

из Венгрии, впервые описавший данный вид микоплазмы, считает что передача данного возбудителя может происходить во время спаривания гусей (персональное сообщение). Более того, Dobos-Kovacs et al. (2009) показали, что патогенная микоплазма гусей *Mycoplasma* sp. 1220 является причиной снижения выводимости гусят и воспалительных процессов у гусей.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. В данном исследовании впервые описывается случай выявления *Mycoplasma* sp. 1220 у гусей в Украине с клиническими признаками воспаления фаллоса и клоаки. Благодаря применению антибиотикотерапии и переходу на искусственное осеменение, заболеваемость среди гусаков удалось снизить, а оплодотворенность яиц и выводимость гусят начала достигать прежнего уровня. Для более подробного изучения данного вида микоплазмы необходимо провести исследование на большем количестве образцов клинического материала, определить вирулентные свойства и антибиотикорезистентность локальных изолятов *Mycoplasma* sp. 1220. Данные исследования позволяют разработать новые подходы к лечению и профилактике этого заболевания у гусей.

Список литературы

1. Наливайко, Л. (1983). A disease of the genital organs of geese (caused by species of Neisseria). Veterinaria Moscow 10: 60-61.
2. Beemer, A.M., Kuttin, E.S. and Katz, Z. (1973). Epidemic venereal disease due to *Candida albicans* in geese in Israel. Avian Diseases, 17: 639-64.
3. Dobos-Kovacs Mihály, Varga Zsuzsanna, Czifra, György and Stipkovits, László 'Salpingitis in geese associated with *Mycoplasma* sp. strain 1220. // Avian Pathology. – 2009. – v. 38: 3. – P. 239-243.
4. Kosovac, A., Djuricic, S. (1970). Diseases of the female genital tract of geese and mycoplasmosis. // In Proceedings of the IVth International Congress of the World Veterinary Poultry Association. – Belgrade, Yugoslavia. – P. 429-440.
5. Pataky, M. An infectious inflammatory disease of cloaca and penis in geese (goose gonorrhoea) II. Properties of the causal agent and infection experiments. // Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae. -1974.- v.24. – p. 355-359.
6. Szep, I., Pataky, M. and Nagy, Gy. An infectious inflammatory disease of cloaca and penis in geese (goose gonorrhoea) I. Epizootological, clinical, pathological observations and control. // Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae. – 1974. – v.24. – P. 347-354.
7. Sprygin, A.V., Andreychuk, D.B., Kolotilov, A.N., Volkov, M.S., Runina, I.A., Mudrak, N.S., et al. Development of a duplex real-time Taqman PCR assay with internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. // Avian Pathology. – 2010. – v.39. – P. 99-109.
8. Stipkovits, L., El-Ebeedy, A.A., Kisary, J. & Varga, L. *Mycoplasma* infection of geese. I. Incidence of mycoplasmas and acholeplasmas in geese. // Avian Pathology. – 1975. – v. 4. – P. 35-43.
9. Varga, Zs. Study of goose mycoplasma strains. // Candidate's dissertation of Hungarian Academy of Sciences. – 1997. – HAS 1051 Budapest, Hungary.

DETECTION OF MYCOPLASMA SP. 1220 IN DOMESTIC GEESSE IN UKRAINE

Sprygin A.V.¹, Volokhov D.V.², Andreychuk D.B.¹, Irza V.N.¹, Drygin V.V.¹

¹Federal Center for Animal Health, Vladimir,

²CBER, US FDA, MD 20852, USA

*Specimens as palatine cleft and cloacae swabs from farm-raised geese with clinical presentation of inflammation of phallus and cloacae were obtained for this study. These geese were from a farm with a history of increased infertility and low hatchability that could decrease by 20-25%. In chickens, similar clinical signs could be due to *M. gallisepticum*. The specimens tested were negative for *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in a PCR using species-specific primers. Antibiotic therapy against *Neisseria* spp. was unsuccessful. Previously, *Mycoplasma* sp. 1220 was reported to be associated with increased embryo mortality, peritonitis, and salpingitis in geese (Dobos-Kovacs M. et al., 2009). Specific PCR for these specimens using primers targeting the RNA polymerase beta subunit (GenBank: EU596576) of *Mycoplasma* sp. 1220 resulted in positive amplification. The amplicons were directly sequenced (GenBank: HQ534366) and BLAST analysis revealed 99% of sequence similarity to the *proB* sequences of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary. This study is the first report of the detection of *Mycoplasma* sp. 1220 in geese in Ukraine.*

