

А.А.Сергеев, О.В.Пьянков, О.К.Демина, О.Г.Пьянкова, Е.И.Рябчикова, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1 В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА МЫШАХ

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Исследованные штаммы вируса гриппа птиц А/Н5N1 (ВГП), выделенные на территории России и стран СНГ, по вирулентности для мышей при интраназальном и аэрозольном заражении могут быть разделены на 3 группы: высоковирулентные [50 % аэрогенная летальная доза (АЛД₅₀) – <3,0 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз (ЭИД₅₀)] – А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Chicken/Crimea/04/2005, А/Chicken/Omsk/06, А/Chicken/Krasnodar/02/06, А/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности [ЛД₅₀ (АЛД₅₀) – 3,0–4,5 lg ЭИД₅₀] – А/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные [ЛД₅₀ (АЛД₅₀) – >4,5 lg ЭИД₅₀] – А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Отмечена высокая степень корреляции ($r = 0,89$) между показателями вирулентности штаммов, полученными при интраназальном и аэрозольном инфицировании мышей. Первичными клетками-мишенями у мышей, респираторно инфицированных ВГП, являются реснитчатые клетки воздухоносных путей и пневмоциты I и 2-го порядка.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц А/Н5N1, мышь, интраназальное заражение, аэрозольное инфицирование, 50 % летальная доза, респираторный тракт, клетка-мишень вируса.

A.A.Sergeev, O.V.P'yankov, O.K.Demina, O.G.P'yankova, E.I.Ryabchikova, A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Infectious Properties of Avian Influenza A/H5N1 Virus Strains Studied by means of Experiments on Mice

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

The studied strains of avian influenza virus A/H5N1 (AIV), isolated in the territory of the Russian Federation and CIS countries, can be classified into three groups according to their virulence for mice after intranasal and aerosol challenging: highly virulent strains [50 % aerosol lethal dose (ALD₅₀) – <3,0 lg 50 % embryonic infection doses (EID₅₀)] – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; strains with mid-level virulence [LD₅₀ (ALD₅₀) – 3,0–4,5 lg EID₅₀] – A/Duck/Kurgan/08/2005; and non-virulent strains [LD₅₀ (ALD₅₀) – >4,5 lg EID₅₀] – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 and A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Registered is the high degree of correlation ($r = 0,89$) between the indexes of virulence of the strains, obtained by means of intranasal and aerosol challenging of mice. The primary target-cells in mice, respiratory-infected by AIV, are the respiratory tract ciliated cells and pneumonocytes of I, II types.

Key words: Avian Influenza Virus A/H5N1, mouse, intranasal challenging, aerosol challenging, 50 % lethal dose, respiratory tract, target-cell for virus.

К июню 2011 г. общее количество подтвержденных случаев заболевания человека, вызванного вирусом гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1, составляло 556, при этом примерно 60 % заболевших погибли [13]. По данным Всемирной организации охраны здоровья животных, птичий грипп Н5N1 стал эндемическим в некоторых странах, например, Китай, Индонезия, Вьетнам и Египет [13].

Для разработки новых высокоэффективных противогриппозных лечебно-профилактических препаратов и диагностических тест-систем необходимо иметь информацию о степени чувствительности к различным штаммам ВГП А/Н5N1 мышей, которые широко используются в качестве модельных животных при разработке препаратов и тест-систем [4, 8, 9].

В связи с этим целью работы являлось изучение на мышах инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории России и стран СНГ.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали восемь высокопатогенных штаммов ВГП подтипа Н5N1, выделенных в России и странах СНГ, которые были получены из Государственной коллекции возбудителей

вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; А/Chicken/Kurgan/05/2005(Н5N1); А/Duck/Kurgan/08/2005(Н5N1); А/Chicken/Crimea/04/2005(Н5N1); А/Chicken/Omsk/06(Н5N1); А/Chicken/Krasnodar/02/06(Н5N1); А/Chicken/Dagestan/06(Н5N1). 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 минус 70 °С.

Животные. В исследованиях использовали интактных беспородных разнополых белых мышей ICR массой 14–16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животных 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 [3]. Наблюдение за инфицированными мышами осуществляли в течение 16 сут с момента заражения.

