

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1, ВЫЗВАВШЕГО ВСПЫШКИ БОЛЕЗНИ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ В 2014 Г.

И.А. Чвала¹, А.В. Андриясов², Н.Г. Зиняков³, Д.А. Алтунин⁴, В.Ю. Сосипаторова⁵

¹ заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: chvala@arriah.ru

² старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

³ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁴ ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: altunin@arriah.ru

⁵ биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В сентябре 2014 г. в населенных пунктах Алтайского края в стадах домашних птиц зарегистрированы вспышки острой инфекции с высокой смертностью. В результате лабораторных исследований были выделены и идентифицированы вирусы высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1. Проведено изучение молекулярно-биологических свойств вируса, описаны характерные клинические признаки и патоморфологические изменения, особенности инфекции у цыплят.

Ключевые слова: грипп птиц, сайт нарезания, ген, гемагглютинин, вирулентность, индекс патогенности.

ISOLATION AND EXAMINATION OF A/H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS THAT CAUSED DISEASE OUTBREAKS IN ALTAI KRAI IN 2014

I.A. Chvala¹, A.V. Andriyasov², N.G. Zinyakov³, D.A. Altunin⁴, V.Yu. Sosipatorova⁵

¹ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: chvala@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: andriyasov_av@arriah.ru

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: zinyakov@arriah.ru

⁴ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: altunin@arriah.ru

⁵ Biologist, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sosipatorova@arriah.ru

SUMMARY

In September, 2014 outbreaks of highly acute infection resulting in high mortality were reported in poultry flocks in some settlements of the Altai Krai. Laboratory tests allowed isolation and identification of highly pathogenic A/H5N1 avian influenza virus. Molecular and biological properties of the virus were examined; typical clinical signs, post-mortem lesions and disease character in chicks were described.

Key words: avian influenza, cleavage site, gene, hemagglutinin, virulence, pathogenicity index.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по высокопатогенно-му гриппу остается напряженной в ряде регионов мира. Вспышки болезни, вызванные вирусом подтипа A/H5N1 генетической линии A/Goose/Guangdong/96 (A/Gs/Gd/96), в 2014–2015 гг. были зарегистрированы среди диких и сельскохозяйственных птиц в странах Азии, Африки и Европы. Особое беспокойство ветеринарных служб вызвала реассортация и распространение в Юго-Восточной Азии вирусов подтипов A/H5N2, A/H5N6 и A/H5N8, причем последний был занесен в страны Европы и Северной Америки. В большинстве случаев источник инфекции не определен, однако при расследовании отдельных вспышек указано на участие диких птиц в заносе инфекции в стада сельскохозяйственных птиц и распространении болезни в другие страны и регионы мира [11].

В июле 2005 г. на территории Новосибирской области Российской Федерации были зарегистрированы первые случаи высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП) A/H5N1 среди диких и сельскохозяйственных птиц, сопровождавшиеся острым течением и высокой смертностью. В период с июля по август вспышки болезни были зафиксированы в Алтайском крае, Омской, Тюменской областях, а затем и в других субъектах страны. В результате лабораторных исследований было установлено, что возбудителем болезни является вирус, относящийся к генетической сублинии Qinghai (клада 2.2), сформировавшейся весной–летом 2005 г. на северо-западе Китая. Начиная с 2008 г. вспышки ВПГП A/H5N1 на территории России были вызваны вирусом клады 2.3.2 [3, 6, 8, 11]. Вспышки гриппа в популяциях диких птиц на озере Убсу-Нур Республики Тыва в 2006, 2009 и 2010 гг. указывают на значимость Сибири в эпизоотологии высокопатогенного гриппа A/H5N1 [3, 5, 6, 10]. Через территорию региона пролегают миграционные пути диких птиц, в том числе из Юго-Восточной Азии, неблагоприятной по ряду инфекционных болезней, кроме того, обилие водных ресурсов, места остановок и гнездований предполагают возможность новых заносов и распространения болезней на территории России.

