



Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2

О. С. Осипова¹, М. А. Волкова², С. В. Фролов³, Д. Б. Андрейчук⁴, И. А. Чвала⁵

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-3176-157X>, e-mail: osipova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7674-639X>, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены данные по изучению параметров иммунного ответа цыплят после инфицирования изолятами низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2, относящимися к генетическим линиям Y-280 и G1. Для первичного исследования иммунного статуса и выявления выраженных нарушений иммунной системы были определены соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток методом проточной цитофлуориметрии. В результате количественного анализа субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят обнаружено наличие изменений, характерных для иммунной супрессии. При изучении динамики уровня Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов в крови. После инфицирования изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в процентном соотношении CD4⁺/CD8⁺ клеток отмечено в сторону уменьшения процента CD4⁺ клеток и увеличения процента CD8⁺ клеток. Согласно литературным данным, при иммунизации вакцинами активация иммунного ответа приводит к обратной динамике в сторону увеличения отношения CD4⁺/CD8⁺ клеток. В формировании иммунного ответа у цыплят после инфицирования вирусами гриппа птиц играет роль не только клеточно-опосредованный, но и гуморальный иммунитет. В результате серологических исследований сывороток крови цыплят после инфицирования на 14-е сут установлен выраженный гуморальный иммунный ответ. Средний титр специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 во всех группах цыплят, зараженных изолятами низкопатогенного вируса гриппа птиц, был выше $6 \log_2$. Высокий уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц показал развитие постинфекционного гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, H9N2, Т-клетки

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Осипова О. С., Волкова М. А., Фролов С. В., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Изучение иммунного ответа цыплят после экспериментального заражения изолятами вируса гриппа птиц А/Н9N2. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (1): 70–76. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-70-76.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Осипова Ольга Сергеевна, ветеринарный врач референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: osipova@arriah.ru.

Testing of chickens experimentally infected with A/H9N2 avian influenza virus isolates for their immune responses

O. S. Osipova¹, M. A. Volkova², S. V. Frolov³, D. B. Andreychuk⁴, I. A. Chvala⁵

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-3176-157X>, e-mail: osipova@arriah.ru

² <https://orcid.org/0000-0002-7674-639X>, e-mail: volkovama@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: andreychuk@arriah.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, e-mail: chvala@arriah.ru

SUMMARY

Data on tests of chickens for their immune responses to infection with low pathogenic A/H9N2 avian influenza virus isolates belonging to Y-280 and G1 genetic lines are presented in the paper. CD4⁺/CD8⁺ ratios were determined with flow cytometry for initial immune status examination and for detection of apparent immune

system disorders. Quantitative analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulations in chickens revealed changes characteristic of the immune suppression. Analysis of dynamics of T- and B-lymphocyte levels in blood of the infected chickens revealed decrease in relative T-lymphocyte counts and increase in relative B-lymphocyte counts. T-lymphocyte subpopulation composition expressed as CD4⁺/CD8⁺ ratio (%) changed after the infection: CD4⁺ cell proportion was found to decrease whereas CD8⁺ cell proportion increased. According to literature data, immune response activated by vaccination induces the reverse dynamics towards to increase in CD4⁺/CD8⁺ ratio. Both cell-mediated immunity and humoral immunity play role in development of the immune response in chickens infected with avian influenza viruses. Apparent humoral immune response was detected by serological tests of sera taken from chickens on day 14 after infection. Mean specific anti-A/H9N2 AIV antibody titre in all groups of test chickens infected with low pathogenic avian influenza virus isolates was higher than 6 log₂. High level of specific antibodies to avian influenza virus was indicative of postvaccinal humoral immune response development.

Keywords: avian influenza virus (AIV), H9N2, T-cells

Acknowledgements: The study was funded by the FGBl "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Osipova O. S., Volkova M. A., Frolov S. V., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Testing of chickens experimentally infected with A/H9N2 avian influenza virus isolates for their immune responses. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (1): 70–76. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-70-76.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Olga S. Osipova, Veterinarian, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBl "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: osipova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 – РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae*, роду *Alphainfluenzavirus*, виду *Influenza A virus* [1]. Впервые был зарегистрирован в 1966 г. у птиц в США в штате Висконсин [2, 3]. С тех пор вирус низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 получил широкое распространение во всем мире, особенно в странах Азии и Ближнего Востока [4–6]. В материковой части Китая вирус гриппа А/Н9N2 впервые был выделен в 1994 г. и стал наиболее распространенным подтипом вируса гриппа среди домашней птицы [4, 7].

