

А.В. Зайковская, С.А. Леонов¹, Ю.Г. Юшков¹, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И ЕСТЕСТВЕННОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА H5N1

Научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)

¹ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Краснообск, Новосибирская область)

В работе представлены описательные данные показателей летальности при экспериментальной и естественной инфекции разных видов домашней птицы. Показатели летальности при естественном инфицировании были определены в период эпизоотии гриппа в Новосибирской области в июле 2005 года на частных подворьях. Для экспериментального инфицирования домашних видов птиц (гусей, уток и кур 2 кроссов) был использован штамм вируса гриппа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1).

Ключевые слова: вирус гриппа, экспериментальная инфекция, естественная инфекция, летальность

MORTALITY IN EXPERIMENTAL AND NATURAL INFECTION CAUSED BY HIGHLY PATHOGENIC INFLUENZA VIRUS H5N1

A.V. Zaykovskaya, S.A. Leonov¹, Yu.G. Yushkov¹, Yu.N. Rassadkin, A.M. Shestopalov

Scientific Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo

¹ Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SB RAAS, Krasnoobsk

In this paper the data for mortality from experimental infections and natural contamination in different species of poultry is presented. Mortality of natural contamination was identified during the epizootic of influenza in the Novosibirsk area in July 2005. We infected domestic geese, ducks and two breeds of chickens with highly pathogenic influenza virus A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1) for the experiments constructed.

Key words: influenza A virus, experimental infection, natural contamination, mortality

В 2005 году в Новосибирской области, был зафиксирован падеж домашней птицы, который был вызван вирусом H5N1-субтипа. В кратчайшее время вирусы распространились по территории Западной Сибири, а в последствие — Центральных регионов и Юго-запада России. В результате эпизоотии гриппа погибло и было уничтожено более 1 млн. голов домашней птицы [3].

К вирусу птичьего гриппа чувствительны все виды птиц, млекопитающие, в том числе и люди. Из домашней птицы к вирусу птичьего гриппа наиболее восприимчивы куры и индейки, в меньшей степени, фазаны, перепелки, утки, гуси, цесарки, павлины и страусы. Больные птицы выделяют вирус с пометом, при поражении органов дыхания — со слизистыми выделениями из дыхательных путей. Инфицирование птиц происходит при непосредственном контакте с источником инфекции, а также через контаминированные слюной, назальным секретом и фекалиями последнего объекты внешней среды (чаще всего корм и воду) [2, 7].

В период первой эпизоотии гриппа в 2005 году в Новосибирской области было выделено более 10 штаммов высокопатогенного вируса птичьего гриппа. В результате вирусологических исследований было установлено, что все эти штаммы являются высокопатогенными для домашних птиц и мышей, вызывают тяжелую болезнь у хорей [5]. При этом существенных различий биологических свойств всех этих штаммов вирусов не выявлено. Таким образом, для воспроизведения экспериментальной инфекции у разных видов домашней птицы нами

был выбран один из типичных представителей вирусов высокопатогенного птичьего гриппа 2005 года штамм A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1).

Целью исследований явилось описание показателей летальности при экспериментальной и естественной инфекции разных видов домашней птицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период проявления первых вспышек эпизоотии гриппа в Новосибирской области в июле 2005 года на частных подворьях в Доволенском районе при подворных обходах было проведено эпизоотологическое обследование, в ходе которого на частных подворьях регистрировали количество павших, больных и здоровых птиц по видам. В анализ были включены данные по заболеваемости птиц старше 18 — 20-месячного возраста, заболеваемость молодняка текущего года не учитывалась. Вся птица в частных подворьях населенных пунктов Новосибирской области в изучаемый период от гриппа птиц не была вакцинирована.

Птицы на обследованных подворьях содержались в общих помещениях и дворах, получали воду и корм из общих поилок и кормушек. Все птицы на подворьях пользовались свободным выгулом, водоплавающие в течение дня находились на прилегающем к населенному пункту озере.

Было проведено экспериментальное инфицирование птиц 6-ти недельного возраста: цыплят кроссов Леггорн белый, Род-Айленд

Иза коричневый (ГППЗ Новосибирский), гусей краснозерской породы и уток пекинской породы (ЗАО Краснозерское) штаммом вируса гриппа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1) в виде аллантоисной жидкости (5-й пассаж на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ)) с титром вируса $9,2 \text{lg ЭИД}_{50}/\text{мл}$, с концентрацией 10^9 вирусных частиц/мл. Физический титр определялся методом негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой.