УДК 619:578.832.1:636.5

НАУКОВИЙ СУПРОВІД СИСТЕМИ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ, ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ В УКРАЇНІ

Стегній Б.Т., Бісюк І.Ю.,* Музика Д.В., **Головко А.М.

*Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, м. Київ,

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

**Державний науково-контрольний інститут біотехнології штамів і мікроорганізмів, м. Київ

Епізоотична ситуація в світі щодо грипу птиці залишається складною. За даними Міжнародного епізоотичного бюро вже на початку 2011 року спалахи високопатогенного грипу птиці (H5N1) зареєстровано в 12 країнах Південно-Східної Азії та Близького Сходу (Бангладеш, Камбоджа, Єгипет, Гонконг, Індонезія, Індія, Ізраїль, Японія, Корея, М'янма, Палестинська Автономія, В'єтнам) серед сільськогосподарської птиці промислових та присадибних господарств, а також диких птахів. Загальна кількість ураженої свійської птиці становить понад 4 млн. голів, збудника грипу виявлено у 76 диких птахів різних видів, переважно водоплавних. Хоча загальна кількість спалахів та країн, де реєструється захворювання на високопатогенний грип птиці зменшилося у порівнянні з минулими роками, та це не привід для оптимістичних прогнозів. У деяких регіонах, перш за все це країни Південно-Східної Азії (Індонезія, Камбоджа, В'єтнам), а також Близького Сходу (Єгипет) сформувалися ендемічні осередки цього збудника, що дуже небезпечно в контексті подальшого поширення збудника. Україна на сьогоднішній день благополучна щодо високопатогенного грипу птиці, в останнє це захворювання було зафіксовано в 2008 року в АР Крим [1, 2, 4, 5].

Епізоотична ситуація, що склалася у світі потребує постійного моніторингу, а також підготовки до можливих ускладнень. В нашій державі ці питання контролює Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи з мережею регіональних лабораторій. Науковий супровід даної проблеми забезпечує провідна установа в галузі ветеринарної медицини – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» з Референс-лабораторією з грипу птиці.

Головним завданням на сьогодні для державної ветеринарної служби та науковців є недопущення заносу збудника високопатогенного грипу птиці на територію України, постійний епізоотологічний моніторинг сільськогосподарських та диких птахів.

Розділ 6. Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин

Епізоотологічний моніторинг грипу в популяціях диких та свійських птахів. Особливо інтенсивні моніторингові дослідження диких птахів різних екосистем України в місцях їх масового скупчення під час міграції, зимівлі та гніздування в Південному регіоні країни (Херсонська, Миколаївська, Одеська області та АР Крим) були проведені науковцями ННЦ «ІЕКВМ» спільно з фахівцями ветеринарної служби в останні 10 років. Здебільшого це водоплавні та навколводні птахи, тобто основний резервуар вірусів грипу в природі. Результати серологічних досліджень свідчать про широку циркуляцію вірусів грипу різних підтипів в популяціях диких птахів. Значну увагу ветеринарна служба приділяє епізоотологічному моніторингу сільськогосподарської птиці різних видів в промислових та присадибних господарствах. Особливістю присадибного птахівництва є утримання птиці без дотримання належних ветеринарно-санітарних вимог, що може сприяти виникненню та поширенню високопатогенного грипу птиці. Особливо це стосується «зон ризику», де висока ймовірність контактів свійських птахів з дикими.