Целью данной работы являлось изучение биологических свойств вируса гриппа A/H5N1, выявленного при вспышках острой болезни на частных подворьях Алтайского края в 2014 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вируса. Вирусовыделение проводили в развивающихся 10-суточных, свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных эмбрионах (КЭ) [7]. Из патологического материала (проба внутренних органов) готовили 10–20% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4), центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g, добавляли антибиотики (100 Ед/мл бензилпенициллина натриевую соль, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата) и 50 Ед/мл ни-статина, выдерживали при комнатной температуре в течение часа и вводили в аллантоисную полость КЭ в объёме 0,2 мл. Инокулированные КЭ инкубировали при 37 °С и относительной влажности 60–70%. Ежедневно эмбрионы овоскопировали и регистрировали состояние. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, охлаждались в течение 12–24 ч при температуре 2–6 °С и использовались для сбора экстраэмбри-

ональной жидкости (ЭЭЖ) для проведения дальнейших исследований. Работу с КЭ проводили с использованием стерильных пробойников, шприцев, игл и с соблюдением правил при работе с вирусным материалом.

Определение титра инфекционной активности. Из исследуемого вирусного материала готовили ряд десятикратных последовательных разведений (от 10^{-1} до 10^{-10}). В качестве чувствительных тест-объектов использовали 10-суточные СПФ-КЭ. Каждое разведение вируса инокулировали в аллантоисную полость четырёх СПФ-КЭ. Специфичность гибели подтверждали исследованием ЭЭЖ каждого инокулированного эмбриона в реакции гемагглютинации (РГА). Титр вируса в исходном материале определяли по методу Кербера и выражали в единицах ЭИД₅₀/мл.

РТГА и РТНА. Для идентификации изолятов вируса применяли реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и нейраминидазной активности (РТНА) в соответствии с общепринятыми методиками [7] с использованием антигенов и гипериммунных сывороток к вирусам гриппа производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) и Института зоофилактики (IZSve, Италия).

Определение индекса патогенности (IVPI). Для определения IVPI использовали общепринятую методику [10]. Исследуемую вирусосодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти цыплятам в дозе 0,1 мл. За птицами вели ежедневное наблюдение в течение 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 — птица клинически здорова; 1 — больная (отмечены некоторые признаки заболевания, такие как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 — тяжелобольная (одновременно наблюдаются несколько ярких клинических признаков инфекции); 3 — птица погибла. Погибшим птицам присваивали коэффициент 3 ежедневно, вплоть до десятых суток опыта. Индекс патогенности вычисляли по формуле:

$$IVPI = \frac{\sum_{i=1}^{10} (B_i \times 1 + TB_i \times 2 + P_i \times 3)}{10 \times N}$$

где B_i — количество больных в сутки i ;

TB_i — количество тяжелобольных в сутки i ;

P_i — количество погибших в сутки i ;

N — общее количество птиц в эксперименте.

Гистологическое исследование. В ходе эксперимента от павших в день гибели и незараженных (контрольных) цыплят отбирали образцы головного мозга, трахеи, легких, сердца и тонкого кишечника размером 0,5×0,5×0,5 см. Препараты фиксировали в смеси спирт-формол по Шафферу, через 48 ч осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки. С помощью ротационного микротома Microm HM340E готовили срезы тканей органов кур толщиной 5 мкм и подвергали окраске гематоксилин-эозином [2, 4].

ПЦР. Суммарную РНК выделяли, используя набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, кат. №74106) в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) с соответствующими

