

На правах рукописи

ВИТКОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА ПТИЦ**

Специальность 16.00.03 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Щелково 2009



ВИТКОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА ПТИЦ**

Специальность 16.00.03 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Щелково 2009

Работа выполнена на кафедре ветеринарной вирусологии ФГОУ ВПО
«Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии имени К.И. Скрябина»

Научный руководитель: Заслуженный работник высшей школы РФ,
Лауреат премии правительства РФ,
доктор ветеринарных наук, профессор
Белоусова Раиса Васильевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Белоусов Василий Иванович
доктор биологических наук,
профессор
Верховский Олег Анатольевич


Ведущая организация: ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья
животных» (ФГУ ВНИИЗЖ)

Защита состоится «19» июня 2009 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета
по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук
Д.006.069.01 во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом
институте биологической промышленности по адресу: 141142, Московская область,
Щелковский район, п/о Кашинцево, ВНИТИБП, E-mail: vnitibp@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИТИБП

Автореферат разослан «18» мая 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических



Ю.Д. Фролов

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Промышленное птицеводство – наиболее индустриально развитое направление сельского хозяйства, как в России, так и за рубежом. В нашей стране птица в большом количестве разводится в индивидуальных подворьях граждан, особенно в южных регионах Российской Федерации. В настоящее время во всем мире наибольшее беспокойство вызывает высокопатогенный вирус гриппа птиц (ВПГП) – болезнь, известная также под названием классическая чума птиц, вызываемая вирусами, относящимися к семейству *Orthomyxoviridae*, типу А. Наиболее восприимчивы к вирусу гриппа птиц куры и индейки.

На протяжении последних десяти лет ситуация по гриппу птиц в мире заметно осложнилась. Значительные экономические потери имели место в промышленном птицеводстве различных стран. Только в 2005г. потери в сельскохозяйственном секторе стран Азии оценивались приблизительно в 10 млрд. долларов.

Ситуация по гриппу птиц значительно осложняется в связи с возросшей опасностью для человека, так в 2008 г. общее количество подтвержденных ВОЗ случаев заболеваний, вызванных вирусом гриппа птиц А/Н5N1 у людей, достигло 359, из которых 226 с летальным исходом.

Впервые вспышки гриппа птиц Н5N1 были зарегистрированы в России в июле 2005 г. в Новосибирской области. По данным Россельхознадзора всего с 2005 г. по 2008 г. в России было выявлено в 20 субъектах 179 очагов высокопатогенного гриппа Н5N1, суммарные потери составили – 2,8 млн. голов птицы.

Резервуаром гриппа птиц в природе является дикая водоплавающая птица. Сезонная миграция диких перелетных птиц способствует широкому распространению возбудителя инфекции. Несмотря на предпринятые в мире меры по контролю над болезнью, она продолжает распространяться и вызывать вспышки среди домашних и диких птиц. Существует потенциальный риск возникновения не только панзоотий, но и пандемий, в случае появления высоко патогенных для человека рекомбинантных штаммов, полученных в результате взаимодействия вирусов гриппа птиц, свиньи и человека.

До 2005 г. в нашей стране в лабораторной практике с целью диагностики гриппа птиц использовались только вирусологический (заражение куриных эм-

брюнов) и серологический (РТГА) методы исследований. С 2005 г. стали активно внедряться такие методы экспресс - диагностики, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА). В связи с этим возникла необходимость в проведении сравнительных испытаний, сопоставлений новых и классических методов исследований и определении схем проведения лабораторных исследований для диагностики гриппа птиц.

С 2006 г. в Российской Федерации в зонах риска проводится иммунизация птицы инактивированной вакциной из штамма H5N1. Используются вакцины двух биологических предприятий: «Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная» производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов» и ФЛУ ПРОТЕКТН5 производства ФГУП «Ставропольская биофабрика». В среднем, напряженность поствакцинального иммунитета к гриппу птиц в зонах риска на территории Российской Федерации составила: в 2006 г. - 60%, а в 2007 г. - 40%, поэтому большой интерес представляло изучение возможности повышения уровня поствакцинального иммунитета с помощью препаратов-иммуностимуляторов (фоспренила и сальмозана).

Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлось усовершенствование системы лабораторной диагностики и профилактики гриппа птиц.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. провести анализ распространения вируса гриппа птиц типа А, подтипа H5N1 в мире (по данным МЭБ и ВОЗ) и на территории России (по данным Россельхознадзора, отчетов ветеринарных лабораторий по мониторингу гриппа птиц в Российской Федерации) с 2000 по 2007 г.г.;
2. изучить клинические признаки и патологоанатомические изменения при гриппе у различных видов птиц;
3. провести сравнительное изучение вирусологических, молекулярно-биологических (ПЦР), иммунохроматографических методов при детекции высокопатогенного вируса гриппа птиц в патологическом материале;
4. изучить биологические и генетические свойства выделенных изолятов;

5. провести сравнительное изучение серологических методов исследований (РТГА и ИФА) в целях мониторинга высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории Московской области;

6. изучить напряженность поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа H5N1 у различных видов птиц;

7. изучить влияние препаратов-иммуностимуляторов (фоспренила и сальмозана) у кур (цыплята-бройлеры 40-60 дн. возраста) на напряженность поствакцинального иммунитета при совместном их применении с инактивированной гидроокисьалюминиевой формолвакциной против гриппа птиц, изготовленной из эпизоотического штамма (H5N1) ОАО «Покровский завод биопрепаратов».