У попередні роки під час спалахів високопатогенного грипу птиці (2005-2008 роки) від диких та сільськогосподарських птахів ізольовано 10 вірусів високопатогенного грипу птиці H5N1, які були всебічно досліджені, а саме: вивчено їх біологічні та молекулярно-генетичні характеристики, проведено секвенування геному збудників, філогенетичний аналіз, визначена патогенність вірусу для курчат за внутрішньовивідним індексом патогенності, проведено електронно-мікроскопічні дослідження, вивчено культуральні та антигенні властивості, його здатність зберігатися в умовах низьких та наднизьких температур. Базуючись на отриманих даних були підібрані виробничі та контрольні штами вірусів для виробництва біопрепаратів – вакцин та діагностикумів.

Розробка засобів специфічної профілактики та діагностики високопатогенного грипу птиці. Важливим аспектом контролю високопатогенного грипу птиці є діагностика захворювання. Тому нами були розроблені тест-системи для діагностики грипу А у птиці з використанням традиційних методів таких як реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) та сучасних – полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Для якісної діагностики захворювань необхідним є використання відповідних сучасних антигенних варіантів вірусу. Тому для виготовлення тест-системи «АвіФлуТест H5N1» було використано штам вірусу А/курка/Сиваш/02/05 H5N1. Нами відпрацьовано технологію накопичення вірусної біомаси з високим титром гемаглютининів, підібрано інактивант, регламент інактивації, захисне середовище, яке забезпечує стабільність інактивованого антигену при зберіганні. Шляхом гіперімунізації курей отримані специфічні гіперімумні сироватки з високим титром антигемаглютининів до вірусу грипу птиці H5 – 7-9 log₂.

Тест-система пройшла апробацію на значній кількості польових та стандартних проб сироваток від свійських та диких птахів різних видів, у т.ч. в порівняльному аспекті, при використанні референтного антигену H5N2 (Англія, Вейбрідж), тест-систем «Антиген для діагностики грипу птахів H5N3» (виробництва ВАТ «Покровский завод биопрепаратов»); «Антиген вірусу грипу підтипу H5N1 сухой для серологічних реакцій» (виробництва ФДУ «ВНДІЗТ»). Отримані результати досліджень вказують на високу чутливість та специфічність запропонованої тест-системи. Тест-система «АвіФлуТест H5N1» (ТУ У 24.4-00497087-052:2006, реєстраційне посвідчення № 2743-14-0301-07) використовується для виявлення антитіл до вірусу грипу H5N1 в сироватках крові та жовтках яєць диких птахів, а також для визначення напруженості імунітету в сільськогосподарській птиці після застосування інактивованих вакцин проти високопатогенного грипу птиці.

Що стосується розробки молекулярно-генетичних засобів діагностики, то за результатами дослідження генів вірусу грипу А субтипу H5N1 розроблені праймерні системи та методики їх застосування для індикації вірусу високопатогенного грипу птиці у загрозливих зонах. Розраховані праймери AivH5-F і AivH5-R, які мають високі показники ПЛР-quality, фланкують високоваріабельну ділянку гену гемаглютинину довжиною 487 п.н., їх запропоновано використовувати для діагностики грипу та ідентифікації ізолятів H5-субтипу. На основі цих праймерів було розроблено «Тест-систему для виявлення РНК високопатогенного вірусу грипу птиці» (ТУ У 24.4-00497087-060:2007), яка має високу специфічність та чутливість.

Після аналізу гену нейрамінідази розраховані праймери AivN1-F і AivN1-R, які також мають високі показники ПЛР-quality, фланкують високоваріабельну ділянку NA-гену довжиною 425 п.н. Запропоновано методику їх використання для діагностики грипу та ідентифікації ізолятів H5N1-субтипу, яка затверджена НТР Державного департаменту ветеринарної медицини України (Протокол №3 від 23.12.2006 р.).

Обидві ПЛР-методики пройшли апробацію на більш ніж 200 польових зразках від дикої та синантропної птиці.

На даний час комісійні випробування проходить тест-система для виявлення антитіл до 14 підтипів вірусу грипу А в сироватках крові сільськогосподарської та дикої птиці (ТУ У 24.4-00497087-052:2008). На досягнутому науковці ННЦ «ІЕКВМ» не зупиняються, а продовжують наукові дослідження щодо створення нових сучасних тест-систем для діагностики грипу птиці.