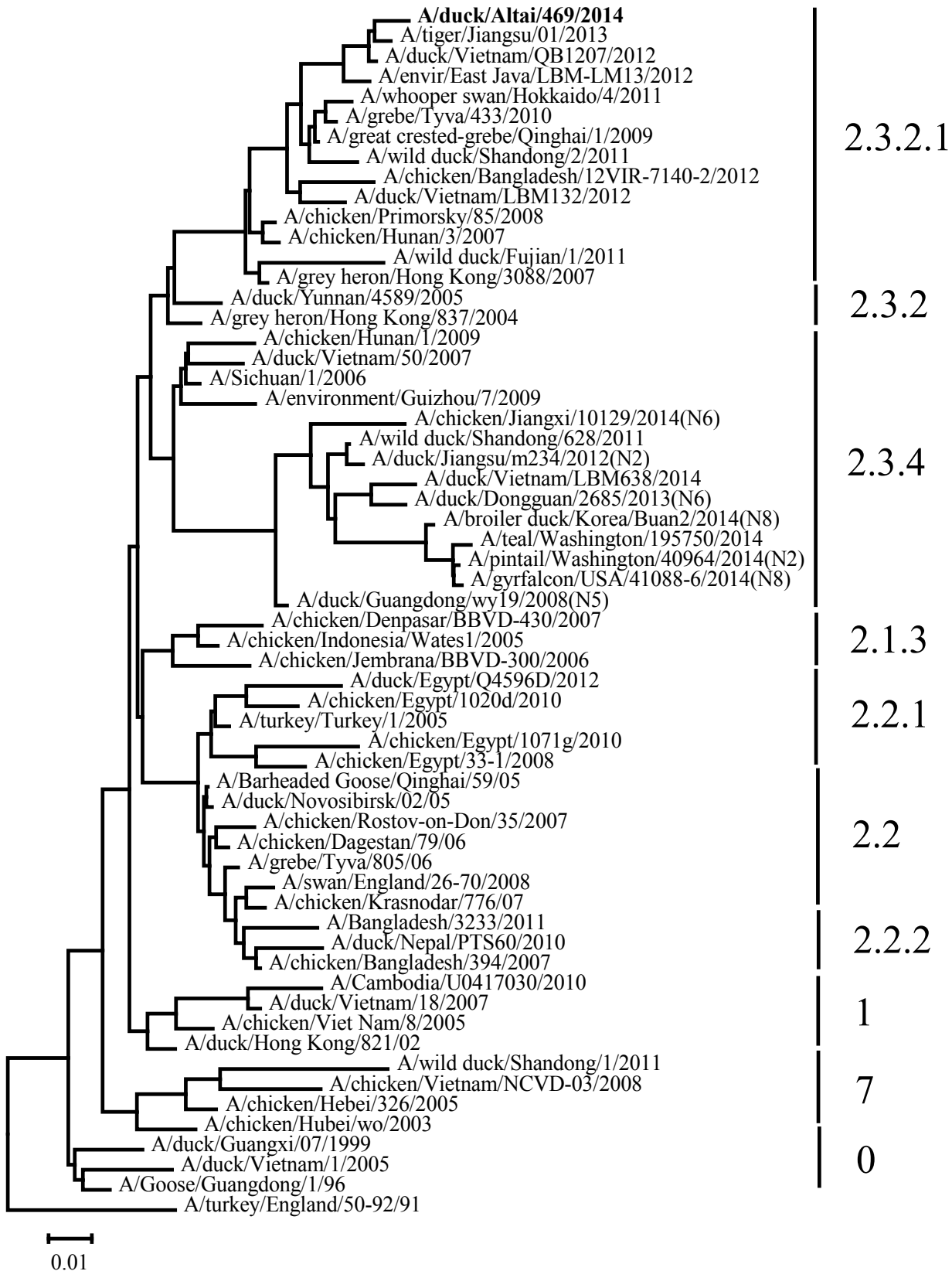


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с помощью последовательностей фрагмента (38-1704 н.н.) гена *H* изолятов и штаммов вируса гриппа подтипа *A/H5*

системами праймеров для выявления генома вируса гриппа птиц и идентификации подтипа H5N1 [3].

Секвенирование. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов определяли с применением автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ и сравнение нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей прово-

Таблица 1
Аминокислотные остатки белка гемагглютинина, определяющие рецепторную специфичность вируса гриппа

Позиция (нумерация приведена по H3-подтипу)	A/duck/Altai/469/2014 H5N1	Вирус гриппа птиц	Вирус гриппа человека
136	S	S	T
153	W	W	-
158	D	N/D	N
159	N	N	S
183	H	H	-
190	E	E	D
194	L	L	I
221	S	S	P
222	K	K	-
225	G	G/N	D
226	Q	Q	L/I
227	S	S	A
228	G	G	S

дили, используя пакет прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3. Также для сравнительного анализа использовали ранее опубликованные в международной базе GenBank последовательности изолятов и штаммов вируса гриппа птиц A/H5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>).