Научная новизна.

Впервые изучено распространение вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации с 2000 по 2007 г.г.

Изучены биологические и генетические свойства выделенных изолятов высокопатогенного вируса гриппа птиц (10) при вспышках болезни на территории нашей страны.

Изучена напряженность поствакцинального иммунитета у птиц иммунизированных в зонах риска инактивированными вакцинами против гриппа птиц на территории Российской Федерации.

Разработаны научно обоснованные схемы лабораторных исследований, позволяющие в 100% случаев диагностировать грипп птиц в максимально короткие сроки (в течение суток методом ПЦР).

Доказано иммуностимулирующее действие препаратов фоспренила и сальмозана у цыплят бройлеров, при совместном их применении с инактивированной вакциной, что позволяет повысить напряженность поствакцинального иммунитета.

Практическая значимость.

Предложенные схемы исследований позволили упорядочить проведение лабораторного мониторинга гриппа птиц на территории Российской Федерации, что в свою очередь, дало возможность в большей степени контролировать распространение данной инфекции в регионах нашей страны. В результате проведенных работ выделены новые изоляты вируса гриппа птиц типа H5N1, про-

ведена их идентификация и генетический анализ. Внедрена система контроля напряженности поствакцинального иммунитета у вакцинированной против гриппа птицы в субъектах Российской Федерации. Разработан пакет нормативно-методической документации необходимой для проведения лабораторных исследований в целях мониторинга гриппа птиц:

1. «Методические указания по лабораторному мониторингу гриппа птиц на территории Российской Федерации» (утверждены 17 ноября 2008 г. Россельхознадзором);

2. «Методические рекомендации по определению напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа птиц в реакции торможения геммагглютинации (РТГА)» (утверждены ректором ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» 05.05.2009 г.);

3. «Методические рекомендации по проведению лабораторных исследований на грипп птиц» (утверждены ректором ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» 05.05.2009 г.).

Установлено влияние иммуностимулирующих препаратов (фоспренил и сальмозан) на напряженность поствакцинального иммунитета к гриппу птиц после иммунизации инактивированной вакциной из штамма H5N1, изготовленной ОАО «Покровский завод биопрепаратов».

Апробация результатов диссертации.

Результаты работы доложены и обсуждены на: научно-практической конференции молодых ученых ФГОУ ВПО МГАВМиБ (г. Москва, 2005 г.); II международной конференции по болезням диких животных, г. Москва 2007 г.; международном семинаре по гриппу птиц, организованном МАГАТЭ, Вена, 2009 г.; курсах повышения квалификации ФГУ ЦНМВЛ по теме: «Лабораторные методы диагностики гриппа птиц» и «Диагностика вирусных болезней птиц» 2005г., 2006 г., 2007 г.; семинарах руководителей и специалистов ветслужб, организованных НОУ «Межрегиональным учебно-нормативным центром ветеринарной службы» г. Сочи 2006 г., 2007 г.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 – в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Результаты анализа распространения гриппа птиц на территории Российской Федерации по данным Россельхознадзора и результатам лабораторного мониторинга за период с 2000-2007 г.г., проведенного ветлабораториями Российской Федерации.

2. Результаты клинических и патологоанатомических исследований при гриппе птиц.

3. Результаты сравнительных ПЦР, иммунохроматографического и вирусологического методов исследований.

4. Результаты сравнительных испытаний методов ИФА и РТГА.

5. Результаты анализа напряженности поствакцинального иммунитета гриппа птиц на территории Российской Федерации.

6. Результаты изучения влияния иммуностимулирующих препаратов (фоспренила и сальмозана) на напряженность поствакцинального иммунитета к гриппу птиц после иммунизации инактивированной вакциной из штамма H5N1, изготовленной ОАО «Покровский завод биопрепаратов».

Объем и структура диссертации.

Материалы диссертации изложены на 127 страницах машинописного текста и включают введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, список использованной литературы (103 источника, из которых 50 отечественных и 53 иностранных). Работа содержит 22 таблицы, 34 рисунков и 41 страниц приложений.

Личный вклад соискателя

Представленная диссертационная работа является результатом собственных научных исследований автора.

Работа по генетическим исследованиям выполнялась на базе ФГУ «ВНИИЗЖ», ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии». Автор выражает благодарность за участие в выполнении отдельных фрагментов диссертации сотрудникам ФГУ «ВНИИЗЖ» Н.С. Мудрак, В.Н. Ирза, А. В. Фролову; сотрудникам ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Г. А. Шипулину, С.Б. Яцышиной, Т.С. Астаховой,

НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского сотрудникам Д.К. Львову, М.Ю. Щелканову, С.С. Ямниковой.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в период с 2004 по 2007 годы на кафедре ветеринарной вирусологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И.Скрябина и ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория».

При изучении распространения гриппа птиц на территории России использованы: данные отчетов государственных ветеринарных служб и ветеринарных лабораторий субъектов Российской Федерации с 2000 по 2007 г.г.; результаты собственных исследований (с 2005 по 2007 г.г.) материалов, поступивших в ФГУ ЦНМВЛ из неблагополучных по гриппу птиц регионов, в том числе, из Московской области.

