

А.А.Сергеев, О.В.Пьянков, О.К.Демина, А.Н.Шиков, Ал.А.Сергеев, Л.Н.Шишкина,
А.С.Сафатов, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КУР К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Все изученные высокопатогенные (по IVIP) штаммы вирус гриппа птиц А/Н5N1 (ВГП), выделенные на территории России и стран СНГ, при аэрозольном заражении проявляют высокую достоверно не различающуюся вирулентность для кур (50 % аэрогенная летальная доза – от 2 до 15 50 % эмбриональных инфицирующих доз). Вероятность инфицирования этих животных ВГП при интраназальном способе заражения в 20 раз выше, чем при пероральном способе заражения, и в 300 раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. Первичным органом-мишенью для вируса у интраназально инфицированных кур является дыхательный тракт (слизистая носовой полости). Отмечено существование фекально-назального механизма передачи ВГП у кур.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц А/Н5N1, курица, интраназальное заражение, аэрозольное инфицирование, оральное заражение, интрагастральное инфицирование, 50 % летальная доза, накопление вируса, органы и ткани курицы.

A.A.Sergeev, O.V.P'yankov, O.K.Demina, A.N.Shikov, Al.A.Sergeev, L.N.Shishkina, A.S.Safatov,
A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Studies of Sensitivity to Avian Flu Virus A/H5N1 in Chickens

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo

All the studied highly pathogenic (according to the IVIP) strains of avian flu virus A/H5N1 (AFV), isolated in the territory of the Russian Federation and CIS countries, in case of aerosol challenge (aerogenic LD₅₀ – 2–15 embryonic ID₅₀) appear to be highly virulent for chickens. The chance of AFV infection of chickens in case of intranasal challenge is 20 times as great as in the case of peroral one, and 300 times as great as in the case of intragastral one, which bears evidence to higher sensitivity to AFV of the tissues of avian respiratory organs, in comparison with the tissues of gastro-intestinal tract. Therewith, primary target organ for virus in intranasal infected birds is their respiratory channel (mucous membrane of the nasal cavity in particular). Registered is the possibility of existence of fecal-nasal AFV transfer mechanism in chickens.

Key words: Avian flu virus A/H5N1, chicken, intranasal challenge, aerosol challenge, oral challenge, intragastral challenge, LD₅₀, virus accumulation, avian organs and tissues.

Вирус гриппа птиц (ВГП) является объектом исследований многих ученых в мире в связи с участвовавшими в последние годы случаями массовой гибели дикой и домашней птицы от гриппа. В связи с этим целью работы являлось изучение на курах инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1, выделенных от сельскохозяйственной птицы на территории России и стран СНГ, и механизма их заражения.

Материалы и методы

В работе использовали восемь высокопатогенных штаммов ВГП субтипа Н5N1 (по IVIP), выделенных на территории России и стран СНГ: А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; А/Chicken/Kurgan/05/2005; А/Duck/Kurgan/08/2005; А/Chicken/Crimea/04/2005; А/Chicken/Omsk/06; А/Chicken/Krasnodar/02/06; А/Chicken/Dagestan/06. Все штаммы на 2–3-м пассажах (от источника выделения) при культивировании на куриных эмбрионах (КЭ) были наработаны до концентрации 7,5–8,5 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл) и хранились до использования в экспериментах в низкотемпературной морозильной камере при –70°С.

В исследованиях использовали кур кросса

Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд массой (300±20) г, полученных из Новосибирской птицефабрики. Птиц содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4]. Наблюдение за инфицированной птицей осуществляли в течение 12 сут с момента заражения. Культивирование вируса, находящегося в биологических пробах, проводили на 9-суточных КЭ.

Интраназальное и оральное заражение кур проводили традиционными методами, вводя каждому животному по 0,02 и 0,1 мл вирусосодержащего материала соответственно, с применением в первом случае седативных средств. Интрагастральное инфицирование кур осуществляли следующим способом: на первом этапе в пищевод животных вводили металлическую трубку диаметром 0,7 мм с оливой на конце; затем сквозь нее в желудок пропускали пластиковый катетер (внутренний диаметр – 0,4 мм), через который и вводили шприцем вирусосодержащую суспензию в объеме 0,1 мл; после этого вынимали пластиковый катетер, а затем – и металлическую трубку. Это позволило практически исключить травматическое воздействие на верхние отделы пищеварительного тракта кур при интрагастральном заражении и минимизировать ве-

роятность попадания вирусосодержащего материала в ротовую полость и пищевод животных. Значения 50 % летальных доз (LD_{50}) штаммов ВГП определяли при интраназальном, оральном и интрагастральном заражении кур согласно общепринятой методике [1].

Аэрозольное инфицирование кур осуществляли тем же способом и с использованием того же оборудования, как это было ранее описано [5], создавая вирусосодержащий полидисперсный аэрозоль с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц – 1,1 мкм ($\delta=1,2$). Результат заражения оценивали путем расчета 50 % аэрогенной летальной дозы (ALD_{50}) штаммов ВГП [5], с учетом минутного объема дыхания используемых в экспериментах кур, который составлял 0,13 л/мин [6].