Методы инфицирования мышей. Интраназальное заражение мышей проводили традиционным методом с применением седативных средств с после-

дующим определением 50 % летальной дозы (ЛД₅₀) вируса для этих животных [1].

Эксперименты по аэрозольному инфицированию мышей проводили аналогично методике, описанной ранее [5]. Минутный объем дыхания мышей, зависящий от их веса, рассчитывали по формуле Гайтона [7]. Зная концентрацию вирусного аэрозоля в камере (по результатам титрования вируса в пробах из аэрозольных пробоотборников), минутный объем дыхания животных и время инфицирования (экспозиции), определяли для мышей дозы заражения ВГП. С учетом результатов наблюдения за гибелью животных получали зависимость доза-эффект (по гибели мышей) и определяли 50 % летальную дозу при аэрозольном способе заражения (АЛД₅₀) мышей для различных штаммов ВГП.

Специфичность гибели животных. Факт гибели мышей вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия вируса гриппа в гомогенатах их легких.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах тканей животных и аэрозольных пробах проводили традиционным методом путем введения вирусосодержащей жидкости в аллантоисную полость 9-суточных КЭ кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд с последующей регистрацией наличия вируса в реакции гемагглютинации [2].

Электронно-микроскопические исследования. Образцы легких отбирали через 5 сут после интраназального заражения одним из штаммов ВГП (A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; A/Chicken/Kurgan/05/2005; A/Duck/Kurgan/08/2005) в дозе 10 ЛД₅₀. При этом по 3 животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. После вскрытия животных иссекали трахею и легкие, фиксировали 4 % параформальдегидом при 4 °С в течение 48 ч. Обработку образцов проводили, как описано ранее [4]. Срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия) и исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку проводили с помощью цифровых камер Jeol и Veleta (SIS, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1]. При этом

определение 50 % доз вируса проводили при использовании метода Спирмена – Кербера.

Результаты и обсуждение

Важными параметрами, используемыми при разработке новых лечебно-профилактических препаратов и тест-систем, являются параметры, характеризующие чувствительность хозяев к вирусу. В связи с этим были проведены сравнительные исследования чувствительности мышей к различным штаммам ВГП при интраназальном и аэрозольном заражении, результаты которых представлены в таблице. Через 5–10 сут после заражения у животных регистрировали ряд клинических признаков заболевания (взъерошенность, сниженная двигательная активность, конъюнктивит) и летальный эффект. Проведенный корреляционный анализ взаимосвязи между показателями ЛД₅₀ и АЛД₅₀, полученными при разных способах заражения животных, свидетельствует о высокой степени корреляции между этими данными (коэффициент корреляции – $r = 0,89$). Кроме того, наблюдали существенные различия по вирулентности штаммов ВГП для респираторно зараженных мышей. По данному показателю исследуемые штаммы были разделены на 3 группы: высоковирулентные (ЛД₅₀ и АЛД₅₀ – $<3,0 \lg \text{ ЭИД}_{50}$) – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности (ЛД₅₀ и АЛД₅₀ – $3,0\text{--}4,5 \lg \text{ ЭИД}_{50}$) – A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные (ЛД₅₀ и АЛД₅₀ – $>4,5 \lg \text{ ЭИД}_{50}$) – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005.