В работе были использованы:

- патматериалы (кусочки внутренних паренхиматозных органов, головного мозга, кишечника), отобранные от трупов павших или убитых, с диагностической целью, больных и подозреваемых в заражении гриппом птиц;
- аллантоисные жидкости зараженных куриных эмбрионов;
- пробы сыворотки крови от невакцинированной птицы из птицеводческих хозяйств, индивидуальных подворий граждан, от синантропной и дикой птицы; от вакцинированной птицы, поступившей для оценки поствакцинального иммунитета;
- эмбрионы СПФ кур (производства Щелковского биокомбината, Московская область);
- культуры клеток фибробластов куриных эмбрионов, МДБК, СПЭВ, Таурис-1;
- наборы ПЦР производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора;
- наборы антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и обнаружения антител (ОАО «Покровский завод биопрепаратов», г. Покров Владимирской области);
- наборы для выявления антител к вирусу гриппа птиц (ВГП) иммуноферментным анализом (производитель ООО «НПП АВИВАК», г. Москва);

- наборы для выявления антител методом ИФА и РДП производства ФГУ ВНИИЗЖ;

- инактивированная гидроокисьалюминиевая формолвакцина против гриппа птиц из эпизоотического штамма H5N1 производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов»;

- бройлеры 40 дневного возраста,

- препараты иммуностимуляторы: фоспренил (продукт фосфорилирования полипренолов хвон) и сальмозан (препарат бактериального происхождения -полисахарид из O соматического антигена сальмонелл), производитель препаратов – ЗАО «Микро-плюс».

Среды и реактивы: Среды Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов, среда 199 (ФГУП ПИПВЭ РАМН); среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM) (Sigma, восстановлены из других сред); 0,02% раствор Версена, раствор Хенкса (ГУП Полиомиелита), химопсин (ООО «САМСОН-МЕД») и другие среды, реактивы и реагенты в соответствии с действующей нормативной документацией. Лабораторные исследования на грипп птиц проводились в соответствии с действующими нормативными документами.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятности Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. В качестве достоверного интервала был выбран уровень вероятности $P=0,95$, уровень значимости $p<0,05$.

Результаты исследований

1. Изучение распространения гриппа птиц в мире и на территории Российской Федерации. Для выяснения широты распространения гриппа птиц нами были проанализированы данные МЭБ по распространению гриппа птиц в мире, а также данные официальной отчетности ветеринарных служб и межобластных ветеринарных лабораторий ветеринарных субъектов Российской Федерации за 2000-2007г.г.

На протяжении последних десяти лет ситуация по гриппу птиц в мире значительно осложнилась. Вспышки гриппа птиц типа А, подтипа H5N1 регистрировались, по данным МЭБ, более чем в 50 странах. Значительные экономические потери имели место в промышленном птицеводстве различных

стран. По данным ВОЗ от 24.02.09 среди домашних птиц новые вспышки инфекции, вызванные высокопатогенным вирусом гриппа H5N1, зарегистрированы во Вьетнаме, Лаосе, Бангладеш, Непале и Индии. В реестре стран, неблагополучных по высокопатогенному гриппу H5N1, Россия занимает 7 место. По данным ВОЗ с 2003 по 2008 г.г. заболело 359 человек, из которых в 226 случаях отмечался летальный исход. В Российской Федерации грипп птиц H5N1 был впервые зарегистрирован в 2005 г. в д. Суздалка, Новосибирской области, с 2005 по 2008 г. было зарегистрировано 179 очагов в 20 субъектах России, потери составили 2,8 млн. голов птицы. Как правило, вспышки заболевания были связаны с миграционными путями перелетных птиц.

С 2000 г. по 2007 г. в ветлаборатории России с целью диагностики гриппа птиц поступило 81994 проб патологических и биоматериалов, по которым было проведено исследований: 4348 вирусологических и 103621 методом ПЦР и/или РВ-ПЦР. Положительные результаты по обнаружению генома или выделению вируса H5N1 начали выявлять лишь с 2005 г. и, включительно по 2007 г., было получено 1169 положительных результатов, что составляет 1,4% от количества поступившего материала. При этом в 54,9% вирус H5N1 выявляли у домашней птицы в периоды эпизоотий и 45,1% у дикой птицы во время вспышек, а также у клинически здоровой птицы в процессе проведения мониторинговых исследований. Среди домашних видов птиц наибольший процент выявления приходится на кур – 67,6%, у гусей – 5,6% , у уток -1,9% . При исследовании диких видов птиц в 20,6% случаев генетический материал был выявлен у водоплавающей птицы и птицы околородного комплекса, в 43,8 % у синантропной птицы.

За тот же период было проведено 3380497 исследований проб сыворотки крови на наличие антител к вирусу гриппа птиц H5 методом РТГА, получено 927 положительных результатов. Наибольшее количество серопозитивных результатов выявляли: у диких водоплавающих птиц и птиц околородного комплекса – 81,5%; у домашней птицы – 14,7%; у синантропной – 3,1%.

Было изучено распространение гриппа птиц на территории Московского региона: первичный очаг - Птичий рынок ОАО Садовод ЮВАО, г. Москвы и 9

вспышек в Московской области; 1вспышка в Калужской области. Отличительная особенность данной эпизоотии заключается в том, что она не была связана с миграцией диких перелетных птиц.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что возбудитель болезни широко распространен в мире, а также на территории нашей страны у различных видов птиц. Птицеводство многих стран несет колоссальные потери. Предполагаемые экономические потери в мире, по расчетам Всемирного банка (Саммит 8 – июнь 2007 г.), «могут составить до 800 миллиардов долларов только за первый год пандемии». Существует потенциальный риск возникновения не только панзоотий, но и пандемий, в случае появления высокопатогенных для человека рекомбинантных штаммов, полученных в результате взаимодействия вирусов гриппа птиц, свиньи и человека. В связи с вышесказанным, проблема гриппа птиц остается актуальной и требует пристального внимания.