Построение и редактирование филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 4.1, и графической программы Freelance Graphics.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале сентября 2014 г. на частных подворьях в с. Долгово и п. Ильинский Новичихинского района

Алтайского края произошел массовый падеж домашних птиц (куры, утки, гуси). Болезнь характеризовалась острым течением, гибели предшествовали отказ от корма и воды, дискоординация движений, цианоз гребня и бородачок у кур, у водоплавающих отмечали помутнение роговицы глаз, в отдельных случаях клинических признаков болезни не наблюдали. В течение нескольких суток падеж птиц начался и на соседних подворьях населенных пунктов. Всего было зарегистрировано 6 очагов инфекции в с. Долгово и 5 очагов в п. Ильинский [1, 11].

От птиц были отобраны пробы биоматериала, и в результате лабораторных исследований на базе КГБУ «Алтайская краевая ветеринарная лаборатория» и ФГБУ «Новосибирская межобластная ветеринарная лаборатория» был выявлен геном вируса гриппа A/H5. В соответствии с разработанным Планом противоэпизоотических мероприятий был проведен комплекс ветеринарно-санитарных мер по предупреждению и ликвидации гриппа птиц в населенных пунктах [1, 11].

Через территорию Алтайского края проходят Центрально-Азиатский и Восточно-Азиатский миграционные пути, и массовый перелет представителей гусеобразных и других отрядов птиц приходится на период с июля по октябрь, что позволяет высказать предположение о наличии источника инфекции в популяциях диких птиц. Предположительно, заражение домашних птиц могло произойти при контакте с мигрирующими птицами на озерах, расположенных в черте населенных пунктов, или же в результате потрошения охотничьих трофеев (дикие утки) на двух подворьях граждан, где зарегистрированы первые случаи инфекции. Ранее, в апреле 2008 г. схожая ситуация произошла в Приморском крае, когда внутренние органы добытых на охоте птиц были скормлены домашней птице, и на данном подворье произошел массовый падеж вследствие заражения высокопатогенным гриппом A/H5N1 [8].

Биоматериал от уток и гусей (4 пробы), отобранный на двух подворьях в с. Долгово, и 13 проб внутренних органов дикой и синантропной птицы были оперативно направлены в Референтную лабораторию вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) для выделения и изучения биологических свойств возбудителя болезни.

Таблица 2
Результаты оценки клинического состояния птиц

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птиц	Период наблюдений, сут.				IVPI
		1	2	3	4-10	
A/duck/Altai/469/14 H5N1	Здоровые	5	0	0	0	2,67
	Больные	3	3	0	0	
	Тяжелобольные	2	1	3	0	
	Погибшие	0	6	7	10	
A/goose/Altai/472/14 H5N1	Здоровые	7	0	0	0	2,65
	Больные	3	2	0	0	
	Тяжелобольные	0	2	2	0	
	Погибшие	0	6	8	10	



Рис. 2. Цианоз лап и гребня через двое суток после инокуляции изолятов *A/duck/Altai/469/14 H5N1* (справа) и *A/goose/Altai/472/14 H5N1* (слева)

