучены его основные биологические свойства, что позволило предложить этот вирус в качестве дополнительного производственного вируса для производства инактивированных антигенов и сывороток для серологической диагностики гриппа А.

Вирус гриппа А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 (H15N7) – это первый вирус с такой антигенной формулой, который был выделен от диких птиц за все время исследований. Вирус был изолирован в 2010 году из проб фекалий взрослых клинически здоровых крякв (*Anas platyrhynchos*). Нами проведено секвенирование и филогенетический анализ полного генома этого украинского вируса. Установлено, что по результатам филогенетического анализа гена НА украинский вирус А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 близкородственный с вирусом А/чирок/Чаны/7119/2008 (H15N4) из Западной Сибири (рис. 1), а по результатам исследований гена нейраминидазы – с вирусами гриппа подтипов H7N7, H10N7, которые циркулируют среди диких птиц в Западной Европе. Секвенирование гена М позволило установить тесную связь украинского вируса с вирусами гриппа различных подтипов из Алтайского края и Монголии (рис. 2), по данным филогенетического анализа генов NP, NS, PB1 – с вирусами гриппа, которые циркулируют в Норвегии и Швеции, в то время как по гену PB2 вирус имеет связи с азиатскими вирусами.

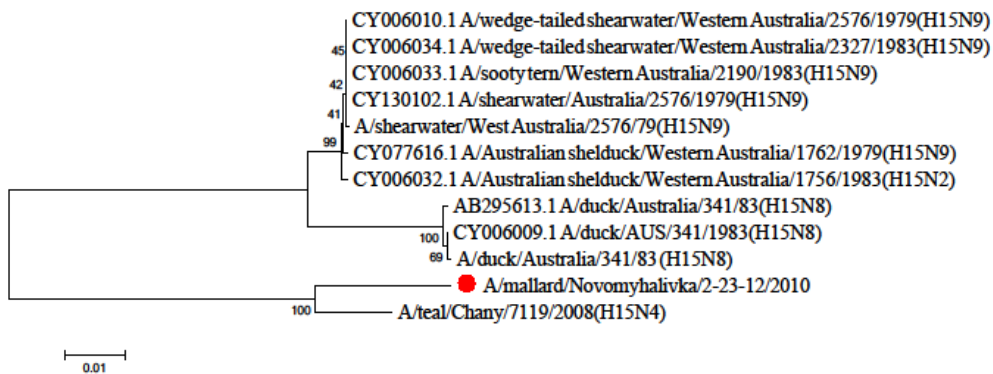


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное по результатам секвенирования полного гена НА вируса гриппа А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 подтипа H15N7 (украинский вирус обозначен маркером)

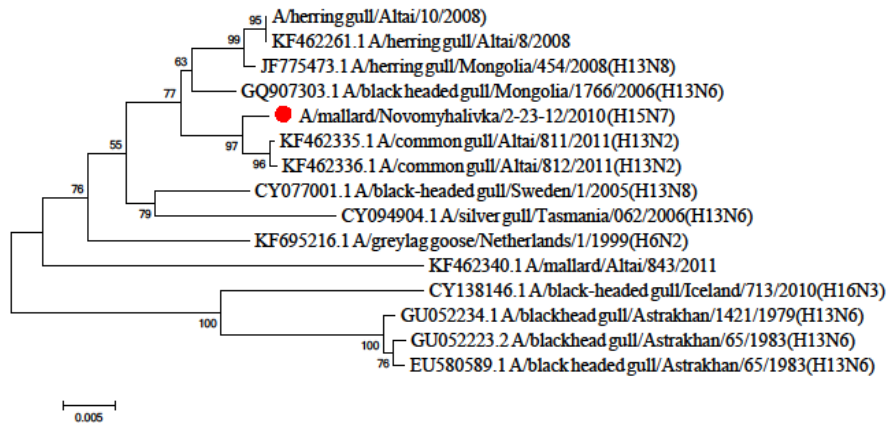


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по результатам секвенирования полного гена М вируса гриппа А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 подтипа H15N7 (украинский вирус обозначен маркером)

Вирус А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 (H15N7) хорошо культивируется на куриных эмбрионах 9–11 суточного возраста при инфицировании в алантоисную полость с накоплением гемагглютининов в титре 1:512 на протяжении 4–5 дней. При титровании на куриных эмбрионах установлено, что инфекционный титр составил $6,5 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Этот вирус не вызывает гибели куриных эмбрионов на протяжении 120 часов после инфицирования, имеет хорошие антигенные свойства и при иммунизации взрослых кур инактивированным антигеном с адьювантом вирус через 30 дней после однократного введения в дозе $1,0 \text{ см}^3$ вызывает образование специфических антител в титрах от 1:64 до 1:1024 в РЗГА. По результатам ИФА и РЗГА первые антитела в сыворотке крови были выявлены у 10–60 % кур уже через 7 дней.