1. Изучение клинических признаков и патологоанатомических изменений. Клинические и патологоанатомические признаки изучались нами при вспышках гриппа в период с 2005 по 2007 г.г., Впервые на территории нашей страны эпизоотии были связаны с высокопатогенным возбудителем гриппа птиц, заболеваемость и смертность у кур и индеек достигали 100%.

Наблюдали острое и сверхострое течение заболевания. Отмечали поражения респираторного и желудочно-кишечного трактов, центральной нервной системы. Заболеванию была подвержена птица различных возрастных групп и видов: домашняя, синантропная (скворцы, вороны) и дикая птица (лебеди, лысухи и т.д.). Наблюдали короткий инкубационный период от 1 до 7 дней. Отмечалась депрессия, судороги, параличи, конъюнктивит, отек подкожной клетчатки головы и шеи, истечения из носовой и ротовой полостей, синюшность гребня и сережек, хрипы, диарея. Наиболее чувствительны к заболеванию были куры и индейки.

Патологоанатомические признаки были характерны для высокопатогенного гриппа птиц, отмечались: воспаление конъюнктивы, ринит, трахеит, кровоизлияния на серозных покровах, мышцах, подкожной клетчатке, коже, во внутренних органах (респираторных органах и желудочно-кишечном тракте, печени, селезенке, почках, репродуктивных органах), катарально-

геморрагический энтерит, перикардит, гиперемия и отек головного мозга. Патологоанатомические изменения наблюдались во всех органах и тканях. У водоплавающей птицы наблюдалось помутнение роговицы.

Таким образом, впервые на территории нашей страны эпизоотии были связаны с высокопатогенным возбудителем гриппа птиц. Впервые заболевание регистрировалось не только у домашних, но и у синантропных (скворцы, вороны, галки), а также у диких водоплавающих (утки, гуси, лебеди) видов птиц. Клинические и патологоанатомические изменения наблюдались у птицы различных возрастных групп и видов. У водоплавающей птицы наблюдалось помутнение роговицы, признак ранее не упоминавшийся в литературных источниках. Течение болезни носило, как правило, острый и сверхострый характер, поражались все органы и ткани. При сверхостром течении отмечалось в ряде случаев лишь поражение центральной нервной системы (отек, гиперемия и кровоизлияния головного мозга).

2. Сравнительное изучение вирусологических, молекулярно-биологических (ПЦР), иммунохроматографических методов при детекции высокопатогенного вируса гриппа птиц в патматериале.

В целях обнаружения и выделения вирусов гриппа птиц нами было исследовано 5404 пробы материалов более чем от 70 видов птиц из 30 субъектов Российской Федерации. Исследовано проб материалов: патматериалов - 3670, помет - 1385, смывы клоакальные - 113, смывы трахеальные - 113, яйца кур - 82, куриные эмбрионы - 7, пробы корма - 31, мясо кур - 3.

Таблица № 1

Результаты вирусологических и ПЦР исследований на грипп птиц
с 2005 по 2007 г.г.

год	ПЦР	Вирусологический	Кол-во положительных результатов
2005	369	8	6
2006	2742	95	82
2007	2293	52	52
Итого	5404	155	140

Как видно из таблицы 1 за 2005-2007 г.г. было проведено исследований 5404 методом ПЦР и 155 вирусологическим методом, получено; 140 положительных результатов.

Были проведены сравнительные исследования 100 проб патологических материалов различными методами: вирусологическими (на куриных эмбрионах) и новыми методами лабораторной диагностики для обнаружения вируса гриппа птиц типа А H5N1, такими как: ПЦР и иммунохроматографический.

Таблица № 2

Результаты сравнительных исследований на гриппи птиц при использовании вирусологического метода (КЭ) и ПЦР

Наименование метода		Кол-во проб	положительных	отрицательных
ПЦР	позитив	100	50	5
	негатив		0	45
Вирусологические исследования (КЭ)		100	50	50

При проведении сравнительных исследований, как видно из таблицы 2, 100 проб патматериалов установлено, что относительная чувствительность составила 100 %, специфичность 90 %.

В таблице 3 отражены результаты сравнительных исследований метода выделения вируса на куриных эмбрионах и иммунохроматографического метода. Представленные ниже данные свидетельствуют о высокой чувствительности – 98 %, специфичности - 100%.

Таблица № 3

Результаты сравнительных исследований метода выделения вируса (на КЭ) и иммунохроматографического

Наименование метода		Кол-во проб	положительных	отрицательных
иммунохроматографический	позитив	100	49	0
	негатив		1	50
Вирусологические исследования (КЭ)		100	50	50

Учитывая полученные результаты, нами были разработаны 2 схемы исследования патологических и биоматериалов (рис. 1 и рис. 2).