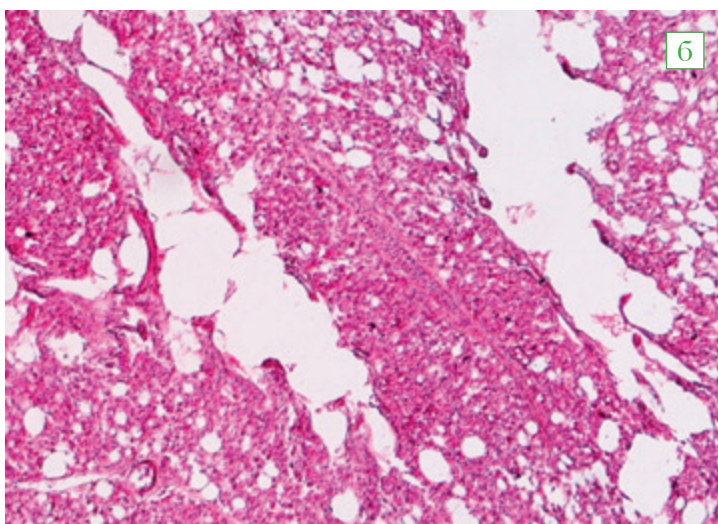
В результате исследований в ОТ-ПЦР в пробах был выявлен геном вируса гриппа птиц и идентифицирован подтип А/Н5N1. Для определения потенциальной вирулентности вируса и его филогенетической принадлежности методом секвенирования определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена Н четырех выделенных изолятов (268 н.о.), которые оказались идентичны. При проведении сравнительного анализа было установлено, что исследуемые изоляты принадлежат к азиатской генетической линии вируса высокопатогенного гриппа птиц *A/Gs/Gd/96*, клада 2.3.2.1. Сайт расщепления гемагглютинина содержит несколько основных аминокислот и имеет структуру -SPQRRRRKR-, что позволяет охарактеризовать вирус как потенциально высоковирулентный [7, 9].

С целью более полного описания биологических свойств этиологического агента вспышки болезни была

определена последовательность гена гемагглютинина (34-1704 н.о.) изолята *A/duck/Altai/469/2014 H5N1*. С использованием международной базы данных GenBank было установлено (рис. 1), что наиболее родственными к изучаемому изоляту оказались вирусы гриппа клады 2.3.2.1с обширной генетической линии вируса *A/Gs/Gd/96*, получившие распространение в Китае, Вьетнаме и других странах среди домашних (преимущественно утки) и диких птиц в 2011–2014 гг. (98–99% сходства) и в настоящее время вызывающие многочисленные вспышки болезни в Южной и Юго-Восточной Азии [11].

Гемагглютинин является одним из основных белков, определяющих ряд важнейших биологических свойств вируса гриппа, в первую очередь видовую специфичность (круг хозяев) и вирулентность. Так, ранее было установлено, что вирусы гриппа птиц имеют родство к Sia2-3Gal-рецепторам эпителиальных клеток.

Рис. 3. Легкие цыпленка через трое суток после заражения изолятом *A/duck/Altai/469/14 H5N1*, окраска гематоксилин-эозин, окуляр 10, объектив 15: а — контроль; б — опытная группа



Вирус гриппа человека имеет аффинитет к Sia2-6Gal-рецепторам эпителиальных клеток органов дыхания. Соответственно, структуры рецепторосвязывающих сайтов имеют характерные отличия: было установлено, что наличие глутамина (Q) в позиции 226 и глицина (G) в позиции 228 (нумерация указана по последовательности подтипа H3) характерны для вирусов гриппа птиц, тогда как лейцин (L) и серин (S) в позициях 226 и 228 преимущественно выявляют у вирусов, инфицирующих человека [9, 10]. В табл. 1 приведены некоторые аминокислотные остатки белка гемагглютинаина, потенциально определяющие рецепторную специфичность вирусов гриппа человека и птиц (подтип H5), и вируса A/duck/Altai/469/2014 H5N1.

Как видно из приведенных данных, в указанных позициях гемагглютинаина вируса A/duck/Altai/469/2014 H5N1 находятся аминокислотные остатки, характерные для вирусов, инфицирующих преимущественно птиц. Однако биологические свойства вируса зависят не только от гемагглютинаина, и полученные результаты не исключают возможности инфицирования млекопитающих, в том числе и человека [9].

Для выделения вируса из проб патологического материала исследуемые суспензии инокулировали 10-суточным СПФ-КЭ. Эмбрионы, инокулированные суспензиями биоматериала домашних птиц, погибли в течение последующих 24–48 ч инкубации. На тушках эмбрионов наблюдали многочисленные кровоизлияния. С использованием РГА в ЭЭЖ был обнаружен гемагглютинирующий агент, идентифицированный в РТГА и РТНА как вирус гриппа А/Н5N1. Из проб биоматериала от диких и синантропных птиц вирус в течение трех последовательных пассажей выделен не был.