Данный вирус является причиной развития клинически выраженной болезни при ассоциированном течении с оппортунистическими патогенами вирусной и бактериальной этиологии и создает постоянную угрозу для промышленного птицеводства [8–11]. Экономический ущерб складывается из следующих составляющих: повышенный отход молодняка, снижение яичной и мясной продуктивности в птицеводческих комплексах.

Для контроля данного заболевания многие страны (Китай, Пакистан, Иран, Израиль, Корея и др.) используют стратегию профилактической иммунизации против гриппа А/Н9N2 с целью уменьшения экономических потерь [2, 12–15]. В Российской Федерации ввиду циркуляции вируса А/Н9N2 программы оздоровления и искоренения инфекции могут включать стратегию иммунопрофилактики с использованием инактивированных вакцин [16].

Вакцинация индуцирует развитие и гуморального, и клеточного иммунитета. Основная роль в иммунном ответе, направленном против вирусов, принадлежит клеточным механизмам. Главными клетками приобретенного противовирусного иммунитета являются Т-лимфоциты. Среди них CD8⁺ Т-лимфоциты распознают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с молекулами гистосовместимости I класса и убивают

клетки, инфицированные вирусами. CD4⁺ Т-лимфоциты (Т-хелперы) распознают вирусные антигены, находящиеся на антигенпредставляющих клетках в ассоциации с молекулами гистосовместимости II класса, и выполняют роль помощников в синтезе В-лимфоцитами специфических противовирусных антител [17]. Специфический клеточно-опосредованный ответ определяется антигенраспознающими CD8⁺ Т-лимфоцитами [18, 19]. При инфицировании кур вирусами гриппа птиц А/Н7N9 и А/Н9N2 наблюдали увеличение относительного количества CD8⁺ Т-клеток, и было показано, что эти клетки могли обеспечивать антивирусную защиту [20, 21]. Однако, согласно литературным данным, при иммунизации цыплят против вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2 наблюдали увеличение относительного количества CD4⁺ Т-клеток и уменьшение CD8⁺ Т-клеток [21, 22]. Для первичного исследования иммунного статуса и выявления выраженных нарушений иммунной системы определяют соотношение CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток. В опубликованных результатах исследований соотношение CD4⁺/CD8⁺ заметно повышалось после иммунизации и явно снижалось после заражения, что позволяло предположить усиление иммунитета при вакцинировании и подавление – при инфицировании [23–26]. Возможно, причиной недостаточного противовирусного иммунного ответа при вакцинации птиц и заражения поголовья в стадах вакцинированных птиц в Китае является дефицит CD8⁺ Т-клеток.

Важно изучение и гуморального иммунного ответа, так как вирус низкопатогенного гриппа птиц при ассоциированном течении с другими коинфекциями способен вызывать иммуносупрессию, а при подавлении иммунитета организма течение различных инфекционных болезней утяжеляется.

Таким образом, комплексное изучение параметров иммунного ответа цыплят при экспериментальном инфицировании низкопатогенным вирусом гриппа птиц А/Н9N2 представляет значительный интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Для заражения в опыте использовали изоляты низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А/Н9N2, относящиеся к генетическим линиям Y-280 (A/chicken/Tadjikistan/2379/2018, A/chicken/Primorsk/419/2018) и G1 (A/chicken/Chelyabinsk/30/2019), которые были выделены и идентифицированы в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Вирусовыделение проводили в 10-суточных свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных эмбрионах. Из биологического материала готовили 10–20%-ю суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2–7,4) и вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов в объеме 0,2 см³. От эмбрионов,

погибших после 24 ч инкубации и более, отбирали экстраэмбриональную жидкость (ЭЭЖ) с целью проведения последующих исследований. Для заражения цыплят использовали ЭЭЖ с инфекционной активностью 10⁶ ЭИД₅₀/см³, при этом титр гемагглютинирующей активности составлял 9 log₂.

Эксперимент на животных. В опыте использовали цыплят яичного кросса 30-суточного возраста, не имеющих антител к вирусу гриппа птиц и полученных из благополучных по инфекционным болезням хозяйств. Цыплята были разделены на три группы по 5 голов в каждой и содержались в изолированных боксах. Вирусосодержащую ЭЭЖ с инфекционной активностью 10⁶ ЭИД₅₀/см³ вводили цыплятам внутримышечно в объеме 0,5 см³. До заражения и в течение последующих