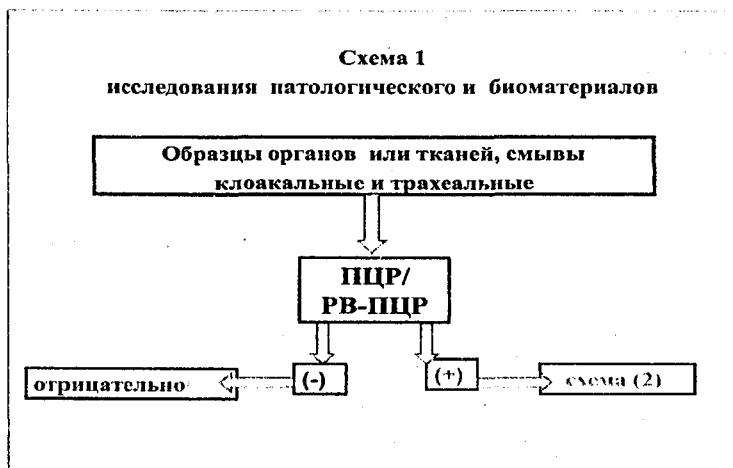


Рисунок 1

По схеме 1. используется только метод ПЦР (RV-ПЦР). Исследования проводятся в целях скрининга, а в случае получения положительных результатов скрининговых исследований и при подозрении на грипп птиц (наличие характерных клинических, патологоанатомических признаков) для установления диагноза используются все, показанные на схеме 2 (рис 2), лабораторные методы исследований.

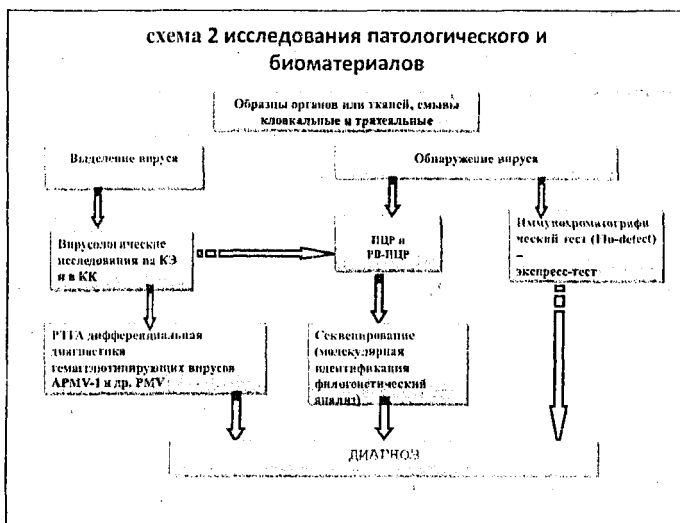


Рисунок 2

1. Следующей задачей было изучение биологических и генетические свойства выделенных изолятов. При изучении биологических свойств 10 положительных изолятов от домашних птиц заражали эмбрионы СПФ кур 9-11 дневного возраста, культуры клеток фибробластов куриных эмбрионов, перевиваемые культуры клеток - МДВК, СПЭВ, Таурус-1. Характерные изменения на куриных эмбрионах (гибель, отставание в росте и развитии, гиперемия тела зародыша, гемолиз аллантоисной и амниотической жидкости, кровоизлияния) наблюдались через 24-48 часов после заражения. На культуре клеток вирус репродуцировался и вызывал ЦПД без добавления трипсина в титре 4,5-5,5 Lg ЦПД 50/мл. Выделенные изоляты в РГА агглютинировали куриные эритроциты в разведениях от 1:4 до 1:32. Во всех случаях вирус был идентифицирован с помощью РТГА и ПЦР как H5 и РВ-ПЦР как H5N1.

Следующим этапом было изучение генетических свойств, выделенных вирусов гриппа птиц. Нами были использованы нуклеотидные последовательности и результаты секвенирования штаммов, любезно предоставленные ФГУ ВНИИЗЖ, ФГУН ЦНИИЭ. В результате генетического анализа изолятов ВГП подтипа H5N1 в сайте нарезания гемагглютинина выявлена нуклеотидная последовательность, кодирующая несколько основных аминокислот, характерных для высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Исследования показали, что выделенные изоляты являются близкородственными вирусам, выделенным в Китае, возникшим в результате реассортации циркулировавших среди диких птиц генетических вариантов вирусов гриппа птиц H5N1. Впервые данный геновариант вируса гриппа птиц H5N1 был выделен у диких водоплавающих птиц озера в провинции Цинхай на пересечении миграционных путей птиц из Южной Азии, Новой Зеландии, Австралии и Сибири. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена H5 (724-1232н) изоляты A/chicken/Moscow/0017/07, выделенные во время вспышек в Московской области в 2007 г. очень близки (более 99% гомологии) изолятам: A/cygnus cygnus/Iran/754/2006 (CY016779, CY016781); A/chicken/Krasnodar/199/06 (DQ864718); A/chicken/Afghanistan/1207/2006 (CY016787); A/Cygnus olor/Italy/742/2006 (DQ412997, CY017037); A/chicken/Mahachkala/05/2006 (DQ676832); A/chicken/Krasnodar/01/2006 (DQ676836) and A/chicken/Krasnodar/0006/07. По результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена Н высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 была показана высокая гомология российских изолятов и изолятов, принадлежащих к генетической линии A/goose/Guangdong/1/96 H5N1 группе Qinghai. Все штаммы имели высокую гомологию (>99%) с вирусами, изолированными от диких водоплавающих птиц во время эпизоотии на озере в провинции Цинхай

Таким образом, при изучении биологических свойств вируса гриппа получены данные, свидетельствующие о высокой патогенности выделенных изолятов для эмбрионов СПФ кур и высокая чувствительность различных культур клеток, без добавления трипсина, к выделенным вирусам H5N1. Генетический анализ показал: все проанализированные в данной работе изоляты (10) по основному молекулярному маркеру патогенности следует отнести к ВПВГП, все варианты из России имеют высокую гомологию (>99%) с вирусами, изолированными от диких водоплавающих птиц во время эпизоотии на озере провинции Цинхай. По результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена Н высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 с последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank была показана высокая гомология российских изолятов и изолятов, принадлежащих к генетической линии A/goose/Guangdong/1/96 H5N1 группе Qinghai.