Инфицирование птиц проводили десятикратными разведениями вируса на фосфатно-солевом буфере (Рн 7,2) путем равномерного нанесения инфицирующей жидкости на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости в объеме 1 см^3 . Уток инфицировали с 3-го по 7-е, гусей — со 2-го по 6-е, кур с 3-го по 9-е разведениями вируса. Каждая из экспериментальных групп была сформирована из 5 особей. В течение 2 недель после инфицирования у каждой птицы ежедневно брали мазки из клоаки и глотки, учитывали количество погибших птиц. Специфичность гибели птиц устанавливали на основании подтверждения наличия вируса гриппа в тканях внутренних органов (головного мозга, легких, печени, селезенки, почках).

Определение наличия вируса в мазках из клоаки и глотки, а также в ткани органов проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени и путем инфицирования РКЭ. Для выделения РНК использовали набор для выделения РНК «SV Total RNA Isolation system» (Promega, США), для ПЦР в реальном времени — набор «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» согласно инструкции производителей. Для инфицирования использовали РКЭ 9-ти дневного возраста с последующим подтверждением наличия вируса в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1 % суспензии эритроцитов петуха [8].

Значения 50% инфекционной дозы (ИД_{50}) и 50% летальной дозы (ЛД_{50}) вычисляли по методу Рид-Менча. При этом птицу считали инфицированной хотя бы при однократном обнаружении вируса в течение срока наблюдения в мазках из глотки или клоаки [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При эпизоотологическом обследовании было выявлено, что первыми на обследованных подворьях заболели и погибли гуси. Первые очаги гриппа птиц были зарегистрированы в населен-

ных пунктах, расположенных вблизи водоема с большой плотностью населения как дикой, так и домашней птицей. Домашние гуси и утки после контакта с инфицированными дикими птицами, занесли вирус в подворья, где послужили источником инфекции для других видов домашней птицы (кур и индеек).

Учитывая преимущественно фекально-оральный механизм заражения птиц и их скученное, совместное содержание, можно предположить почти одновременное их естественное инфицирование. Большинство случаев падежа домашних птиц в очаге отмечено в течение 10 дней после регистрации первых случаев гибели птиц. К моменту эпизоотологического обследования массовая гибель птиц почти прекратилась, среди выживших птиц клинические признаки отмечены у единичных особей.

Наиболее чувствительными к вирусу гриппа птиц являются домашние птицы, относящиеся к отряду куриных. Самые высокие показатели процента летальности при естественном инфицировании были определены для кур, для индеек — на 25,6 % ниже, чем для кур. Смертность для разных видов водоплавающей птицы (гусей и уток) находится практически на одинаковом уровне и составляет около 30 % (табл. 1).

При экспериментальном инфицировании были определены ЛД_{50} для гусей, уток и двух пород кур (табл. 2). Было показано, что при инфицировании путем равномерного нанесения на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости вирус является наиболее патогенным для кур породы леггорн. Птица кроссов Род-Айленд Иза коричневый является более устойчивой к вирусу гриппа птиц, ЛД_{50} для нее на 12,2 % меньше, чем для леггорнов. Летальная доза для гусей была значительно ниже, чем для уток.

Данные выражены в ИД_{50} , ЛД_{50} .

Специфическая гибель кур наблюдалась с 3 по 7, уток — с 5 по 14, гусей — с 6 по 12 сутки. При этом большинство случаев гибели гусей и уток было отмечено с 5 по 10 сутки. Следует отметить, что при использованном методе инфицирования значения ИД_{50} значительно превышают значения ЛД_{50} для всех видов птиц.

В таблице 3 представлены данные, которые демонстрируют зависимость процента летальности от инфицирующей дозы вируса при использованном методе инфицирования. 100 % летальность для кур получена при инфицировании их дозой 10^5 вирусных частиц, для уток и гусей эта доза не определена.

Таблица 1

Летальность разных видов домашних птиц при естественном заражении вирусом гриппа

Вид птицы	Количество уценных птиц (голов)	Из них пало за 10 дней от начала эпизоотии (голов)	Падёж (%)
Куры	168	125	74,4
Гуси	92	28	30,4
Утки	106	34	31,1
Индейки	43	21	48,8

Таблица 2.