Выводы. Учитывая географическое расположение, природные, климатические условия Азово-Черноморского региона, а также тот факт, что это одно из крупнейших в Восточной Европе мест массового скопления диких птиц различных экологических комплексов во время миграции и гнездования, проведение постоянного эпизоотологического мониторинга является крайне необходимым и актуальным как с практической, так и с научной точки зрения. Этот регион является одним из важных «ключевых точек» мониторинга циркуляции гриппа в популяциях диких птиц.

При проведении широкомасштабных мониторинговых исследований диких птиц в Азово-Черноморском регионе Украины впервые в Восточной Европе изолирован вирус гриппа птиц А/кряква/Новомихайловка/2-23-12/10 (H15N7). По результатам секвенирования установлена низкопатогенная природа этого изолята, а также его родство с вирусами гриппа различных подтипов из Западной Сибири, Западной Европы и Азии.

Изучены биологические свойства низкопатогенного вируса гриппа H15N7 и, при этом, установлено, что он хорошо культивируется на куриных эмбрионах с накоплением гемагглютининов в титрах 1:128–1:512, инфекционный титр составил $6–6,5 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Вирус обладает хорошими антигенными свойствами: при однократном внутримышечном введении инактивированных образцов через 30 дней вызывает образование специфических антител в титрах от 1:64 до 1:1024 в РЗГА, что позволяет использовать их для приготовления инактивированных антигенов и сывороток для серологической диагностики гриппа птиц.

Список литературы

1. New influenza virus discovered in Guatemalan fruit bat [Электронный ресурс] / Press Release CDC, For Immediate Release – способ доступа: http://www.cdc.gov/media/releases/2012/p0227_Guatemala_Fruitbats.html – 27.02.2012 - Загл. с экрана.
2. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Электр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int> – Загл. с экрана
3. A laboratory manual for the Isolation, identification, and characterization of avian pathogens [Текст]: Fifth edition. - Madison.: OmnoPress, 2008. - 250 p.
4. Fouchier, R.A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls [Текст] // *J. Virol.* – 2005. - № 79(5). – P. 2814-2822.
5. NCBI Influenza Virus Database [Электронный ресурс] – способ доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi> – Загл. с экрана.
6. Sivay, M.A. Influenza A (H15N4) Virus Isolation in Western Siberia, Russia [Текст] // *Journal of Virology.* - Volume 87. - Number 6. - P.3578–3582

BIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW PATHOGENIC INFLUENZA VIRUS OF N15N7 SUBTYPE ISOLATED IN EASTERN EUROPE FOR THE FIRST TIME

Muzyka D.V.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv

Background: Continuous monitoring of influenza viruses circulating in the natural reservoir in wild birds is an important part of monitoring, early warning and forecasting of epizootic and epidemiological situation with influenza. These studies allow getting much valuable information on the environmental features of influenza viruses' circulation, new ecological niches of viruses, to detect new variants of the virus and establish their introduction into new geographic regions.

Methods: Monitoring of influenza viruses in wild birds of 27 families of 8 genera was conducted in 2009–2011 in the Azov-Black Sea region of Ukraine. There were conducted virological studies of biological material (cloacal, nazoral swabs and fecal samples) from wild birds of 66 species as recommended by the OIE.

Results: As part of the monitoring of wild bird influenza in 2010 it was isolated influenza virus subtype H15N7 (A/mallard/Novomychalivka/2-23-12/10) from clinically healthy wild mallard (*Anas platyrhynchos*) in the Azov-Black Sea region of Ukraine. This virus is well cultivated in chicken embryos without causing their death. The HA titer was 1:512 and infectious titer – $6,5 \lg \text{EID}_{50}/0,2 \text{ ml}$. Till this time this subtype of viruses was circulated only in wild birds of Australia, but in 2008 the virus A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) was isolated from wild birds in Western Siberia (Russia).

We conducted the sequencing of complete gene of H15N7 (A/mallard/Novomychalivka/2-23-12/10) influenza virus. It was found that by the results of phylogenetic analysis of HA15 gene Ukrainian virus closely

related to the virus A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) from Russia, and by the results of N7 gene sequencing it related to the avian influenza viruses of H7N7, H10N7 subtypes circulating in wild birds in Western Europe. Gene M sequencing allowed to revealed a close relationship with influenza viruses of different subtypes of Altai (Russia) and Mongolia, by phylogenetic analysis of NP, NS, PB1 genes revealed that the Ukrainian virus is related to influenza viruses of different subtypes of Norway and Sweden, and by PB2 gene sequencing the - with influenza viruses of Asian origin.