2. Следующей нашей задачей было проведение сравнительного изучения серологических методов исследований (РТГА и ИФА) при мониторинге высокопатогенного гриппа птиц на территории Московской области. В процессе мониторинга было исследовано 13762 проб сывороток крови птиц, 13005 проб от кур из птицеводческих хозяйств, 496 проб от птицы индивидуальных подворий и 261 проба от дикой птицы. Более 60% проб исследовано из Московского региона. В результате исследований получено 16 положительных результатов: 3 пробы от кур (Рынок Садовод, г. Москва), 5 проб из респ. Мордовия от диких уток, 5 проб из Красноярского края от диких уток и лысух и 3 пробы от больных страусов из Азербайджана (титры антител 1:32- 1:2048).

Для сравнительного изучения серологических методов РТГА и ИФА были исследованы пробы сывороток крови от кур, поступающих из Московского региона. Данные исследований представлены в таблице 4. Сравнительные исследования серологических методов РТГА и ИФА показали следующие результаты: ни одна отрицательная в ИФА сыворотка не дала позитивного результата в РТГА, а выявленные в РТГА позитивные пробы от больных кур были позитивны также и в ИФА.

Таблица № 4

Результаты сравнительных исследований проб сывороток крови от кур методом РТГА и ИФА (Московский регион)

год	Наименование реакции	Кол-во исследованных положительных сывороток	положительные	отрицательные
2006-2007г.г.	РТГА (серотипы H5, H7)	13005	3*(H5)	13002
	ИФА (тип А)	13005	599+3*	12403

* пробы сыворотки крови, полученные от больных кур.

На основании полученных результатов (таблица 4) нами была предложена следующая схема серологических исследований (рис. 3).

СХЕМА 3 ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТОК КРОВИ

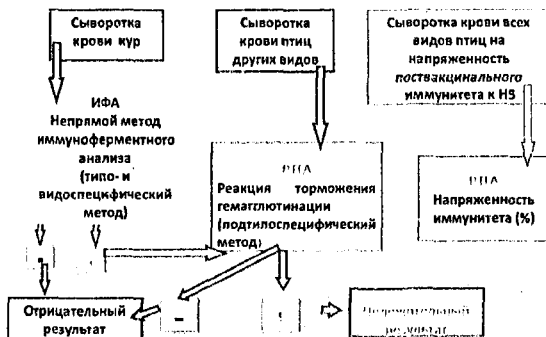


Рисунок 3

В основе схемы 3 лежат особенности различных тестов: тест - ИФА основан на определении антител к нуклеопротеину вируса гриппа птиц (типоспецифичен) и видоспецифичен (используется антивидовой куриный конъюгат) может быть использован только для одного вида птицы (кур) и выявлять антитела ко всем подтипам вируса гриппа птиц типа А, подтипоспецифический тест РТГА используется для подтверждения и для всех других видов птиц, а также определения напряженности поствакцинального иммунитета.

Таким образом, в соответствии с нашей схемой использование метода ИФА возможно при проведении мониторинговых исследований на грипп птиц только в птицеводческих (куроводческих) хозяйствах и у невакцинированных кур при обследовании индивидуальных подворий граждан. Исследования других видов птиц и исследования напряженности поствакцинального иммунитета проводится методом РТГА. При выявлении положительных проб в ИФА обязательным является подтверждение в РТГА.

3. Следующей целью наших исследований было изучение напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа H5N1 у различных видов птиц. С целью определения напряженности поствакцинального иммунитета с 2006 г. ветлабораториями России было исследовано 835049 проб сывороток крови. Ежегодно обследовалось не менее 10 тыс. населенных пунктов, около 100 птицеводческих ферм и 11 зоопитомников. Поствакцинальный иммунитет у домашней птицы значительно отличался в различных субъектах и

населенных пунктах России и составлял от 0% до 100%. В среднем напряженность поствакцинального иммунитета в целом по России составила около 60% в 2006 г. и 40% в 2007г.

По данным наших исследований, при контроле поствакцинального иммунитета в индивидуальных подворьях Московской области, напряженность иммунитета к гриппу А Н5 составила в среднем в 2006 г. – 64%, а в 2007 г. – 49%.

Более напряженный иммунный ответ наблюдался у кур и цесарок, в среднем 65-66%, у уток -26,5%, у гусей -13,4%, у индеек – 4,5%, у голубей – 9,7%, у страусов – 40%. Однако во всех случаях он не достигал желаемого уровня – 80 % и более.