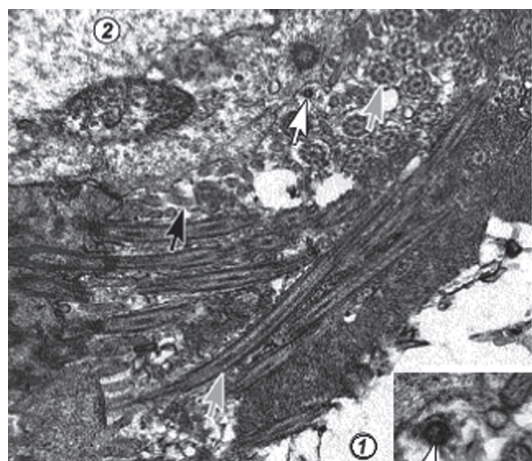
В наших предварительных исследованиях по изучению динамики накопления ВГП в организме респираторно зараженных мышей был зарегистрирован первичный очаг размножения патогена в дыхательном тракте (слизистая полости носа, легкие). При этом максимальное накопление вируса наблюдалось в легких через 5 сут после инфицирования этих животных – $(5,6 \pm 0,6) \lg \text{ ЭИД}_{50}/\text{г}$. Учитывая это обстоятельство, электронно-микроскопическому изучению в этот период подвергали легкие мышей, интраназально инфицированных одним из штаммов ВГП (A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в дозе 10 ЛД₅₀. При этом была выявлена репродукция ВГ в реснитчатых клетках бронхиального эпителия (рисунок). Ядра зараженных клеток имели характерную для репродукции вируса гриппа морфологию [4]. Почкование вируса происходило на апикальной мембране клеток, вирионы локализовались между ресничками и микроворсинками. Кроме этого, репродукция ВГ была зарегистрирована в альвеолоцитах 1 и 2-го порядка.

Известно, что различные штаммы ВГП А/Н5N1, выделенные как от птиц, так и от людей, при экспериментальном инфицировании мышей без предварительной адаптации вызывают либо заболевание, либо инфекционный процесс, носящий бессимптомный характер [6, 8, 10]. Нами также было отмечено, что чувствительность мышей (показатели ЛД₅₀ и АЛД₅₀) к ис-

Вирулентность штаммов вируса гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1 для мышей при интраназальном и аэрозольном заражении с определением ЛД₅₀ и АЛД₅₀ соответственно

Штамм ВГП (H5N1)	Показатели вирулентности ВГП для мышей:	
	ЛД ₅₀ ($\lg \text{ ЭИД}_{50}$) M \pm I ₉₅ *	АЛД ₅₀ ($\lg \text{ ЭИД}_{50}$) M \pm I ₉₅ *
A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005	>6,5	>5,0
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005	>6,5	4,9 \pm 0,5
A/Duck/Kurgan/08/2005(H5N1)	4,2 \pm 0,4	3,8 \pm 0,6
A/Chicken/Kurgan/05/2005(H5N1)	1,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,0
A/Chicken/Crimea/04/2005(H5N1)	1,3 \pm 0,3	-0,7 \pm 0,0
A/Chicken/Omsk/06(H5N1)	2,2 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2
A/Chicken/Krasnodar/02/06(H5N1)	1,7 \pm 0,3	1,3 \pm 0,9
A/Chicken/Dagestan/06(H5N1)	2,7 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7

*Средняя величина (M) и доверительный интервал (I₉₅) с уровнем надежности 95 %.



Зараженная вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) реснитчатая клетка эпителия бронха мыши через 1 сут после инфицирования:
1 – просвет бронха; 2 – цитоплазма реснитчатой клетки; 3 – базальные тельца ресничек. Белыми стрелками показаны вирусные частицы, черными – микроворсинки, серыми – реснички

пользованным в работе штаммам ВГП А/Н5N1 при респираторном заражении также существенно различалась. В то же время все штаммы проявляли одинаково высокую вирулентность для кур при внутривенном введении (внутривенный индекс патогенности, IVPI – от 2,7 до 3,0) и интраназальном заражении (ЛД₅₀ – от 0,3 до 1,2 lg ЭИД₅₀). Полученные нами результаты могут быть использованы для анализа взаимосвязи генетической структуры ВГП и его патогенных свойств. Зарегистрированный коэффициент высокой степени корреляции между показателями вирулентности штаммов, полученными при интраназальном и аэрозольном инфицировании мышей, и близкие их значения свидетельствуют, вероятно, о существенном сходстве механизмов течения инфекционного процесса у этих животных при данных способах заражения, несмотря на то, что эти способы инфицирования отличаются по месту преимущественной первичной локализации в респираторном тракте мышей вводимого вирусного материала [при интраназальном заражении – в основном слизистая носовой полости, а при аэрозольном (для используемого нами полидисперсного аэрозоля с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц 1 мкм) – в равной степени легкие и верхние отделы респираторного тракта]. Отчетливый тропизм вируса гриппа H5N1 к легким отмечается во многих опубликованных работах, посвященных этому патогену [9, 12, 13]. Проведенное нами электронно-микроскопическое изучение легких мышей, инфицированных штаммами ВГП, выделенными в России и странах СНГ, позволило выявить размножение вируса в реснитчатых клетках респираторного тракта мышей (так же, как и у человека) [11, 14]. Анализируя всю вышеприведенную информацию, высоковирулентные для мышей штаммы ВГП могут быть использованы в экспериментах на мышах для оценки эффективности разрабатываемых противогриппозных лечебно-профилактических препаратов и работоспособности создаваемых тест-систем.