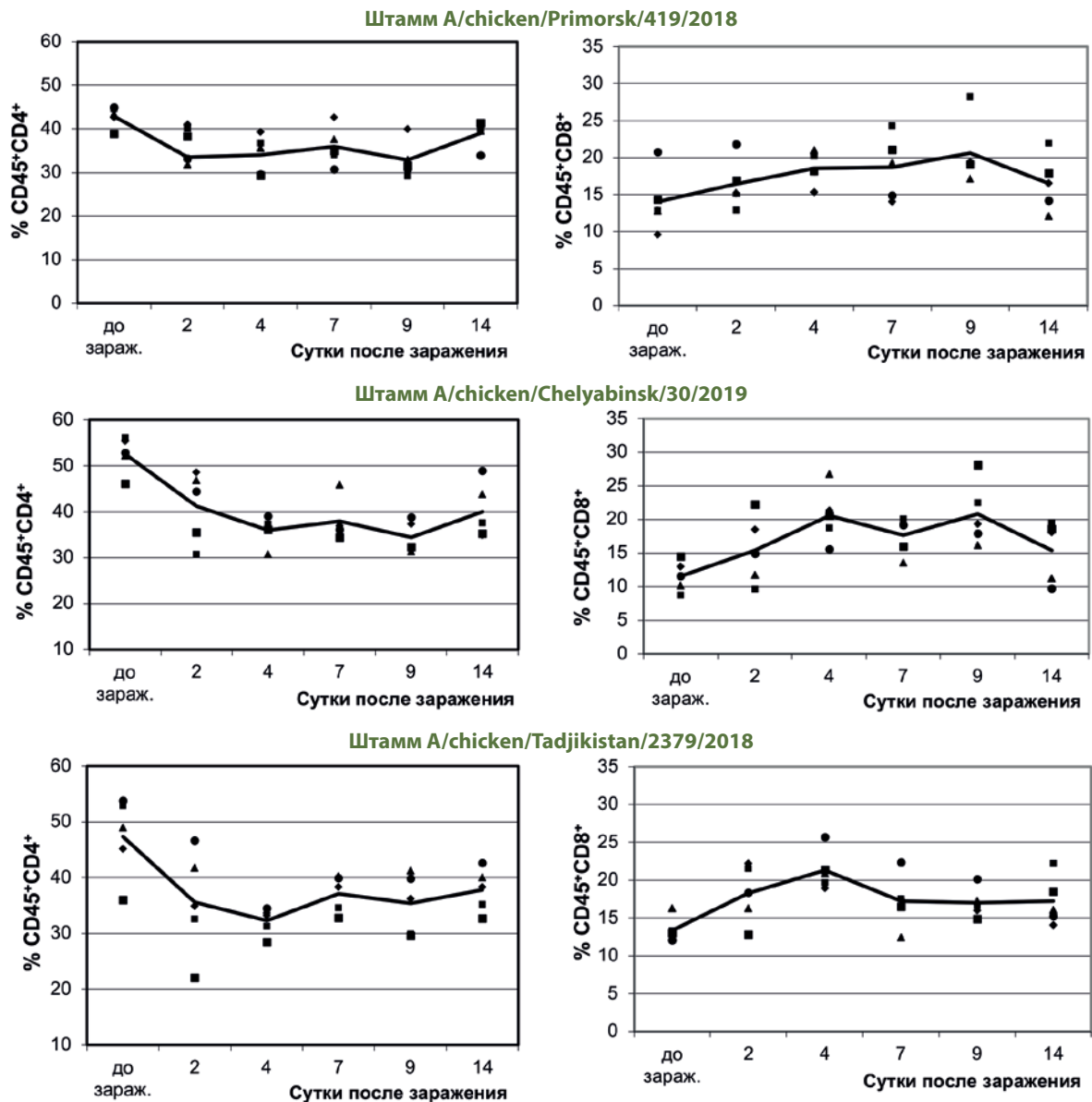


Рис. 1. Динамика уровня субпопуляций Т-лимфоцитов у цыплят после заражения изолятами вируса гриппа птиц подтипа Н9N2.

Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 1. Dynamics of T-cell subpopulations in chickens after their infection with H9N2 avian influenza virus isolates.

Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

14 сут производили забор крови у цыплят для изучения иммунного ответа серологическим методом в реакции торможения гемагглютинации и методом проточной цитофлуориметрии.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся в научных целях.

Серологические исследования. Исследование сывороток крови, полученных до заражения и через 14 сут после заражения, на наличие антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием коммерческого набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) в соответствии с инструкцией к нему. Перед исследованием сыворотки крови инактивировали прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин. Учет реакции проводили визуально после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках (в виде «пуговки»). Результат реакции считали положительным, если исследуемая сыворотка содержала специфические к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 антитела в титре 1:16 ($4,0 \log_2$) и выше.

Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов. Динамику изменения количественного соотношения популяций Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+$, $CD45^+CD4^+$ и $CD45^+CD8^+$) и В-лимфоцитов ($CD45^+$, $CD45^+CD19^+$) в периферической крови цыплят изучали методом проточной цитофлуориметрии. Для этого кровь у цыплят отбирали до заражения и на 2, 4, 7, 9 и 14-е сут после заражения в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА К3.

Выделение лимфоцитов из периферической крови цыплят проводили по стандартной методике [27] с использованием среды для разделения лимфоцитов FicollPaque tm PLUS (BioWest, Франция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD45-FITC, CD4-PE, CD8 α -PE, CD3-PE и Bu1a-PE (Southern biotech, США). Пробы лимфоцитов в объеме 50 мкл вносили в микропробирки в нескольких повторностях (в зависимости от количества используемых панелей антител). Добавляли по 2 мкл моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4–8 °С. Несвязавшиеся моноклональные антитела удаляли центрифугированием с фосфатно-буферным раствором в течение 10 мин при 260 g. Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

Статистический анализ результатов. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была проведена оценка клеточного и гуморального иммунного ответа цыплят после заражения тремя различными изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2.

После заражения на 4-е и 7-е сут у цыплят наблюдали клинические признаки заболевания: угнетенное состояние, взъерошенность оперения, отказ от корма. Гибели зараженных птиц не отмечено.

Для количественного анализа субпопуляций клеток лимфоцитов кровь, отобранную у цыплят до заражения и на 2, 4, 7, 9 и 14-е сут после заражения, исследовали методом проточной цитофлуориметрии.

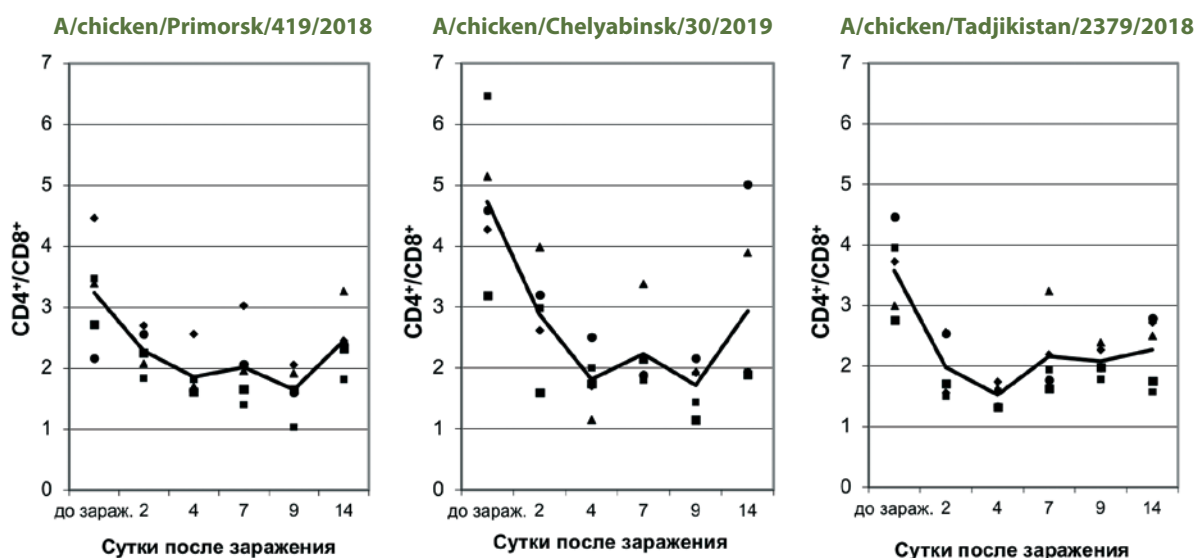


Рис. 2. Динамика отношения $CD4^+/CD8^+$ в лимфоцитах крови цыплят после заражения тремя изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2. Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 2. Dynamics of $CD4^+/CD8^+$ ratio in chicken blood lymphocytes after infection with three H9N2 avian influenza virus isolates. Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