Специфичность гибели кур оценивали по наличию вируса гриппа в гомогенатах легких кур, павших в экспериментах. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах тканей животных и аэрозольных пробах проводили традиционным методом путем титрования на КЭ с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации [2].

Образцы органов (стенки носовой полости, трахея, легкие, пищевод, желудок, толстый и тонкий кишечник) и сыворотки крови интраназально инфицированных кур отбирали каждые 12–24 ч в течение 2,5 сут после заражения (п.з.), умерщвляя по 3 животных на каждую временную точку методом цервикальной дислокации. С целью приготовления гомогенатов органы кур дезинтегрировали механическим способом с помощью речного песка в ступке. Титр вируса в гомогенатах органов и сыворотке крови инфицированной птицы определяли путем титрования на КЭ.

Статистическую обработку данных и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1].

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведены сравнительные исследования чувствительности кур к аэрозольному заражению различными штаммами ВГП. При этом отмечено, что через 3–5 сут п.з. у части животных регистрировали некоторые клинические признаки заболевания: сниженная двигательная активность, нарушение походки, уменьшение нормальной вокализации, цианоз и отек головы, отек ног, пятнистость и бледность голени и другие. Смерть наступала на 5–7-е сутки п.з. Показатели ALD_{50} для всех изучаемых штаммов ВГП достоверно не различались и находились в диапазоне от 0,3 до 1,2 lg ЭИД₅₀.

На следующем этапе исследований были получены показатели вирулентности штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП при инфицировании кур тремя различными способами (интраназальный, оральный и интрагастральный). Было отмечено, что вирус проявлял наибольшую вирулентность для кур при интраназальном способе его введения (LD_{50} – 2,7 lg ЭИД₅₀) по сравнению с таковой с оральным и тем более интрагастральным способами введения

(LD_{50} – 3,9 lg ЭИД₅₀ и 5,2 lg ЭИД₅₀ соответственно). Это обстоятельство свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. При этом более высокой эффективностью инфицирования птицы штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП обладал аэрозольный способ (ALD_{50} – 1,2 lg ЭИД₅₀) по сравнению с интраназальным.

С целью выявления первичного органа-мишени у кур, в клетках которого происходит размножение ВГП при интраназальном способе заражения, было проведено изучение динамики накопления штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в некоторых органах (респираторного и желудочно-кишечного тракта) и крови животных, интраназально инфицированных 3–5 LD_{50} вируса для этих животных. Результаты исследований представлены в таблице. Показано, что первичным органом-мишенью для вируса является слизистая носовой полости кур, в которой его концентрация достигает максимальной величины к 36 ч п.з., и возбудитель заболевания практически исчезает к 60 ч п.з. Через 36 ч п.з. патоген обнаруживается во многих исследованных органах животных как респираторного, так и желудочно-кишечного тракта, достигая максимальных значений к 60 ч п.з. (максимальная временная точка изучения).

В научной литературе приводятся данные о интраназальном, внутривенном и оральном способах заражения птиц ВГП [8, 10]. Для выяснения механизма распространения вируса гриппа птиц среди кур мы дополнительно применили и другие способы их инфицирования: интрагастральный и аэрозольный. Все использованные в работе штаммы ВГП, относящиеся к высокопатогенным для кур (внутривенный индекс патогенности, IVIP – от 2,7 до 3,0), проявляли одинаково высокую вирулентность для кур при аэрозольном заражении (ALD_{50} – от 2 до 20 ЭИД₅₀) несмотря на то, что источники их выделения различались по виду сельскохозяйственной птицы (курица, утка, индейка). А это означает то, что штаммы ВГП, выделенные от уток и индеек, могут потенциально вызывать серьезные эпизоотии и среди кур.

Сравнительные эксперименты на курах при их заражении разными способами показали более высокую чувствительность к ВГП тканей респираторного тракта этих животных по сравнению с таковой у тканей желудочно-кишечного тракта, что в определенном смысле противоречит общеизвестному представлению о фекально-оральном механизме передачи гриппа птиц среди кур [3, 7, 10]. Кроме того, с учетом данных оценки вирулентности вируса, введенного орально и интрагастрально, отмечена в 20 раз большая чувствительность к патогену верхнего отдела желудочно-кишечного тракта кур (слизистая ротовой полости), чем нижнего. Эти кажущиеся противоречия объясняются следующими двумя обстоятельствами. Во-первых, существующими в норме у кур анатомическими особенностями нёба, разделяющего ротовую полость от носовой, которое имеет

Динамика распространения вируса гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) у кур при интраназальном заражении 3–5 ЛД₅₀