Таким образом, все исследованные штаммы ВГП по вирулентности для мышей при интраназальном

и аэрозольном заражении могут быть разделены на 3 группы: высоковирулентные (ЛД₅₀ и АД₅₀ – <3,0 lg ЭИД₅₀) – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности (ЛД₅₀ и АД₅₀ – 3,0–4,5 lg ЭИД₅₀) – A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные (ЛД₅₀ и АД₅₀ – >4,5 lg ЭИД₅₀) – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Выявленными первичными клетками-мишенями у мышей, респираторно инфицированных ВГП, являются реснитчатые клетки воздухоносных путей, пневмоциты 1 и 2-го порядка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 598 с.
2. Мейхи Б., редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988. 344 с.
3. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
4. Онищенко Г.Г., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. Вирус гриппа H5N1: атлас репродукции и патологических изменений внутренних органов мышей. Новосибирск: «Арта»; 2008. 208 с.
5. Сергеев А.Н., Жуков В.А., Порываев В.Д. и др. Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа. Вopr. вирусол. 2002; 4:44–6.
6. Gao P, Watanabe S, Ito T et al. Biological Heterogeneity, Including Systemic Replication in Mice, of H5N1 Influenza A Virus Isolates from Humans in Hong Kong. J. Virol. 1999; 73:3184–9.
7. Guyton A. Measurements of the respiratory volumes of laboratory animals. Am. J. Physiol. 1947; 150:70–7.
8. Ibricevic A., Pekosz A., Walter M.J. et al. Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. J. Virol. 2006; 80:7469–80.
9. Katz J.M., Lu X., Tumpey T.M. et al. Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice. J. Virol. 2000; 74(22):10807–10.
10. Khanna M., Kumar P., Choudhary K. et al. Emerging influenza virus: A global threat. J. Biosci. 2008; 33(4):475–82.
11. Matrosovich M., Matrosovich T., Uhlenhorff J., Garten W., Klenk H-D. Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. Hum. Pathol. 2009; 40:735–9.
12. Perrone L.A., Plowden J.K., Garcí'a-Sastre A. et al. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. PLoS Pathog. 2008; 4(8):e1000115.
13. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 10 Jun 2011 [cited 11 Jun 2011]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_06_10/en/index.html
14. Zhang Z., Zhang J., Huang K., Li K-S., Yuen K-Y., Guan Y., Chen H., Fu W. Systemic infection of avian influenza A virus H5N1 subtype. Hum. Pathol. 2009; 40(5):735–9.

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

1. Zaks L. [Statistic Evaluation]. M.: Statistics; 1976. 598 p.
2. Meykhi B., editor. [Virology. Methods]. M.: Mir; 1988. 344 p.
3. State Research Council. [Guidelines on maintenance and usage of laboratory animals]. Washington: National Academy; 1996.
4. Onishchenko G.G., Ryabchikova E.I., Sergeev A.N., Drozdov I.G. [Influenza Virus H5N1: atlas of reproduction and pathological changes of mice viscera]. Novosibirsk: "Arta"; 2008. 208 p.
5. Sergeev A.N., Zhukov V.A., Poryvaev V.D. et al. [Development of a simple direct estimate method for the detection of the disease in mice and rats, which are aerosol-infected with influenza virus]. Vopr. Virusol. 2002; 4: 44–6.

Authors:

Sergeev A.A., P'yankov O.V., Demina O.K., P'yankova O.G., Ryabchikova E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: aasergeev@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Пьянкова О.Г., Рябчикова Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская область, п. Кольцово. E-mail: aasergeev@vector.nsc.ru

Поступила 16.07.11.