Conclusions: Our results demonstrate that it was isolated avian influenza virus of H15N7 subtype in first time, from wild birds of Eastern Europe which is reassortant between influenza viruses of different subtypes of Western Europe, Western Siberia and Asia. These results support the need for monitoring continuing of influenza viruses circulating in the Azov-Black Sea region in order to study the characteristics of their circulation and the possible introduction of new genetic variants of the virus.

Keywords: low pathogenic influenza virus, wild birds

УДК 619:616.98:579.842.23:579.253:616-97

ВИВЧЕННЯ МІНЛИВОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА АНТИГЕННОЇ СПОРІДНЕНОСТІ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Обуховська О.В., Драгуть С.С., Чебанюк І.В., Рамазанова Т.П., Куценко В.А., Марченко Н.В.
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, e-mail: olgaobukhovska@gmail.com

У роботі наведено дані щодо вивчення мінливості та антигенної спорідненості музейних штамів *Yersinia enterocolitica*. Відібрано виробничі клони ієрсиній сероварів O3, O5, O6.30, O8, O9. Вивчено їх культуральні, біохімічні та антигенні властивості. Встановлена наявність антигенної спорідненості серовару *Yersinia enterocolitica* O5 із сероварами *Yersinia enterocolitica* O3 та O6.30. Не встановлено антигенної спорідненості сероварів O9 та O8 з іншими сероварами ієрсиній. Розроблено «Лабораторний регламент щодо виготовлення компонентів набору для діагностики ієрсиніозів тварин».

Ключові слова: *Yersinia enterocolitica*, антигенна спорідненість; серологічна діагностика; реакція аглютинації.

Ієрсиніозна інфекція являється небезпечним зооантропонозом та має значне поширення у світі. Кишковий ієрсиніоз зареєстровано практично в усіх країнах Європи, Африки, Азії, в США, Канаді та інших. Значне розповсюдження збудників кишкового ієрсиніозу в нашій країні та за кордоном дає підставу вважати, що ця інфекція відіграє значну роль в патології тварин і людей. В Україні кишковий ієрсиніоз на цей час вивчається недостатньо, тому дослідження в експериментальних умовах культуральних, біохімічних та антигенних властивостей *Yersinia enterocolitica*, зокрема сероварів O3, O5, O6.30, O8, O9 має актуальне значення. А розробка вітчизняних засобів для діагностики ієрсиніозу тварин є найважливішим напрямком роботи фахівців ветеринарної науки на сьогоднішній день.

Мета роботи. Вивчення мінливості біологічних властивостей та антигенної спорідненості музейних штамів *Yersinia enterocolitica* сероварів O3, O5, O6.30, O8, O9.

Матеріали та методи. Клонування музейних штамів *Yersinia enterocolitica* сероварів O3, O5, O6.30, O8, O9 проводили на МПА. З кожного штаму було отримано по 3 клони. У отриманих клонів шляхом мікроскопії пофарбованих за Грамом мазків були вивчені морфологічні, а також культурально-біохімічні властивості. Для цього клони вказаних штамів були висіяні на щільні та напіврідкі поживні середовища (МПА, МПБ, МПНРА, агари Ендо, Хотінгера); інкубували за температури (25–28) °С та за температури (36–37) °С. Також були здійснені висіви на середовища для перевірки наступних культурально-біохімічних властивостей: окислення глюкози, ферментація лактози, маніту, сорбіту, мальтози, рамнози, рафінози й здатність утворювати кислоту та газ на середовищах з вуглеводами; визначення здатності утворювати індол та сірководень; наявність каталазої активності; здатність розщеплювати уреазу; реакції Фогес-Проскауера та з метиловим червоним; здатність до росту на цитратному агарі Сіменса та на ацетатному агарі.

Антигенні властивості клонів штамів *Yersinia enterocolitica* вивчали в реакції аглютинації (РА) на склі із моноспецифічними ієрсиніозними сироватками.

Для виготовлення ієрсиніозних сироваток були використані клінічно здорові кролі вагою 2,5 кг. Імунізацію кролів було проведено антигенами штамів *Y. enterocolitica* сероварів O3, O5, O6.30, O8, O9. Для одержання антигенів культури ієрсиній висівали на МПА або агар Хотінгера і вирощували за (25–28) °С протягом 24 годин. Після перевірки на чистоту росту культури змивали стерильним фізрозчином, доводили концентрацію бактерій до 20 млрд. м.к./см³ за оптичним стандартом каламутності та кип'ятили на водяній бані протягом 60 хв. Одержану суспензію охолоджували й центрифугували за 6000 об/хв.