Для оценки инфекционной активности были использованы вирусы, выделенные из разных подворий с. Долгово Новичихинского района Алтайского края от утки (A/duck/Altai/469/14 H5N1) и гуся (A/goose/Altai/472/14 H5N1). Для изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 титр инфекционности имеет значение 8,75 Ig ЭИД₅₀/мл, для вируса A/goose/Altai/472/14 H5N1 — 8,5 Ig ЭИД₅₀/мл. Вирусы гриппа, вызвавшие

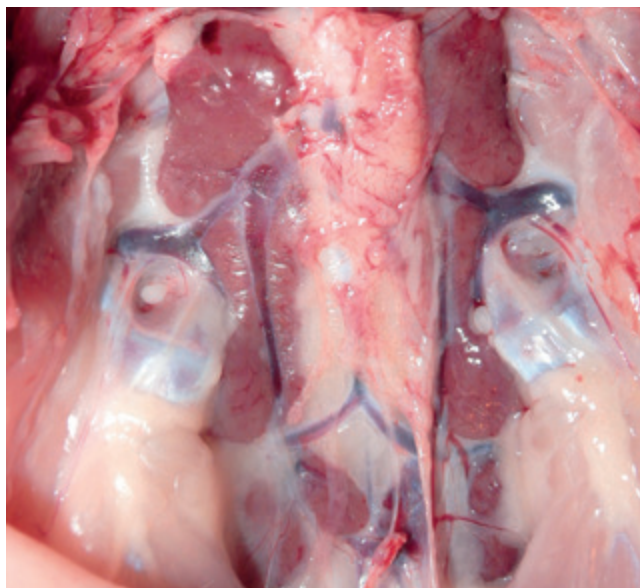
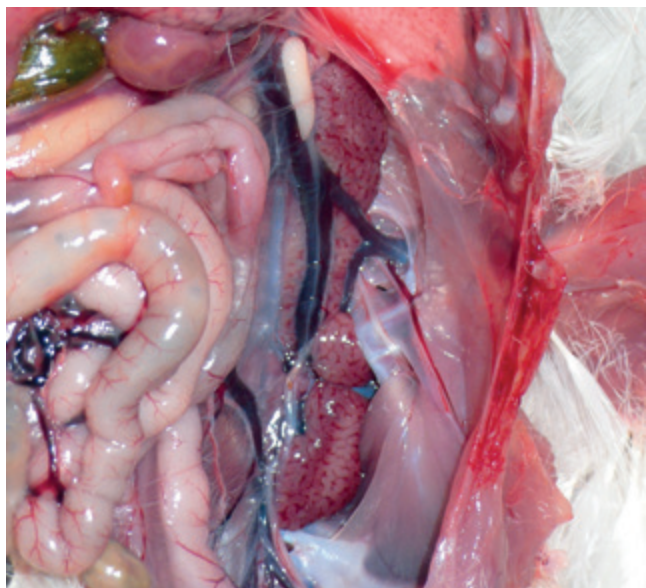
вспышки ВППГ в предыдущие годы, имели близкие значения инфекционной активности: так, изолят A/goose/Krasnoozerskoje/627/2005 H5N1, выделенный от больного гуся в Новосибирской области в 2005 г., имел титр инфекционной активности в пределах 9,2 Ig ЭИД₅₀/мл, а изолят A/chicken/Krasnodar/123/2006 H5N1, выделенный от павшей курицы в Краснодарском крае в 2006 г., обладал инфекционной активностью 8,4 Ig ЭИД₅₀/мл [10]. Полученные данные позволяют заключить о выраженной инфекционной активности вирусов гриппа А/Н5N1, выделенных при вспышках болезни на территории Российской Федерации.