Що стосується специфічної профілактики високопатогенного грипу птиці, то на сьогоднішній день вакцинація сільськогосподарської птиці в Україні не проводиться. Але є всі необхідні резерви. Науковці ННЦ «ІЕКВМ» в стислі терміни розробили вітчизняну інактивовану вакцину проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ». Для розроблення цього біопрепарату було обрано епізоотичний гомологічний штам А/курка/Сиваш/02/05 H5N1, який було ізольовано під час спалаху високопатогенного грипу птиці в АР Крим у 2005 році. Шляхом селективного клонування на СПФ курячих ембріонах, культурах клітин та шляхом підбору умов культивування було отримано виробничий штам вірусу А/курка/Сиваш/02/05 H5N1, який забезпечував високу якість вірусної сировини з високим титром гемаглютининів 10-12 log₂. Виробничий штам депонований в Державному науково-контрольному інституті біотехнології та штамів мікроорганізмів за № 383. На виробничий штам отримано патент України № 20245. Наступним етапом був підбір інактиванту та регламенту інактивації, які забезпечували повну інактивацію інфекційних властивостей вірусу та не впливали на антигенні та імуногенні характеристики вірусу. Було встановлено, що оптимальним інактивантом для цього вірусу є формальдегід. Його використання дозволило повністю нейтралізувати інфекційні властивості вірусу при повній збереженості протективних антигенів. Слід відмітити, що препарати вірусу, які були інактивовані за допомогою формальдегіду не викликали загибелі ембріонів і курчат та індукували у птиці виробку антитіл.

Одним з основних компонентів інактивованих вакцинних препаратів є ад'юванти, що забезпечують формування стійкого імунітету у щепленій птиці, який зберігається тривалий час. Отже важливим моментом був підбір ад'ювантів, співвідношення антигену та ад'юванту та технології емульсування. За результатами проведених досліджень оптимальним та придатним для виготовлення вакцини було визнано ад'ювант Montanid ISA 70 фірми SEPPIC (Франція).

За розробленою технологією було виготовлено декілька серій вакцини, які були використанні у лабораторних дослідженнях

щодо підбору оптимальної дози для різних видів сільськогосподарської птиці. Дослідженнями встановлено, що доза для курей становить $0,5 \text{ см}^3$, для качок - $1,0 \text{ см}^3$, гусей - $2,0 \text{ см}^3$, індиків - $1,0 \text{ см}^3$. Також було визначено термін зберігання вакцини за оптимальної температури $2 - 8^\circ\text{C}$ – 12 місяців від дня виготовлення.

Вакцина «АвіФлуВак-ІЕКВМ» пройшла державні комісійні випробування на Херсонській державній біологічній фабриці та виробничі випробування в одному з населених пунктів Херсонської області. Контроль якості вакцини проводився згідно суворим вимогам МЕБ та Державного науково-контрольного інституту штамів мікроорганізмів. За всіма показниками: зовнішній вигляд, колір, в'язкість, відсутність сторонніх домішок, стабільність емульсії та залишкова кількість інактивантів вакцина відповідала міжнародним стандартам. Особлива увага була приділена повноті інактивації вірусу, нешкідливості вакцини, антигенним та імуногенним властивостям. За результатами випробувань було встановлено, що вірус повністю інактивованій та не викликає загибель курячих ембріонів протягом 3 послідовних «сліпих» пасажів. При введенні птиці двократної дози не спостерігалось жодних клінічних проявів захворювання та місцевої реакції в місці введення біопрепарату. При визначенні антигенних властивостей встановлено, що щеплення птиці викликає формування стійкого напруженого імунітету. Вже через 21 добу після одноразового щеплення титр антитіл у курей до вірусу становив $6,30 \pm 0,42 - 6,80 \pm 1,88 \log_2$ в реакції затримки гемаглютинації, а через 3 тижні після ревакцинації середній титр антитіл досягав $9,25 - 11,40 \log_2$. Рівень антитіл у качок, гусей та індиків після ревакцинації становив відповідно $6,6 \pm 2,06$; $6,4 \pm 0,89$ та $7,5 \pm 0,57 \log_2$.