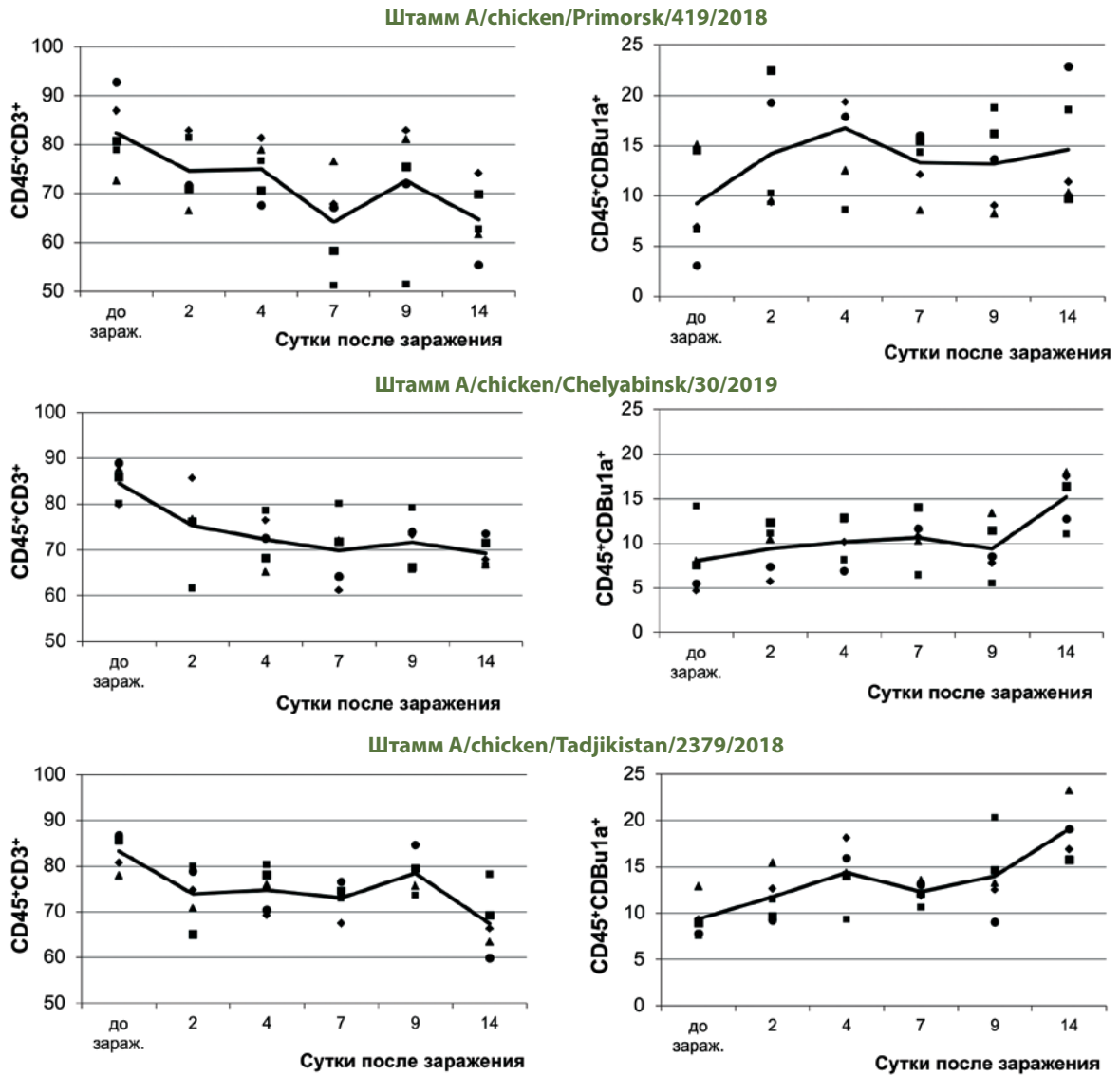


Рис. 3. Динамика уровня Т- и В-лимфоцитов в периферической крови цыплят после заражения тремя изолятами вируса гриппа птиц подтипа H9N2. Сплошная линия – среднее арифметическое значение по группе из 5 цыплят; отдельные символы – процентное количество клеток для каждой птицы из группы

Fig. 3. Dynamics of T- and B-lymphocyte levels in chicken peripheral blood after infection with three H9N2 avian influenza virus isolates. Solid line – arithmetic mean for group of 5 chickens; individual symbols – the percentage of cells for each chicken in the group

Через 2–4 сут после инфицирования в крови птиц регистрировали значительное снижение процента $CD45^+CD4^+$ Т-клеток (Т-хелперов) и увеличение процента $CD45^+CD8\alpha^+$ цитотоксических клеток (рис. 1). Относительное количество обеих популяций у инфицированных цыплят отличалось от первоначального уровня (до заражения) в 1,3–1,5 раза для Т-хелперов и в 1,3–1,9 раза для цитотоксических клеток.

