

*Перевод с украинского языка*

Национальная академия  
аграрных наук Украины  
**Национальный научный  
центр «Институт  
экспериментальной и  
клинической  
ветеринарной медицины»**



NATIONAL ACADEMY OF  
AGRARIAN SCIENCES OF  
UKRAINE  
**National Scientific  
Center «Institute of  
Experimental and  
Clinical Veterinary  
Medicine»**

**14.11.2018 № 974**

Директору Государственного  
научно-контрольного института  
биотехнологии и штаммов микроорганизмов,  
доктору ветеринарных наук,  
профессору,  
академику НААН Украины  
Головко А.М.

Национальный Научный Центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» просит провести депонирование штамма А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/16 (H5N8) вируса высокопатогенного птичьего гриппа. Штамм будет использован в качестве производственного для изготовления биопрепаратов, а также для научных исследований.

Просим разрешения на проведение работ по депонированию высокопатогенного птичьего гриппа, а также дальнейшее его хранение в отделе изучения болезней птиц НИЦ «ИЭКВМ» в условиях BSL2+.

Приложения:

1. Паспорт на штамм.
2. Программа проведения комиссионных испытаний - 1 экз.
3. Календарный план проведения комиссионных испытаний - 1 экз.

Директор НИЦ «ИЭКВМ»  
доктор ветеринарных наук,  
профессор, академик НААН

Б.Т.Стегний

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ННЦ «ИЭКВМ»  
доктор ветеринарных наук,  
профессор, академик НААН  
\_\_\_\_\_Стегний Б.Т.  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

## АКТ

### исследования биологических свойств вируса высокопатогенного птичьего гриппа подтипа H5N8 штамма А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/2016

Исследование биологических свойств вируса высокопатогенного гриппа птицы подтипа H5N8 штамму А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/2016 были проведены на базе отдела изучения болезней птиц Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» совместно с представителями Государственного научно-исследовательского института лабораторной диагностики и ветеринарно-санитарной экспертизы в период с января 2018 года по август 2018 года.

**Цель исследований:** выявить биологические свойства нового антигенного варианта вируса высокопатогенного птичьего гриппа подтипа H5N8, который впервые выделен в Украине в 2016-2017 годах.

#### **Материалы и методы исследований.**

*Вирус:* штамм А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/2016 H5N8, 1 пассаж от 29.12.2016 г.

*Референтные сыворотки крови:* принадлежность штамма к вирусу гриппа подтипа H5 определяли через ингибирование гемагглютинации (РЗГА) с использованием референтных сывороток крови к орто- и парамиксовирусам референс-лабораторий Veterinary Laboratories Agency (Англия, Вейбридж), Референс-лаборатории гриппа Международного эпизоотического бюро Института Зоопрофилактики (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, г. Падуя, Италия) подтипов H1N1, H2N3, H3N8, H4N8, H5N3, H6N2, H7N3, H8N4, H9N7, H10N1, H11N9, H12N5, H13N6, H14N5, H15N9, H16N3, APMV-1, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-6, APMV-7, APMV-8, APMV-9 по общепринятым методикам.

*Определение биологической активности.* Исследования биологической активности (определение титра) вирусов гриппа проводили на 9-10-суточных куриных эмбрионах. Титрование вирусов проводили по общепринятой методике. Для этого готовили десятикратно разведенный вирус от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$  на ФСБ. На каждое разведение брали 4-6 эмбрионов. Титр биологической активности выражали в ЕИД<sub>50/0,1 см<sup>3</sup></sub>, учитывая наличие гемагглютининов в экстраэмбрионной жидкости, а также в ЕЛД<sub>50/0,1 см<sup>3</sup></sub>, учитывая количество погибших куринных эмбрионов. Расчет титра проводили по методу Рида и Менча.

*Отсутствие контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой.*  
Достигли отсутствия контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой в соответствии с ГСТУ4483.

