

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ІНЦ «ЕКВМ»

доктор ветеринарних наук,

професор, академік НААН

«_____» _____ 2018 р.

«_____» _____ 2018 р.

АКТ

дослідження біологічних властивостей вірусу високопатогенного грипу птиці підтипу H5N8 штаму А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016

Дослідження біологічних властивостей вірусу високопатогенного грипу птиці підтипу H5N8 штаму А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 були проведені на базі відділу вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» спільно з представниками Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи в період з січня 2018 року по серпень 2018 року.

Мета досліджень: вивчити біологічні властивості нового антигенного варіанту вірусу високопатогенного грипу птиці підтипу H5N8, який вперше виділено в Україні в 2016-2017 роках.

Матеріали та методи досліджень.

Вірус: штам А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 H5N8, І пасаж від 29.12.2016р.

Референтні сироватки крові: належність штаму до вірусу грипу підтипу H5 визначали в РЗГА з використанням референтних сироваток крові до орто- та параміксовірусів з референс-лабораторій Veterinary Laboratories Agency (Англія, Вейбрідж), Референс-лабораторії з грипу Міжнародного епізоотичного бюро Інституту Зоопрфілактики (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, м. Падуя, Італія) підтипів H1N1, H2N3, H3N8, H4N8, H5N3, H6N2, H7N3, H8N4, H9N7, H10N1, H11N9, H12N5, H13N6, H14N5, H15N9, H16N3, АPMV-1, АPMV-2, АPMV-3, АPMV-4, АPMV-6, АPMV-7, АPMV-8, АPMV-9 за загальноприйнятими методиками.

Визначення біологічної активності. Дослідження біологічної активності (визначення титру) вірусів грипу проводили на 9-10-добових курячих ембріонах (КЕ). Титрування вірусів проводили за загальноприйнятою методикою. Для цього готували десятикратні розведення вірусу від 10^{-1} до 10^{-10} на ФСБ. На кожне розведення брали 4 –6 КЕ. Титр біологічної активності виражали в ЕІД_{50/0,1 см3}, урахувавши наявність гемаглютининів в екстраембріональній рідині, а також у ЕІД_{50/0,1 см3}, урахувавши кількість загиблих КЕ. Розрахунок титру проводили за методом Ріда та Менча.

Відсутність контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою. Визначення відсутності контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою проводили згідно з ДСТУ4483.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили у лабораторії молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Секвенування вірусів проводили в у Інституті Фрідріха Лoeffлера (Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health) (о. Римс, Німеччина).

Результати досліджень.

Ідентифікація вірусу. Результати серологічної ідентифікації штаму вірусу високопатогенного грипу птиці А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 (H5N8) в РЗГА з використанням референтних сироваток крові наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати серологічної ідентифікації в РЗГА

Підтип	А/гуска білолоба/АН/1-15-12/16
H1N1	-
H2N3	-
H3N2	-
H4N8	1:512
H5N2	1:256
H5N3	-
H5N1	1:32
H6N2	-
H7N3	-
H7N7	-
H8N4	-
H9N2	-
H10N1	-
H11N9	-
H12N5	-
H13N6	-
H14N5	-
H15N9	-
H16N3	-
PMV-1	-
PMV-2	-
PMV-3	-
PMV-4	-
PMV-6	-
PMV-7	-
PMV-8	-
PMV-9	-

Установлено, що позитивні референтні сироватки крові до вірусу грипу підтипу H5 (з різними підтипами нейрамінідази H5N2, H5N1) затримували гемаглютинацію ізолятів (робоча доза вірусу 4 ГАО) у титрах від 1:32 до

1:256. Необхідно зазначити, що усі інші позитивні референтні сироватки крові з антитілами до вірусів грипу та параміксовірусів птиці серотипів 1–9 не викликали затримки гемаглютинації, за виключенням референтної сироватки до вірусу грипу підтипу H4N8, яка також викликала затримку гемаглютинації в титрі 1:512 – 1:1024. Наявність затримки гемаглютинації усіх ізолятів з референтною сироваткою крові H4N8 пов'язано з наявністю перехресної реакції між нейрамінідазою N8.

Таким чином, зазначений штам належить до вірусу грипу підтипу H5.

Вивчення гемаглютинуючої активності вірусу, інфекційного та летального титру вірусу. При постановці РГА в 1% еритроцитів півня встановлено, що титр гемаглютининів в екстраембріональній рідині 1:32 – 1:64 (при первинному виділенні), але при подальшому пасажуванні вірусу на KE титр гемаглютининів в екстраембріональній рідині становив 1:128-256.

Результати визнання інфекційного та летального титру наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати титрування вірусу високопатогенного грипу підтипу H5N8 після первинного виділення (I пасаж).

Розведення	Кількість KE, шт.	Час спостереження, год			Результати РГА	Летальність, %	Інфікованість, %
		24	48	72			
		Кількість загиблих ембріонів					
10 ⁻¹	4	-	2	2	+++-	100	96,15
10 ⁻²	4		2	2	++++	100	95,65
10 ⁻³	4		1	3	+---	100	81,81
10 ⁻⁴	4		-	4	+++-	100	77,27
10 ⁻⁵	4		-	4	++++	100	73,68
10 ⁻⁶	4		-	4	++--	100	58,82
10 ⁻⁷	4		-	4	++++	100	53,33
10 ⁻⁸	4		-	4	++++	100	36,36
10 ⁻⁹	4		-	-	----	0	0
10 ⁻¹⁰	4		-	-	----	0	0
Контроль неінф. KE	4				----	0	0
Летальний титр, ЕЛД ₅₀ , lg						8,5	-

Інфекційний титр, ЕІД ₅₀ , Іg	-	7,19
Примітки: + — наявність гемаглютининів (позитивна РГА), — відсутність гемаглютининів (негативна РГА)		

Встановлено, що вірус високопатогенного грипу птиці А/гуска білолоба/АН/1-15-12/1016 Н5N8 при первинному виділенні на КЕ мав летальний титр 8,5 Іg ЕІД₅₀, а інфекційний 7,87 Іg ЕІД₅₀.

Відсутність контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою. Визначення відсутності контамінації сторонньою бактеріальною та грибовою мікрофлорою проводили згідно з ДСТУ4483.

Протягом строку спостереження в жодній та жодному флаконі не виявлено росту мікрофлори.


Вірус грипу Н5N8 А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 вільний від бактеріальної та грибової мікрофлори.

Молекулярно-генетичні дослідження. Патогенність вірусу визначали за результатами секвенування сайту розрізання гемаглютиніну. Установлено, що сайт розрізування гемаглютиніну має наступний вигляд SPLREKRRKR*GLF, що є характерним для високопатогенних вірусів грипу.


За результатами філогенетичного аналізу цей вірус належить до кладу 2.3.4.4b високопатогенних вірусів грипу підтипу Н5 та має філогенетичні зв'язки з вірусами з Росії та Західної Європи, які циркулювали в 2017 році.

Висновок: Досліджені зразки штаму вірусу грипу Н5N8 А/гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 відповідають паспортним даним за перевірними показниками (серологічна ідентифікація, біологічні властивості, контамінація бактеріальною та грибовою мікрофлорою, молекулярно-генетичні) та можуть бути задепоновані у Національному центрі штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

Підписи:


Д.В. Музика


О.М. Рула


С.В. Ткаченко


О.В. Піщанський