Через 9 сут после заражения наблюдали увеличение уровня Т-хелперов в крови. Нормализацию объема обеих субпопуляций Т-лимфоцитов у инфицированных цыплят регистрировали к 14-м сут после заражения, но не у всех исследованных особей.

Развитие инфекционного процесса оказывало супрессивное влияние на иммунную систему зараженных цыплят. Полученные результаты о снижении относи-

тельной концентрации Т-хелперов в периферической крови после инфекции подтверждают данные таких исследователей, как X. Hao et al. [21] и M. Dai et al. [22]. Значительное повышение процента цитотоксических ($CD8^+$) Т-клеток в крови цыплят, инфицированных вирусом гриппа А/Н9N2, было также установлено M. Dai et al. на 5–7-е сут после заражения [22].

Анализ изменения отношения $CD4^+/CD8^+$ показал его снижение на 4-е сут после заражения у цыплят 1, 2 и 3-й группы в 1,9; 2,6 и 2,3 раза соответственно вследствие уменьшения относительного количества $CD4^+$ и увеличения объема $CD8\alpha^+$ Т-лимфоцитов (рис. 2). К 14-м сут после заражения показатель $CD4^+/CD8^+$ вновь увеличивался, но в среднем по группам его величина оставалась в 1,3–1,6 раза меньше первоначальных значений.

Yang Y. et al. [28] и Dai M. et al. [22] также показали, что вирусные инфекции у цыплят вызывают иммунную супрессию, которая выражалась в том числе снижением отношения CD4⁺/CD8⁺ в Т-лимфоцитах крови. Иммунизация вакцинами препаратами, наоборот, приводила к активации иммунного ответа и обратной динамике в сторону увеличения отношения CD4⁺/CD8⁺ [15, 22].

Xue M. et al. [23] и Yang S. et al. [24] считали, что увеличение отношения CD4⁺/CD8⁺ после иммунизации и снижение после инфицирования предполагало усиление иммунного ответа после вакцинирования и подавление иммунитета при вирусной инфекции. Вакцинация вызывала выраженный гуморальный иммунный и клеточный ответ CD4⁺ Т-клеток.

В исследованиях L. Fu et al. [25] и M. Dai et al. [26] было установлено, что вирусная инфекция в основном стимулировала CD8⁺ Т-клеточный ответ, а иммунизация – CD4⁺ Т-клеточный ответ. Высокий уровень антител к вирусу гриппа А/Н9N2 и повышение процента цитотоксических CD8⁺ Т-клеток играют важную роль в противовирусной защите [29, 30].

На рисунке 3 представлена динамика относительно количества Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят. Во всех трех группах отмечали снижение относительного количества Т-лимфоцитов в среднем на 15–20%, что может свидетельствовать о недостаточности клеточного иммунитета. Увеличение относительного количества В-лимфоцитов на 5–10% в зависимости от группы регистрировали только к 14-м сут после инфицирования. Наряду с увеличением процента Т-хелперов это свидетельствовало об активации иммунного ответа у инфицированных птиц.

Функция В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет, характеризуется преобразованием В-клеток в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины, которые имеют специфическую активность против внедрившегося антигена. При изучении динамики относительного количества В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят было установлено их увеличение.

Сыворотки крови цыплят исследовали до и на 14-е сут после заражения в РТГА. Результаты выявления специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 представлены в таблице.

У цыплят на 14-е сут после заражения среднее значение титра антител в РТГА во всех группах было выше 6 log₂. Высокий уровень специфических антител к вирусу гриппа птиц показал развитие выраженного постинфекционного гуморального иммунного ответа.

Dai M. et al. [22] при сравнительном анализе ключевых факторов иммунной защиты цыплят, инфицированных вирусом А/Н9N2, и СПФ-цыплят, иммунизированных инактивированной вакциной, пришли к выводу, что недостаток CD8⁺ Т-клеток является ключевой причиной иммунодефицита и инфицирования поголовья в стадах вакцинированных птиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовали ключевые факторы иммунного ответа цыплят, инфицированных разными вирусами гриппа птиц подтипа А/Н9N2. Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови цыплят, зараженных тремя изолятами вируса А/Н9N2, показал наличие изменений, вызванных вирусной инфекцией: снижение относительного

Таблица

Результаты исследований сывороток крови цыплят на наличие специфических антител к вирусу гриппа птиц подтипа А/Н9N2 в РТГА

Table

Results of HI tests of chicken sera for specific antibodies to А/Н9N2 avian influenza virus

