

БОЛЕЗНИ ПТИЦ

УДК 619:578.832.1:636.5.004.12

И.А. Чвала, Т.Б. Манин, В.В. Дрыгин, Е.В. Белик

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H5N1, ВЫДЕЛЕННОГО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006 ГОДУ

Введение

Высокопатогенный грипп птиц (ВППП) – острая контагиозная системная вирусная инфекция домашних и диких птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, множественными кровоизлияниями и поражениями внутренних органов, мозга и кожи. Смертность птиц, особенно молодняка, может достигать 100%. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус с сегментированным геном семейства *Orthomyxoviridae*, рода *Influenzaevirus*, типа А [2, 4].

Дикие птицы, принадлежащие к отрядам гусеобразных (различные виды уток, гусей и лебедей) и ржанкообразных (включая чаек), являются природным резервуаром вируса гриппа. На сегодня зарегистрировано 105 видов диких птиц, принадлежащих к 26 семействам, от которых был выделен вирус [4, 9]. Также установлены случаи инфицирования вирусом гриппа А птиц различных животных: свиней, лошадей, норок, морских млекопитающих и др. [3, 6].

Большинство штаммов вируса, вызвавших вспышки ВППП среди домашних птиц, относится к H5 и H7 подтипам. Однако не все штаммы данных подтипов высокопатогенны, и одновременно они могут быть авирулентны для диких птиц. Используя молекулярно-генетические методы диагностики, такие, как ПЦР и нуклеотидное секвенирование фрагмента генома вируса, кодирующего сайт нарезания бел-

ка гемагглютинина (НА), можно предположить вирулентность исследуемого изолята вируса гриппа. Таким образом, гемагглютинин лишь частично определяет патогенные свойства [2, 13]. Решающее значение при изучении биологических свойств имеют эксперименты с использованием лабораторных животных. Согласно МЭБ, определение индекса патогенности (IVPI) позволяет охарактеризовать изолят вируса как высокопатогенный (IVPI > 1,2) или низкопатогенный (IVPI < 1,2) [10].

Целью настоящей работы явилось изучение биологических свойств изолятов вируса гриппа A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1 и A/chicken/Volgograd/236/2006 H5N1, выделенных в Российской Федерации при вспышках заболевания в 2006 году.

Материалы и методы

Вирус. В работе были использованы изоляты вируса гриппа типа А:

- A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1, выделенный в феврале 2006 года из патологического материала от погибшего домашнего кота (п. Шамхал, Республика Дагестан);

- A/chicken/Volgograd/236/2006 H5N1, выделенный в марте 2006 года из патологического материала от кур (х. Веселый Котельниковского района Волгоградской области).

Лабораторные животные. При определении IVPI инокулировали 6-недельных СПФ-цыплят, не иммунных к вирусу ГП.

Выделение вируса. Вирусовыделение

проводили на 9-11-суточных СПФ-куриных эмбрионах (КЭ) (10). Из патологического материала готовили 10% суспензию на фосфатно-буферном растворе (рН 7,2-7,4) и вводили в аллантоисную полость КЭ в объеме 0,2 см³. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, использовались для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) и проведения дальнейших исследований.

Определение индекса патогенности. Для определения IVPI использовали общепринятую методику [10]. Исследуемую вируссодержащую ЭЭЖ в разведении 1:10 на стерильном физиологическом растворе вводили внутривенно десяти 6-недельным неиммунным цыплятам в дозе 0,1 см³. За птицами осуществляли ежесуточное наблюдение в течение 10 суток и учитывали клиническое состояние каждой птицы при помощи коэффициента: 0 – птица клинически здорова; 1 – больная (отмечены признаки развития заболевания, такие, как угнетение, отказ от корма и воды, цианоз кожи или ее производных, нарушения со стороны респираторного или пищеварительного тракта, нервные явления); 2 – тяжело больная (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:

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

B_i – число больных в сутки i ;

TB_i – число тяжелобольных в сутки i ;

P_i – число погибших в сутки i ;

N – общее число птиц в эксперименте

РГА и РТГА. РГА и РТГА проводили по общепринятой методике с использованием панели специфических сывороток к вирусу гриппа А птиц подтипов H5N1 (ФГУ «ВНИИЗЖ»), H7N1, H9N2 (Институт зоопрофилактики, г. Венеция, Италия), ньюкаслской болезни (ФГУ «ВНИИЗЖ»). В качестве положительного контроля в РТГА использовали антиген вируса гриппа подтипа H5N1 (ФГУ «ВНИИЗЖ») [10].