Імуногенна активність вакцини «АвіФлуВак-ІЕКВМ» була перевірена під час лабораторних та виробничих випробувань шляхом прямого інфікування високопатогенним контрольним вірусом, які проводились з використанням спеціальних боксів 3-го класу захисту. Для досліджу було сформовано дві групи курчат: дослідна (вакциновані курчата) та контрольна (не вакциновані). Через 4 тижні після ревакцинації курчата дослідної грипу та не вакциновані з контрольної групи були заражені вірулентним вірусом. Щоденно протягом 7 діб від дослідних та контрольних курчат відбиралися клоакальні змиви для визначення вірусовиділення. Через 36-40 годин усі контрольні (не вакциновані) курчата загинули з клінічними проявами захворювання. З клоакальних змивів цієї птиці було реізолювано збудника. У той же час усі вакциновані курчата протягом 14 діб (період спостереження) залишалися клінічно здоровими та протягом 7 діб у них не було виявлено виділення вірусу до навколишнього середовища.

За результатами випробувань інактивована емульсована вакцина проти високопатогенного грипу птиці «АвіФлуВак-ІЕКВМ» була визнана безпечною, нешкідливою та рекомендована для використання в практиці ветеринарної медицини. На вакцину «АвіФлуВак-ІЕКВМ» розроблена нормативна документація ТУ У 24.4-00497087-041:2006, інструкція з виготовлення та контролю. Вакцина зареєстрована в Україні (реєстраційне посвідчення № 2297-04-0267-06 від 26.12.2006 р.).

Висновки. 1. Основними напрямками роботи Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», як провідної наукової установи ветеринарної медицини України спільно з Державною ветеринарною та фітосанітарною службою України є постійний епізоотологічний моніторинг свійських та диких птахів в усіх регіонах країни щодо грипу птиці, ізоляція збудників, їх ідентифікація та визначення патогенності, визначення потенційних джерел та шляхів потрапляння інфекції на територію України, а також розробка вітчизняних засобів специфічної профілактики та діагностики.

2. На сьогоднішній день епізоотична ситуація щодо грипу птиці в Україні благополучна. Постійно проводяться моніторингові дослідження диких птахів, в арсеналі фахівців ветеринарної служби є розроблені в ННЦ «ІЕКВМ» сучасні тест-системи для діагностики цього захворювання. На випадок непередбачуваних подій розроблена технологія виготовлення інактивованої емульсованої вакцини проти високопатогенного грипу птиці. Це універсальна технологія яка дозволить дуже швидко переорієнтуватися на виробництво вакцини із застосуванням нового актуального штаму. Розроблені методичні підходи для швидкого отримання виробничого штаму з польового епізоотичного ізоляту.

Список літератури

1. Державний комітет ветеринарної медицини [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.vet.org.ua> – Заголовок з екрану.
2. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_02_15/en/index.html – Заголовок з екрану.
3. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int> – Заголовок з екрану.
4. Lee, C.W., Suarez D.L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination// Anim. Health Res. Rev. – 2005. – Vol. 6. – P. 1-15.
5. WHO 2005. The Writing Committee of the World Health Organization. Avian influenza A (H5N1) infection in humans// N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 1374-1385.

SCIENTIFIC ESCORT OF THE SYSTEM OF EPIZOOTOLOGICAL MONITORING, DIAGNOSTIC AND PROPHYLAXIS OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA IN UKRAINE

Stegniy B.T., Bisyuk I.Yu.*, Muzyka D.V., **Golovko A.M.

*State Veterinary and Phytosanitary Service in Ukraine, Kyiv

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

**State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Materials of analysis of epizootic situation in the world concerning highly pathogenic avian influenza H5N1, prognosis of its further spread as well as scientific escort of its problem in Ukraine are presented in the article.