Изолят	До заражения		14-е сут после заражения	
	Всего проб/положительных	Средний титр антител, log ₂	Всего проб/положительных	Средний титр антител, log ₂
A/chicken/Tadjikistan/2379/2018	15/0	0	15/15	8,7 ± 0,3
A/chicken/Primorsk/419/2018	15/0	0	15/15	8,1 ± 0,4
A/chicken/Chelyabinsk/30/2019	15/0	0	15/15	6,9 ± 0,4

количества Т-лимфоцитов в крови, существенное изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в сторону уменьшения процента CD4⁺ клеток и увеличения процента CD8⁺ клеток и, как следствие, снижения отношения CD4⁺/CD8⁺. При изучении динамики уровня Т- и В-лимфоцитов в крови инфицированных цыплят установлено снижение относительного количества Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества В-лимфоцитов. Результаты серологических исследований в РТГА показали выраженный гуморальный иммунный ответ. При изучении иммунитета существенных различий между тремя разными изолятами низкопатогенного гриппа птиц А/Н9N2 в гуморальном и клеточном ответе не обнаружили.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.3.4. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.
2. Peacock T. H. P., James J., Sealy J. E., Iqbal M. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*. 2019; 11 (7):620. DOI: 10.3390/v11070620.
3. Zhang P., Tang Y., Liu X., Liu W., Zhang X., Liu H., et al. A novel genotype H9N2 influenza virus possessing human H5N1 internal genomes has been circulating in poultry in eastern China since 1998. *J. Virol.* 2009; 83 (17): 8428–8438. DOI: 10.1128/JVI.00659-09.
4. Alexander D. J. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis.* 2007; 51 (1 Suppl): 161–166. DOI: 10.1637/7602-041306R.1.
5. Lee Y. J., Shin J. Y., Song M. S., Lee Y. M., Choi J. G., Lee E. K., et al. Continuing evolution of H9 influenza viruses in Korean poultry. *Virology*. 2007; 359 (2): 313–323. DOI: 10.1016/j.virol.2006.09.025.
6. Sun Y., Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein Cell*. 2015; 6 (1): 18–25. DOI: 10.1007/s13238-014-0111-7.
7. Li Y., Liu M., Sun Q., Zhang H., Zhang H., Jiang S., et al. Genotypic evolution and epidemiological characteristics of H9N2 influenza virus in Shandong Province, China. *Poult. Sci.* 2019; 98 (9): 3488–3495. DOI: 10.3382/ps/pez151.
8. Kishida N., Sakoda Y., Eto M., Sunaga Y., Kida H. Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Arch. Virol.* 2004; 149 (11): 2095–2104. DOI: 10.1007/s00705-004-0372-1.
9. Mancini D. A., Mendonça R. M., Dias A. L., Mendonça R. Z., Pinto J. R. Co-infection between influenza virus and flagellated bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2005; 47 (5): 275–280. DOI: 10.1590/s0036-46652005000500007.
10. Варкентин А. В., Волков М. С., Ирза В. Н. Низкопатогенный грипп птиц, вызванный вирусом подтипа Н9. Обзор литературы. *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. 2014; 12: 41–53. eLIBRARY ID: 22516488.