Результаты и обсуждение

Для выделения вируса из пробы патологического материала от кур исследуемой суспензией инокулировали 10-суточных КЭ, гибель эмбрионов регистрировали в течение 24-48 ч. После введения суспензии внутренних органов (головной мозг,

легкие, трахея, печень, почки) от погибшего кота в аллантоисную полость гибель всех инокулированных КЭ произошла в течение 24 ч инкубации, и собранная ЭЭЖ имела титр в РГА 1:2-1:4, что потребовало проведения дополнительного пассажа. В результате проделанной работы удалось выделить изолят A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1 с титром в РГА 1:512, и гибель всех КЭ произошла в течение 24-48 ч инкубации. На тушках эмбрионов наблюдали многочисленные кровоизлияния, особенно интенсивные в области головы. Результаты РТГА с ЭЭЖ, полученной после вирусыведения, представлены в табл. 1.

Исследуемые в РТГА пробы не взаимодействовали со специфическими сыворотками к вирусу гриппа подтипов H7N1, H9N2 и ньюкаслской болезни. Как видно из представленных данных, выделенные гемагглютинирующие агенты реагировали только с положительной сывороткой против вируса гриппа подтипа H5N1. Кроме того, выделение вируса ГП подтипа H5N1 из патологического материала на СПФ-куриных эмбрионах возможно в течение 24-48 ч после инокуляции.

Вирулентность каждого изолята для птиц устанавливали путем определения индекса патогенности. При клиническом осмотре внутривенно инокулированных цыплят наблюдались признаки острой системной инфекции: отказ от корма и воды, гиподинамия, затрудненное дыхание, цианоз гребня, бородак и лап, конъюнктивиты, отеки в области головы и шеи. Также удалось наблюдать нервные явления у отдельных цыплят: тремор, запрокидывание головы и нарушение координации движений, предшествующие их гибели. Результаты клинического осмотра, учет гибели птиц и определение IVPI представлены в табл. 2.

Согласно полученным результатам, данные изоляты вируса гриппа типа А являются высокопатогенными. В каждом эксперименте клинические признаки заболевания у большинства птиц отмечали уже спустя сутки после внутривенного введения вирусосодержащей жидкости, и в интервале 1-3 суток регистрировали гибель всех цыплят, что позволяет судить об остром течении болезни. При патолого-анатомическом вскрытии отмечали отек и цианоз кожи, гребня, бородак и лап, конъюнктивиты, геморрагические поражения в различных внутренних органах, в том числе в головном мозге, гиперемии и отек легких.

Таблица 1

Результаты РТГА с экстраэмбриональной жидкостью

Исследуемая проба	РГА	Специфическая сыворотка крови кур к вирусу гриппа подтипа H5N1	Контроль -2
Контроль +1	1:128	1:256	-3
A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1	1:512	1:256	-
A/chicken/Volgograd/236/2006 H5N1	1:32	1:256	-

1 - антиген вируса гриппа птиц диагностический подтипа H5N1;
2 - нормальная сыворотка крови кур;
3 - отрицательная реакция

Таблица 2

Результаты наблюдения за птицами после заражения

Исследуемый изолят	Клиническое состояние птиц	Время наблюдений, сут.										IVPI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
№ 1	Здоровые	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,98
	Больные	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Тяжелобольные	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Погибшие	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
№ 2	Здоровые	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,88
	Больные	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Тяжелобольные	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Погибшие	3	9	10	10	10	10	10	10	10	10	

№ 1 – A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1;
№ 2 – A/chicken/Volgograd/236/2006 H5N1;
-- данному критерию не удовлетворяет ни одна из птиц

Кроме того, наши предыдущие исследования, проведенные в 2005 году, характеризовали ранее выделенный при вспышке в Новосибирской области изолят A/duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1 как высокопатогенный (IVPI=2,87) [1]. Таким образом, в 2006 году вирус гриппа подтипа H5N1 сохранил чрезвычайно высокую степень патогенности.

При изучении вирулентности изолята A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1 для цыплят индекс патогенности имел крайне высокое значение (IVPI=2,98), и большинство птиц в эксперименте погибло в течение 24 ч после заражения. Данный изолят был выделен при вспышке заболевания ВППП среди диких и домашних птиц в Республике Дагестан, из внутренних органов погибшего кота, что позволяет предположить репродукцию вируса в организме животного. Ранее было экспериментально установлено [11, 14], что вирусы гриппа человека и птиц способны инфицировать кошек, но появления каких-либо клинических признаков, а тем более гибели при этом не наблюдали. Однако совсем недавно появились сообщения о том, что вирус гриппа А птиц подтипа

H5N1 вызвал заболевание и гибель тигров и леопардов в зоопарке в Таиланде [5, 7], кошек в Германии [8] и Австрии [12]. Данные факты подчеркивают возможность преодоления межвидового барьера, инфицирования и гибели кошачьих, а потенциально, и других млекопитающих вследствие заражения вирусом подтипа H5N1. В результате выполненной работы сложно утверждать что инфекция, вызванная изолятом A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1, послужила причиной гибели кота в Дагестане, но сам факт выделения высокопатогенного вируса гриппа А от млекопитающего на фоне продолжающейся эпизоотии среди птиц в мире требует дальнейшего и всестороннего изучения этого опасного заболевания.