Для оценки вирулентных свойств изолятов A/duck/Altai/469/14 H5N1 и A/goose/Altai/472/14 H5N1 использовали метод определения IVPI при внутривенном заражении 6-недельных цыплят, рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения животных (МЭБ). Инкубационный период длился 1–2 сут., и в течение 2–3 сут. эксперимента погибли все зараженные птицы, что позволяет заключить об остром течении болезни. Результаты наблюдений за клиническим состоянием птиц и полученные значения IVPI представлены в табл. 2. Согласно наставлению МЭБ, вирусы гриппа птиц, имеющие индекс патогенности 1,2 и более (максимальное значение 3,0), идентифицируются как высоковирулентные [7].

При клиническом наблюдении отмечали отказ от корма и воды, депрессию, затрудненное дыхание, хрипы, одышку, синюшность (цианоз) гребня, бородок и лап (рис. 2), диарею (фекалии жидкие, зеленовато-желтого цвета). У отдельных особей наблюдали тремор, атаксию, нарушение координации движений.

При внешнем осмотре и патологоанатомическом вскрытии павшей птицы наблюдали конъюнктивиты, синуситы, застойные явления во внутренних органах, ярко выраженный геморрагический диатез, характеризующийся скоплением вязкого экссудата соломенного цвета в подкожной клетчатке головы и шеи, брюшной полости, что свидетельствовало о дисфункции органов кровообращения.

Рис. 4. Нефрит и кровенаполненность брюшной полости у цыпленка (слева), павшего через трое суток после заражения A/goose/Altai/472/14 H5N1; почка цыпленка контрольной группы, убитого с диагностической целью через трое суток эксперимента (справа)



Оболочки головного мозга гиперемированы, селезенка увеличена, желчный пузырь переполнен, легкие отечны. При гистологическом исследовании было установлено, что в респираторной ткани лёгких зараженных птиц встречаются очаги дистелектазов (рис. 3). В трахее наблюдали адгезию реснитчатого слоя, катаральное воспаление и отек слизистого эпителия за счет инфильтрации лимфоцитами.

Печень, почки (рис. 4), брыжейка и серозная оболочка кишечника застойно гиперемированы (рис. 5). Слизистая оболочка кишечника утолщена, гиперемирована, местами пронизана точечными кровоизлияниями. Гистологические изменения тонкого кишечника кур проявлялись в виде деструкции ворсинок и гиперплазии стромы гладкомышечной слизистой оболочки.

Таким образом, полученные экспериментальные данные по оценке индексов патогенности изолятов A/duck/Altai/469/14 H5N1 и A/goose/Altai/472/14 H5N1 (значения 2,67 и 2,65) позволяют заключить о наличии выраженных вирулентных свойств у вирусов. Изоляты вызывали острое генерализованное заболевание с характерными для гриппа птиц клиническими признаками и патоморфологическими поражениями органов и тканей респираторной, пищеварительной, нервной и сердечно-сосудистой систем. Ранее проведенные эксперименты продемонстрировали способность изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 размножаться в различных органах и тканях цыплят и вызывать острую системную инфекцию при интраназальном заражении [2]. Высокая вирулентность для кур остается характерным признаком для вирусов гриппа А/Н5N1 азиатской генетической линии A/Gs/Gd/96, в том числе для изолятов, выделенных в разные годы на территории РФ [2, 4, 6, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате лабораторных исследований проб патологического материала от домашней птицы, погибшей при вспышке острой инфекции в 2014 г. в Алтайском крае, были выделены и идентифицированы вирусы гриппа птиц А/Н5N1. Изоляты оказались способны к размножению в СПФ-КЭ без предварительной адаптации и обладали выраженной инфекционной активностью. Для изолята A/duck/Altai/469/14 H5N1 титр составил 8,75 Ig ЭИД₅₀/мл, для вируса A/goose/Altai/472/14 H5N1 — 8,5 Ig ЭИД₅₀/мл. Инфекция у внутривенно зараженных цыплят протекает в тяжелой генерализованной форме, вызывая гибель всех птиц в течение двух-трех суток. Описаны характерные клинические признаки и патоморфологические изменения.