*Молекулярно-генетические исследования проводили в лаборатории молекулярной эпизоотологии и диагностики НИЦ «ИЭКВМ». Секвенирование вирусов проводили в Институте Фридриха Лёффлера (Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health) (о. Римс, Германия).*

### **Результаты исследований.**

**Идентификация вируса.** Результаты серологической идентификации штамма вируса высокопатогенного гриппа птицы А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/16 (H5N8) в РЗГА с использованием референтных сывороток крови приведены в таблице 1

**Таблица 1**

#### **Результаты серологической идентификации в РЗГА**

<b>Подтип</b>	<b>А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/16</b>
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, что позитивные референтные сыворотки крови к вирусу гриппа подтипа Н5 (с разными подтипами нейраминидазы Н5 N2, Н5 N1) задерживали гемагглютинацию изолятов (рабочая доза вируса 4 ГАО) в титрах от 1:32 до 1:256. Необходимо отметить, что все другие позитивные референтные сыворотки крови с антителами к вирусам гриппа и парамиксовирусов птицы серотипів 1-9 не вызывали задержки гемагглютинации, за исключением референтной сыворотки к вирусу гриппа подтипа Н4N8, которая также вызывала задержку гемагглютинации в титре 1:512-1:1024. Наличие задержки гемагглютинации всех изолятов с референтной сывороткой крови Н4N8 связано с наличием перекрестной реакции между нейраминидазой N8.

Таким образом, отмеченный штамм относится к вирусу гриппа подтипа Н5.

**Определение гемагглютинирующих свойств вируса, инфекционного и летального титра вируса.** При постановке РГА у 1% эритроцитов петуха установлено, что титр гемагглютининов в экстраэмбрионной жидкости 1:32-1:64 (при первичном выделении), и при дальнейшем пассаже вируса на куриных эмбрионах титр гемагглютининов в экстраэмбрионной жидкости составлял 1:128-256.

Результаты определения инфекционного и летального титра приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты титрования вируса высокопатогенного гриппа подтипа Н5N8 после первичного выделения (1 пассаж).

Разведение	Кол-во эмбрионов, шт.	Время наблюдения, часов			Результаты РГА	Летальность, %	Инфицированность, %
		24	48	72			
		Количество погибших эмбрионов					
10 <sup>-1</sup>	4	-	2	2	+++-	100	96,15
10 <sup>-2</sup>	4		2	2	++++	100	95,65
10 <sup>-3</sup>	4		1	3	+---	100	81,81
10 <sup>-4</sup>	4		-	4	+++-	100	77,27
10 <sup>-5</sup>	4		-	4	++++	100	73,68
10 <sup>-6</sup>	4		-	4	++--	100	58,82
10 <sup>-7</sup>	4		-	4	++++	100	53,33
10 <sup>-8</sup>	4		-	4	++++	100	36,36
10 <sup>-9</sup>	4		-	-	----	0	0

10 <sup>-10</sup>	4		-	-	----	0	0
Контроль неинф. КЕ	4				----	0	0
Летальный титр, ЕЛД <sub>50</sub> , lg						8,5	-
Инфекционный титр, ЕИД <sub>50</sub> , lg						-	7,19

**Примечания:** + — наличие гемагглютининов (позитивная РГА),  
 — — отсутствие гемагглютининов (негативная РГА).

Установлено, что вирус высокопатогенного птичьего гриппа А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/1016 H5N8 при первичном выделении на куриных эмбрионах имел летальный титр 8,5 lg ЕЛД<sub>50</sub>, а инфекционный 7,87 lg ЕЛД<sub>50</sub>.

**Отсутствие контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой.** Достигли отсутствия контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой в соответствии с ГСТУ4483.

На протяжении периода хранения ни в одном флаконе не выявлен рост микрофлоры.

Вирус гриппа H5N8 А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/1016 свободен от бактериальной и грибковой микрофлоры.

**Молекулярно-генетические исследования.** Патогенность вируса определяли по результатам секвенирования места разрезания гемагглютинина. Установлено, что место разрезания гемагглютинина имеет следующий вид SPLREKRRKR\*GLF, что является характерным для высокопатогенных вирусов гриппа.

По результатам филогенетического анализа этот вирус принадлежит к типу 2.3.4.4b – высокопатогенные вирусы гриппа подтипа H5, и имеет филогенетические связи с вирусами из России и Западной Европы, которые циркулировали в 2017 году.

**Вывод:** Исследованные образцы вируса гриппа H5N8 А/гусыня белолобая/АН/1-15-12/1016 соответствуют паспортным данным по проверенным показателям (серологическая идентификация, биологические свойства, контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой, молекулярно-генетические) и могут быть задепонированы в Национальном центре штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологий и штаммов микроорганизмов.