Вид биопробы	Биокоцентрация вируса (M±Sm) [в lg ЭИД ₅₀ /г (мл)] через разные промежутки времени после инфицирования:			
	12 ч	24 ч	36 ч	60 ч
Сыворотка крови	<0,2	<0,2	2,5±0,3	<0,2
Стенки носовой полости	<0,2	4,5±0,3	5,0±0,4	<0,2
Трахея	<0,2	<0,2	3,0±0,3	<0,2
Легкие	<0,2	<0,2	1,8±0,2	5,8±0,3
Пищевод	<0,2	<0,2	<0,2	3,5±0,3
Желудок	<0,2	<0,2	3,5±0,3	4,5±0,4
Кишечник	<0,2	<0,2	1,8±0,2	3,5±0,3

Примечание. «М» – средняя концентрация вируса в грамме органа или миллилитре сыворотки крови; «Sm» – стандартное отклонение (коэффициент Стьюдента для оценки 95 % доверительных интервалов для всех величин составляет 1,96); «0,2» – величина в lg ЭИД₅₀/г (мл) чувствительности использованного метода титрования вируса.

щель практически от ноздрей до глотки. Благодаря данной щели в нёбе продукты питания, контаминированные вирусом, поступившие в ротовую полость этих животных, имеют тесный контакт и со слизистой оболочкой носа. Во-вторых, в экспериментах по интраназальному заражению кур нами было показано более раннее размножение ВГП в респираторном тракте этих животных (слизистая носовой полости) по сравнению с органами желудочно-кишечного тракта, несмотря на то, что вирусодержащая суспензия, вводимая интраназально, несомненно, попадала и в пищеварительный тракт.

Совокупность вышеперечисленных обстоятельств свидетельствует о том, что ВГП, попавший с продуктами питания в ротовую полость кур, с высокой вероятностью первично инфицирует птицу через слизистую носовой полости. А это, в свою очередь, дает основание утверждать о существовании фекально-назального механизма передачи инфекции среди кур. Сравнивая два способа респираторного инфицирования животных, обращает на себя внимание более высокая эффективность заражения птицы аэрозольным способом (в 30 раз) по сравнению с интраназальным. Это, скорее всего, объясняется большей эффективностью распределения (осаждения) вводимого с аэрозодем вирусодержащего материала по респираторному тракту кур, чем таковая при интраназальном заражении, при котором основная часть вируса через щель в нёбе попадает на слизистую ротовой полости (пищеварительный тракт), обладающей существенно меньшей чувствительностью к ВГП.

Таким образом, все изученные высокопатогенные штаммы ВГП А/Н5N1 при аэрозольном заражении проявляют высокую достоверно не различающуюся вирулентность для кур (АЛД₅₀ – 2–15 ЭИД₅₀). Вероятность инфицирования этих животных ВГП при интраназальном способе заражения в 20 раз выше, чем при пероральном способе заражения и в 300 раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. Первичным органом-мишенью у кур интраназально инфицированных штаммом А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП является дыхательный тракт (слизистая

носовой полости). Результаты изучения инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц на курах и механизма их заражения свидетельствуют о существовании фекально-назального механизма передачи ВГП у кур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962.
2. Мейхи Б., редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988.
3. Онищенко Г.Г., редактор. Грипп птиц в Сибири – 2005. Новосибирск: Изд-во «Церис»; 2006. 192 с.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
5. Сергеев А.Н., Жуков В.А., Порываев В.Д., Пьянков О.В., Шишкина Л.Н., Петрищенко В.А. и др. Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа. Вopr. вирусол. 2002; (4):44–4.
6. Lasiewski R.C., Calder W.A. A preliminary allometric analysis of respiratory variables in resting birds. Respir. Physiol. 1971; 11(2):152–66.
7. Shortridge K.F., Zhou N.N., Guan Y. et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology. 1998; 252(2):331–42.
8. Swayne D.E. Pathobiology of H5N2 Mexican Avian Influenza Virus Infections of Chickens. Vet. Pathol. 1997; 34:557–67.
9. Swayne, D.E., Halvorson, D.A. Influenza. In: Diseases of Poultry, Y.M.Saif, ed. (Ames, IA, Iowa State Press. Blackwell Publishing Co); 2003. P. 135–60.
10. Yamamoto Y., Nakamura K., Okamoto M., Yamada M., Mase M. Avian Influenza Virus (H5N1) Replication in Feathers of Domestic Waterfowl. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14(1):149–51.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: 1962.
 2. Meykhi B., editor. [Virology. Methods]. M.; 1988.
 3. Onishchenko G.G., editor. [Avian Flu in Siberia – 2005]. Novosibirsk; 2006. 192 p.
 4. [National Research Council. Guidelines on Care and Use of Laboratory Animals]. Washington: National Academy; 1996.
 5. Sergeev A.N., Zhukov V.A., Poryvaev V.D., P'yankov O.V., Shishkina L.N., Petrishchenko V.A. et al. [Development of a simple method for direct evaluation of disease progression in mice and rats in case of aerogenic infestation with influenza virus]. Vopr. Virusol. 2002; (4):44–4.
- Authors:**
Sergeev A.A., P'yankov O.V., Demina O.K., Shikov A.N., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Шиков А.Н., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 26.06.11.