Установлена принадлежность вирусов к азиатской генетической линии высокопатогенного гриппа A/Gs/Gd/96, клада 2.3.2.1, получившей в настоящее время широкое распространение в странах Азии в стадах домашних и диких, в том числе мигрирующих, птиц. Структура сайта нарезания гемагглютинина (-SPQRERRRKR-) и индексы патогенности изолятов (2,67 и 2,65) позволяют идентифицировать вирус как высоковирулентный. В результате определения нуклеотидной структуры гена гемагглютинина и анализа полученных данных установлены молекулярно-генетические маркеры, потенциально определяющие рецепторную специфичность изучаемого вируса к клеткам птиц.

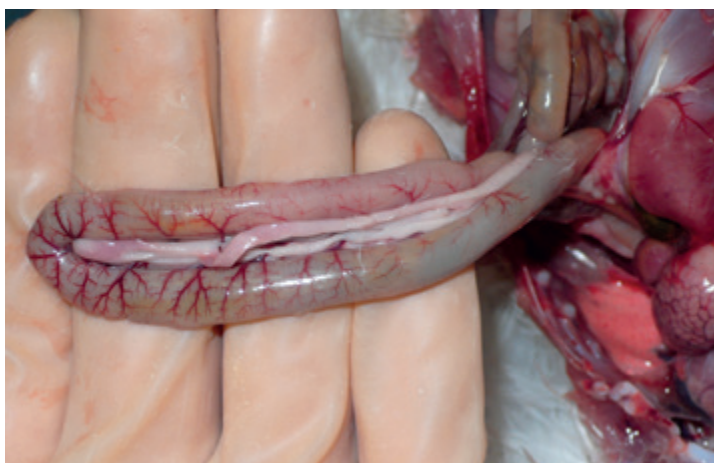


Рис. 5. Дуоденит и панкреатит у павшего цыпленка через двое суток после заражения A/duck/Altai/469/14 H5N1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вспышка высокопатогенного гриппа птиц H5N1 на территории Алтайского края в 2014 г.: причины и опыт ликвидации / М.С. Волков, А.В. Варкентин, В.Н. Ирза, А.С. Старова // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3 (14). — С. 62–65.
2. Изучение особенностей патологического процесса у кур, вызванного изолятом вируса гриппа птиц A/duck/Altai/469/14 H5N1 / В.Ю. Сосипаторова, Д.А. Алтунин, М.А. Циванюк, И.А. Чвала // Ветеринария сегодня. — 2016. — № 1 (16). — С. 51–54.
3. Изучение первичной структуры генома изолятов вируса высокопатогенного гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории России в 2007 году / А.В. Андриясов, И.П. Пчелкина, И.А. Чвала, В.В. Дрыгин // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. — 2014. — Т. 12. — С. 60–76.
4. Патоморфологические изменения у кур при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц А/Н5N1 / И.В. Бахчин, И.А. Чвала, М.А. Волкова [и др.] // Вестник ветеринарии. — 2014. — № 1 (68). — С. 47–51.
5. Сарыглар Л.К., Коломыцев А.А. Грипп птиц у диких уток в Республике Тыва // Вестник Тувинского государственного университета. — 2013. — № 2. — С. 180–184.
6. Чвала И.А. Особенности гриппа птиц А/Н5N1 у кур // Ветеринария. — 2012. — № 12. — С. 27–28.
7. Avian influenza (infection with avian influenza viruses) // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. — 2016. — Vol. 2, Chap. 2.3.4. — URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
8. H5N1 avian influenza outbreak in the Far East of Russia in 2008: New introduction / T.B. Manin, I.A. Chvala, S.N. Kolosov [et al.] // Avian Dis. — 2010. — Vol. 54, № 1 (Suppl.). — P. 509–512.
9. Imai M., Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses // Virology. — 2012. — Vol. 2. — P. 160–167.
10. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005–2006 / A.S. Lipatov, V.A. Evseenko, H. Yen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 13, № 4. — P. 539–546.
11. World Animal Health Information Database (WAHID). — URL: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.