Выводы

Изучены биологические свойства изолятов вируса гриппа типа А, изолированных от разных видов животных при вспышках заболевания в Российской Федерации в течение 2006 года. После инокуляции СПФ-куриных эмбрионов суспензией патологического материала были выделены изоляты A/cat/Dagestan/87/2006 H5N1 и A/chicken/Volgograd/236/2006 H5N1. Гибель

всех инокулированных КЭ произошла в течение 24-48 ч, и в РТГА данные изоляты взаимодействовали только со специфической сывороткой к вирусу гриппа А подтипа H5N1. По результатам определения IV-

PI данные изоляты охарактеризованы как высокопатогенные. Изучены клинические признаки и патолого-анатомические изменения при гриппе у цыплят, установлено острое течение болезни.

РЕЗЮМЕ

Проведено изучение биологических свойств изолятов вируса гриппа подтипа H5N1, выделенных на территории Российской Федерации в 2006 году. Вирус был изолирован на СПФ-куриных эмбрионах и типирован в РТГА. По результатам определения индексов патогенности изоляты признаны высокопатогенными. Изучены клинические признаки болезни и течение инфекции у цыплят.

SUMMARY

Biological characteristics of avian influenza A virus isolates, recovered in the Russian Federation territories in 2006, were studied. The virus was isolated in SPF chicken embryos and subtyped by hemagglutination inhibition test. The IVPI values demonstrated that isolates were highly pathogenic. Clinical signs and the disease course in chicks were studied.

Литература

1. Чвала, И.А. Биологические свойства изолята вируса гриппа птиц A/Duck/Novosibirsk/2/2005 H5N1 / И.А. Чвала, В.В. Дрыгин // Ветеринарная патология. 2006. № 4(19). С.60-63.
2. Alexander, D.J. Orthomyxovirus infections / D. J. Alexander // Virus Infections of Birds. Amsterdam etc., 1993. P.287-316.
3. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls / V.S. Hinshaw, G.M. Air, A.J. Gibbs [et al.] // J. Virol. 1982. Vol. 42. P.865-872.
4. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl / H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang [et al.] // Nature. 2005. Vol.436. P.191-192.
5. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards / J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, T. Kuiken [et al.] // Emerg. Inf. Dis. 2004. N 10. P.2189-2191.
6. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman [et al.] // Microbiol. Rev. 1992. Vol. 56. P.152-179.
7. Feline friend or potential foe? / T. Kuiken, R. Fouchier, G. Rimmelzwaan [et al.] // Nature. 2006. N 440. P.741-742.
8. Further Spread of Avian Influenza in Europe, Detection in French Farmed Birds and German Cat // Editorial Team, European communicable disease bulletin 2006. / www.eurosurveillance.org/ew/2006/060302.asp.
9. Global patterns of influenza A virus in wild birds/ B. Olsen, V.J. Munster, A. Wallensten [et al.] // Science. 2006. Vol. 31. P.2384-2388.
10. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 2005. www.OIE.int.
11. Replication of avian influenza A viruses in mammals // V.S. Hinshaw, R.G. Webster, B.C. Easterday, W.J. Bean // Infect. Immun. 1981. Vol. 34. P.354-361.
12. Subclinical infection with avian influenza A H5N1 virus in cats / M. Leschnik, J. Weikel, K. Mostl [et al.] // Emerg. Inf. Dis. Vol. 13 (ahead of print).
13. Swayne, D.E. Highly pathogenic avian influenza / D.E. Swayne, D.L. Suarez // Rev. Sci. Tech. 2000. Vol. 19. P.463-468.
14. Vahlenkamp, T.W. Influenza virus infections in mammals / T.W. Vahlenkamp, T.C. Harder // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2006. Bd. 119. S. 123-131.

УДК 619:616.98:578.834.11:636.52/.58

О.А. Чупина, Е.В. Овчинникова, Л.О. Щербакова, Н.С. Мудрак, В.И. Диев, А.В. Борисов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПА И СТЕПЕНИ ПАТОГЕННОСТИ ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР

Введение

Инфекционный бронхит кур (ИБК) наносит существенный экономический ущерб промышленному птицеводству. Антигенная структура вируса ИБК чрезвычайно изменчива, что затрудняет вакцинацию и профилактику данного заболевания [1]. Поэтому выделение, генетическая идентификация возбудителя, определение его биологических свойств и эпизоотической роли являются актуальными задачами. В ФГУ «ВНИИЗЖ» исследуются пробы па-

тологического материала, которые поступают из птицеводств разных регионов России и ближнего зарубежья. На основании молекулярно-генетических и серологических методов установлено, что большинство выявляемых изолятов вируса ИБК относится к широко распространенному в России серотипу Массачусетс [3, 5, 7]. Однако за последний период времени на территории РФ стали выявляться изоляты вируса ИБК, генетически и антигенно отличающиеся от ранее встречав-