Средние эффективные дозы при экспериментальной инфекции штаммом вируса гриппа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 домашних птиц разных видов

№ п/п	Вид птицы	ИД ₅₀ /мл	ЛД ₅₀ /мл
1.	Гуси краснозерской породы	> 6,5	3,1
2.	Утки пекинской породы	> 7,5	> 5,4
3.	Куры кросса Род-Айленд Иза коричневый	7,6	6,5
4.	Куры кросса Леггорн белый	не определено	7,4

Таблица 3

Показатели летальности у разных видов домашних птиц в зависимости от инфицирующей дозы вируса гриппа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05

Разведение вируса (номер разведения)	Расчетная доза вируса (вирусных частиц/мл)	Вид птицы		
		гуси краснозерской породы (%)	утки пекинской породы (%)	куры кросса Род-Айленд Иза коричневый (%)
2	10 ⁸	90	–	–
3	10 ⁷	80	80	100
4	10 ⁶	40	75	100
5	10 ⁵	0	80	100
6	10 ⁴	0	60	80
7	10 ³	–	40	20
8	10 ²	–	–	0
9	10 ¹	–	–	0

Примечания: «–» – нет данных.

Минимальная инфицирующая доза для кур и уток составила 10³, для гусей – 10⁶ вирусных частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в изучении патогенеза гриппозной инфекции большое внимание уделяется моделированию путей инфицирования вирусом гриппа восприимчивых животных. Одним из основных параметров оценки патогенного влияния вируса на живой организм служит показатель летальности. В представленной работе приведены описательные данные летальности в популяции домашних видов птиц в период проявления первых вспышек эпизоотии гриппа в Новосибирской области. Следует отметить, что эпизоотия гриппа птиц в 2005 году была первой после длительного благополучия, в населенных пунктах вакцинации против гриппа не проводили, что полностью исключает возможность наличия у птиц иммунитета. Популяции птиц в населенных пунктах гетерогенные, то, что при анализе были учтены только данные по летальности птиц старше 18 – 20 месячного возраста, позволило сделать выборку более однородной.

Для воспроизведения естественной инфекции в лабораторных условиях было проведено экспериментальное инфицирование путем нанесения инфицирующей жидкости на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости. Такой путь инфицирования является наиболее приближенным к естественному, особенно для водоплава-

ющих видов птиц. Результаты эксперимента указывают на то, что инфицирование не водоплавающих видов птиц в естественных условиях значительно отличается от такового для водоплавающих видов. Ранее в эксперименте было показано, что наименьшее значение показателя ЛД₅₀ для птиц наблюдается при внутривенном способе инфицирования, наиболее близкое к этому значение было получено при аэрозольном пути инфицирования [4, 6]. При моделировании естественных путей инфицирования гриппозной инфекции необходимо учитывать поведенческие особенности модельного вида.

При сравнительной оценке результатов процента летальности при экспериментальной и естественной инфекции следует учитывать то, что при естественном пути инфицирования создать выборку, полностью однородную по породным и половозрастным качествам, невозможно, а также сложно оценить инфицирующую дозу, разнообразие путей и кратность проникновения вируса в организм восприимчивой птицы. Однако полученные данные указывают на то, что не водоплавающие виды птиц в естественных условиях инфицируются меньшими дозами вируса, чем водоплавающие.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962. — С. 85—92.
2. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.] // М.:ВНИТИБП, 1998. — 928 с.
3. Грипп птиц в Сибири. — Новосибирск: ЦЭРИС. — 2006. — 192 с.
4. Изучение инфекционного потенциала вируса гриппа птиц (субтипа H5N1) при респираторном инфицировании кур / А.Н. Сергеев [и др.] // Сборник статей. — Новосибирск, 2007. — С. 464—468.
5. Молекулярно-биологические и антигенные особенности штаммов высокопатогенного вируса

гриппа H5N1-субтипа, выделенных на юге Сибири в 2005—2009 гг. / К.А. Шаршов [и др.] // Журн. микробиол. — 2011. — № 5. — С. 40—43.

6. Сравнение инфекционности аэрозоля различных штаммов вируса гриппа птиц А (H5N1) для мышей и цыплят / О.В. Пьянков [и др.] // Тез. докл. 5-й междунар. конф. — Пущино, 2008. — С. 98—102.

7. Influenza. In: Diseases of poultry / B.C. Easterday [et al.] // Iowa State University Press, Ames. — 1997. — P. 583—605.

8. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance // WHO. — 2002. — 105 p.

Сведения об авторах

Зайковская Анна Владимировна — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru)

Леонов Сергей Владимирович — научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630501, Новосибирская область, п. Краснообск, а/я 8 ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии; тел./факс: (383)348-39-31; e-mail: 348-39-31@mail.ru)

Юшков Юрий Георгиевич — заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630501, Новосибирская область, п. Краснообск, а/я 8 ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии; тел./факс: (383)348-39-31; e-mail: 348-39-31@mail.ru)

Шестопалов Александр Михайлович — к.б.н., заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: shestopalov2@ngs.ru)