Таким образом, с целью повышения поствакцинального иммунного ответа к вирусу гриппа птиц, и соответственно, повышению эффективности вакцинации было принято решение об испытании в этих целях препаратов, усиливающих иммунный ответ, таких как фоспринил и сальмозан производства ЗАО «Микро-плюс» при ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

4. Следующей нашей задачей было изучение действия препаратов-иммуностимуляторов у кур на напряженность поствакцинального иммунитета при совместном их применении с инактивированной вакциной. В опыте были использованы цыплята-бройлеры 40 дневного возраста. Данный вид птицы и возраст были выбраны в связи с тем, что, возможно, из-за очень интенсивного роста и развития поствакцинальный ответ у них, как правило, ниже, чем у птиц яичной продуктивности. Было сформировано (как показано в таблице 5) четыре группы, включая две контрольные по 5 голов в каждой. Препараты вводились однократно одновременно с вакциной в соответствии с наставлениями по их применению. Напряженность поствакцинального иммунитета проверялась на 14, 21 и 28 день после вакцинации. Для оценки поствакцинального иммунитета были использованы основной метод РТГА, а также два дополнительных метода ИФА и РДП (разработанные ФГУ ВНИИЗЖ) Результаты исследований приведены в таблице 5.

Результаты испытаний фоспринила и сальмозана при совместном их применении с вакциной против гриппа птиц

1	Вакцина H5N1	Препарат	Кол- во голов	Метод исследова- ния	Средние титры антител после вакцинации ИФА, РТГА (\log_2), РДП (%)		
					14 день	21 день	28 день
2	3	4	5	6	7	8	
1	+	Фоспринил	5	РТГА	1,6±0,25	4,0±0,34	5,2±0,56
				ИФА	отр.	10,23±1,8	12,64±
				РДП	отр.	60	100
2	+	Сальмозан	5	РТГА	0,6±0,5	2,4±0,14	5,0±1,09
				ИФА	отр.	10,56±0,96	11,89±2,75
				РДП	отр.	20	40
3	+	Физраствор	5	РТГА	1,8±0,9	3,2±0,06	3,4±0,06
				ИФА	отр.	11,44±1,84	11,14±2,5
				РДП	отр.	10	20
	Физраствор	Физраствор		РТГА	отр.	отр.	отр.
				ИФА	отр.	отр.	отр.
				РДП	отр.	отр.	отр.

Таким образом, по данным наших исследований при применении фоспринила защитные титры антител были достигнуты к 21 дню после вакцинации, а к 28 дню - титры антител в этой группе также были высоки в РТГА, почти на 2 (1,8) разведения выше, чем при введении вакцины без иммуномодуляторов. Методы ИФА и РДП дали сопоставимые результаты. При сравнительном изучении двух препаратов наилучшие результаты были получены по фоспринилу.

В процессе работы нами было разработано 3 нормативных документа по лабораторной диагностике гриппа птиц.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

Ветеринарным лабораториям Российской Федерации предложены схемы лабораторной диагностики гриппа птиц, нормативные документы: «Методические рекомендации по лабораторному мониторингу гриппа птиц на территории Российской Федерации» (утверждены 17 ноября 2009 г. Россельхознадзором),

«Методические указания по определению напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации», «Методические рекомендации по проведению лабораторных исследований на грипп птиц» (утверждены ректором ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» 05.05.2009 г.).

Выводы:

1. Проведен анализ распространения вируса гриппу птиц типа А подтипа H5N1 в мире с 2000 по 2007 г.г., установлено, что вспышки гриппа (по данным МЭБ) регистрировались более чем в 50 странах. В реестре стран неблагополучных по высокопатогенному гриппу H5N1 Россия занимает 7 место.

2. Изучено распространение высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 на территории Российской Федерации. С 2005 г. в России выявлено 179 очагов в 20 субъектах, потери составили 2,8 млн. голов птицы. Генетический материал вируса гриппа H5N1 в ПЦР выявлен у кур в 67,6% случаев, у гусей – 5,6% , у уток -1,9%; в 20.6% случаев у дикой водоплавающей птицы и птицы околородного комплекса, в 43,8 % у синантропной птицы.

3. Антитела к вирусу гриппа H5 в РТГА обнаружены: у диких видов птиц (водоплавающих и околородного комплекса) – 81,5%; у домашней птицы – 14,7%; у синантропной – 3,1%. Полученные данные свидетельствуют о том, что дикая, главным образом водоплавающая, птица является резервуаром вируса гриппа H5N1 в природе. Вспышки заболевания были связаны с миграционными путями перелетных птиц (исключение вспышки в Московском регионе).

4. При изучении клинических признаков и патологоанатомических изменений отмечали поражения характерные для высокопатогенного гриппа птиц: наблюдали множественные кровоизлияния, поражения во всех органах и тканях. У водоплавающей птицы впервые было зарегистрировано помутнение хрусталика (керато-конъюнктивит). Впервые заболеваемость и смертность на-

блюдалась как в стадах домашних, так и у диких водоплавающих птиц. Наблюдалось острое и сверхострое течение болезни, летальность достигала 100%.

5. Сравнительными исследованиями патологического и биоматериала классическим вирусологическим методом (на куриных эмбрионах), ПЦР и иммунохроматографическим методами показаны высокая чувствительность и специфичность новых методов исследований, что доказало необходимость применения их в различных схемах для проведения скрининговых (схема 1) и диагностических исследований (схема 2).

6. Показана высокая чувствительность различных видов культур клеток (фибробластов куриных эмбрионов, МДБК, СПЭВ и Таурус-1) без добавления трипсина к выделенным 10 изолятам вируса гриппа А/Н5N1 - 100% гибель куриных эмбрионов через 24-48 часов после заражения.