- Varkentin A. V., Volkov M. S., Irza V. N. Low pathogenic avian influenza induced with subtype H9 virus. Review of published literature. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2014; 12: 41–53. eLIBRARY ID: 22516488. (in Russ.)
11. Hassan K. E., Ali A., Shany S. A. S., El-Kady M. F. Experimental co-infection of infectious bronchitis and low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in commercial broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 2017; 115: 356–362. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.06.024.
12. Wang Y., Davidson I., Shkoda I., Golender N., Perk S., Lapin K., Khinich Y., Panshin A. Genetic characterization of HA gene of low pathogenic H9N2 influenza viruses isolated in Israel during 2006–2012 periods. *Virus Genes*. 2013; 46 (2): 255–263. DOI: 10.1007/s11262-012-0852-4.
13. Wang Y., Davidson I., Fouchier R., Spackman E. Antigenic cartography of H9 avian influenza virus and its application to vaccine selection. *Avian Dis.* 2016; 60 (1 Suppl): 218–225. DOI: 10.1637/11087-041015-Reg.
14. Hassan K. E., Shany S. A., Ali A., Dahshan A. H., El-Sawah A. A., El-Kady M. F. Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. *Poult. Sci.* 2016; 95 (6): 1271–1280. DOI: 10.3382/ps/pew068.
15. Astill J., Alkie T., Yitbarek A., Taha-Abdelaziz K., Bavananthasivam J., Nagy É., et al. Induction of immune response in chickens primed *in ovo* with an inactivated H9N2 avian influenza virus unvaccinated. *BMC Res. Notes*. 2018; 11 (1):428. DOI: 10.1186/s13104-018-3537-9.
16. Волков М. С., Варкентин А. В., Ирза В. Н. О распространении вируса низкопатогенного гриппа А/Н9Н2 в мире и на территории Российской Федерации. Проблемы искоренения болезни. *Ветеринария сегодня*. 2019; (3): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
- Volkov M. S., Varkentin A. V., Irza V. N. Spread of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in the world and Russian Federation. Challenges of disease eradication. *Veterinary Science Today*. 2019; (3): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
17. Julius M., Maroun C. R., Haughn L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. Today*. 1993; 14 (4): 177–183. DOI: 10.1016/0167-5699(93)90282-p.
18. Overgaard N. H., Jung J. W., Steptoe R. J., Wells J. W. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97 (1): 31–38. DOI: 10.1189/jlb.1RU0814-382.
19. Kwon J. S., Lee H. J., Lee D. H., Lee Y. J., Mo I. P., Nahm S. S., et al. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Res.* 2008; 133 (2): 187–194. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.12.019.
20. Suarez D. L., Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 2000; 24 (2–3): 269–283. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00078-6.
21. Hao X., Li S., Chen L., Dong M., Wang J., Hu J., et al. Establishing a multicolor flow cytometry to characterize cellular immune response in chickens following H7N9 avian influenza virus infection. *Viruses*. 2020; 12 (12):1396. DOI: 10.3390/v12121396.
22. Dai M., Li S., Keyi Shi, Sun H., Zhao L., Deshui Yu, et al. Comparative analysis of key immune protection factors in H9N2 avian influenza viruses infected and immunized specific pathogen-free chicken. *Poult. Sci.* 2021; 100 (1): 39–46. DOI: 10.1016/j.psj.2020.09.080.
23. Xue M., Shi X., Zhao Y., Cui H., Hu S., Cui X., Wang Y. Effects of reticuloendotheliosis virus infection on cytokine production in SPF chickens. *PLoS One*. 2013; 8 (12):e83918. DOI: 10.1371/journal.pone.0083918.
24. Yang S., Li G., Zhao Z., Huang Z., Fu J., Song M., et al. Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharides enhance immune responses in chickens infected by avian leukosis virus subgroup B. *Immunol. Invest.* 2018; 47 (5): 443–456. DOI: 10.1080/08820139.2018.1435689.
25. Fu L., Wang X., Zhai J., Qi W., Jing L., Ge Y., et al. Changes in apoptosis, proliferation and T lymphocyte subtype on thymic cells of SPF chickens infected with reticuloendotheliosis virus. *Mol. Immunol.* 2019; 111: 87–94. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.04.003.
26. Dai M., Li S., Shi K., Liao J., Sun H., Liao M. Systematic identification of host immune key factors influencing viral infection in PBL of ALV-J infected SPF chicken. *Viruses*. 2020; 12 (1):114. DOI: 10.3390/v12010114.
27. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. Под ред. А. И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013; Т. 2: 274–314.
- Meditinskie laboratornyye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoi laboratornoi diagnostike = Medical laboratory techniques: Guidelines for clinical laboratory diagnostics. Ed. by A. I. Karpishchenko. 3rd edition, revised and supplemented. Moscow: GEOTAR-Media; 2013; Vol. 2: 274–314. (in Russ.)
28. Yang Y., Dong M., Hao X., Qin A., Shang S. Revisiting cellular immune response to oncogenic Marek's disease virus: the rising of avian T-cell immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77 (16): 3103–3116. DOI: 10.1007/s00018-020-03477-z.
29. Dai M., Xu C., Chen W., Liao M. Progress on chicken T cell immunity to viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019; 76 (14): 2779–2788. DOI: 10.1007/s00018-019-03117-1.
30. Liu A. L., Li Y. F., Qi W., Ma X. L., Yu K. X., Huang B., et al. Comparative analysis of selected innate immune-related genes following infection of immortal DF-1 cells with highly pathogenic (H5N1) and low pathogenic (H9N2) avian influenza viruses. *Virus Genes*. 2015; 50 (2): 189–199. DOI: 10.1007/s11262-014-1151-z.

Поступила в редакцию / Received 27.08.2021

Доработана после рецензирования / Revised 08.10.2021

Принята к публикации / Accepted 18.10.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Осипова Ольга Сергеевна, ветеринарный врач референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Волкова Марина Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Фролов Сергей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Андрейчук Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Чвала Илья Александрович, кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Olga S. Osipova, Veterinarian, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Marina A. Volkova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Sergey V. Frolov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry B. Andreychuk, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Ilya A. Chvala, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.