7. Проведено изучение генетических свойств выделенных изолятов. По основному молекулярному маркеру патогенности все они были отнесены к ВПВП типа А/Н5N1, показали высокую гомологию (>99%) с вирусами, изолированными от диких водоплавающих птиц во время эпизоотии на озере в провинции Цинхай.

8. Сравнительное изучение серологических методов исследований ИФА (новый метод) и РТГА, показало, что метод ИФА целесообразно применять при мониторинговых исследованиях в куроводческих хозяйствах на невакцинированном поголовье, а РТГА для мониторинговых исследований других видов птиц и контроля напряженности поствакцинального иммунитета.

9. Показано, что поствакцинальный иммунитет у домашних птиц значительно варьировал в различных населенных пунктах Российской Федерации от 0 до 100%. В среднем по России его уровень составлял около 60% в 2006 г. и около 40% в 2007 г. Наиболее напряженный иммунный ответ наблюдался у кур 66-67% и цесарок 30-88%; у уток, гусей, индеек, страусов и голубей он достигал значений: 25-26%, 13-30%, 4,5-28%, 40%, 0-9,9%, соответственно.

10. Показано, что иммуностимулирующие препараты фоспренил и сальмозан при совместном их применении с вакциной против гриппа птиц повысили у цыплят бройлеров титры поствакцинальных антител на 28 день после вакцинации в 3 раза.

11. На основании полученных результатов предложены схемы исследований, включающие современные методы лабораторной диагностики гриппа птиц, разработано 3 нормативных документа.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Виткова ОН. Повышение эффективности специфической профилактики против гриппа птиц/Виткова О.Н., Калмыков М.В., Михайлова В.В. и др.//Ветеринария. – 2007. - №10. - С.14-16.

2. Виткова О.Н. Эпизоотическая ситуация по гриппу птиц в Российской Федерации и лабораторная диагностика гриппа птиц/ О.Н. Виткова// Актуальные проблемы промышленного птицеводства – грипп птиц. Сб. науч. ст. //ЛЕНЭКСПО - Санкт-Петербург -2005. - С.17-19.

3. Виткова О. Анализ эпизоотической ситуации по распространению высокопатогенного гриппа птиц в мире и в Российской Федерации/ Виткова О.Н. //Ветеринарная жизнь - 2006. - №17. – С.1

4. Виткова О.Н. Влияние Фоспренила на титр поствакцинальных антител против вируса гриппа птиц/ А.В. Деева, Г.Г. Мехдиханов, М.Л. Зайцева, А.В. Хомич, М.В. Калмыков и др.//Грипп птиц: профилактика и меры борьбы. Сб. материалов науч.-практической конференции. – 2007.- С.120.

5. Виткова О.Н. /Организация лабораторного мониторинга гриппа птиц методом ПЦР// Виткова О.Н, Калмыков М.В., Венчакова А.А.// Сб. науч. трудов/ 6-ая всероссийская научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика. - Москва – 2007.- С. 197.

6. Виткова О.Н./Молекулярно-эпидемиологический анализ вируса гриппа птиц, циркулировавшего во время эпизоотии 2005-2007 г.г. на территории России и стран СНГ//Яцышина С.Б., Астахова Т.С., Браславская С.И., Кондратьева Т.Ю., Виткова О.Н. и др./ Сб. науч. трудов/ 6-ая Всероссийская научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика. Т 1. - Москва – 2007.- С. 193.

7. Виткова О.Н. /Расшифровка эпизоотической вспышки, вызванной высоковирулентным вирусом гриппа А/Н5N1 Цинхай-сибирского генотипа, на птицеферме «Лебяжье-Чепыгинский» (Боюховецкий район Краснодарского

края) в августе-сентябре 2007 г.// Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Фролов А.В. и др./ Сб. науч. трудов/ 6-ая Всероссийская научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика. Т 1. - Москва – 2007.- С. 204.

8. Виткова О.Н. Молекулярно-генетические особенности высоковирулентного варианта вируса грипп А/Н5N1, вызвавшего локальную эпизоотическую вспышку в Подмоскowie в феврале 2007 г.// Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., и др./ Сб. науч. трудов/ 6-ая Всероссийская научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика. Т 1. - Москва – 2007.- С. 211.

9. Виткова О.Н. /Анализ лабораторного мониторинга гриппа птиц за 2007 г./ IV Международный ветеринарный конгресс по птицеводству - Москва 2008. – С. 37.

10. Виткова О.Н. Грипп птиц; результаты лабораторного мониторинга/ Виткова О.Н., Калмыков М.В., Михайлова В.В.// АгроРынок-2009-№2. - С. 3.

11. Виткова О.Н. Причины заболевания птицы и лабораторная диагностика/ Виткова О.Н.// Птицеводство. – 2003. - №5. - С 23.

12. Виткова О.Н. Анализ лабораторного мониторинга гриппа птиц на территории Российской Федерации за 2008 г.// Виткова О.Н., Калмыков М.В., Михайлова В.В./ Сб. науч. трудов/ IV Международный ветеринарный конгресс по птицеводству - Москва 2008. – С. 70.

ООО "Мещера", ИНН 5050006864, М.О., г. Щелково,
ул. Свирская, д.8а Тираж 100 экз. Заказ № 157. 2009г.