

О.К.Демина, Ар.А.Сергеев, О.В.Пьянков, А.Н.Шиков, Ал.А.Сергеев, С.А.Берилло, Е.И.Сергеева, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ДИССЕМИНАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1 ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ КУР

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

Изучена диссеминация вируса гриппа птиц (ВГП) в организме кур, инфицированных интраназально. Первичный орган накопления А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), в котором вирус регистрируется уже через 18 ч после заражения, накопление патогена также наблюдается во многих органах и сыворотке крови кур и начинается через 30–42 ч после заражения. К моменту гибели животных (54 ч после заражения) концентрация вируса во всех исследованных пробах достигает максимальных значений. Наивысшие показатели накопления ВГП, превышающие 7 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в г/(мл), отмечены в легких, сыворотке крови и почках животных. Показана высокая степень корреляции (коэффициент корреляции $r=0,89$) между результатами оценки концентрации ВГП путем титрования проб от животных с использованием куриных эмбрионов и ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц А/Н5N1, курица, интраназальное заражение, динамика накопления вируса, ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

O.K.Demina, Ar.A.Sergeev, O.V.P'yankov, A.N.Shikov, Al.A.Sergeev, S.A.Berillo, E.I.Sergeeva, A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Dissemination of Influenza A/H5N1 Virus after Intranasal Inoculation of Chickens

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

Studied was dissemination of avian influenza virus (AIV) in the organism of chickens after intranasal challenge with 10–100 LD₅₀. The primary organ of accumulation of AIV A/H5N1 (A/Chicken/Kurgan/05/2005 strain) is the respiratory tract (nasal mucosa), where the virus is registered in 18 hours after challenge. The accumulation of pathogen is observed in many organs and serum of chicken in 30–32 hours after challenge. The animals die in 54 hours, the concentration of virus reaches critical value in all studied samples. The highest AIV loads (7 lg of chicken embryo infective dose – EID₅₀/g or ml) are registered in lungs, blood serum and kidneys of chicken. The results of AIV loads measuring using titration and real time RT-PCR show high degree of correlation ($r=0.89$).

Key words: avian influenza A/H5N1 virus, chicken, intranasal infection, dynamics of virus accumulation, RT-PCR in real time.

В настоящее время существует множество работ, посвященных изучению патогенеза гриппа птиц у различных видов дикой и домашней птицы. Приводятся данные о поражении органов этих животных (сердце, мозг, почки, лимфоидная ткань, в том числе селезенка и тимус, трахея, легкие, надпочечники, поджелудочная железа и миндалина) [9, 11]. Во всех работах, связанных с изучением патогенеза этой инфекции у кур, представлена информация о накоплении патогена, как правило, на одну или несколько временных точек [5, 6, 8, 11]. До сих пор вопрос о последовательности распространения вируса гриппа птиц (ВГП) по органам и тканям инфицированных кур не до конца решен исследователями.

В связи с этим целью работы являлось изучение диссеминации ВГП в организме кур, инфицированных интраназально.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали высокопатогенный штамм ВГП подтипа Н5N1, выделенный во

время эпизоотии среди кур в Курганской области – А/Chicken/Kurgan/05/2005, который был получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Данный штамм на 2-м пассаже (от источника выделения) при культивировании на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) был наработан до концентрации 8,5 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл) и хранился до использования в экспериментах в низкотемпературном холодильнике при –70 °С.

Животные. В исследованиях использовали кур кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-Айленд массой 300 г, полученных из Новосибирской птицефабрики. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4]. Время наблюдения за инфицированной птицей составило 54 ч. Определение наличия вируса в пробах проводили на 9-суточных РКЭ кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-Айленд.

Методы инфицирования кур. Заражение кур проводили интраназально с применением седативных средств, вводя каждому животному по 0,1 мл вирусосодержащего материала в дозе 10–100 ЛД₅₀.

Изучение динамики накопления вируса в организме кур

Подготовка проб материала. Умерщвление животных проводили методом цервикальной дислокации. В экспериментах использовали по 3 животных на временную точку. Фрагменты органов (стенки носовой полости, трахея, легкие, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, почка, клоака, селезенка, головной мозг, поперечно-полосатая мышечная ткань) и сыворотки крови отбирали через 1, 18, 30, 42 и 54 ч после заражения. Для анализа готовили 10 % гомогенаты органов механическим способом на стерильном растворе Хенкса с добавлением антибиотиков.

Метод титрования. Определение концентрации вируса в образцах гомогенатов органов и сыворотке крови птиц проводили путем титрования на РКЭ с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации [3]. Параллельно концентрацию вируса в пробах от кур определяли методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. РНК из проб выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием набора «РИБО-сорб» (производитель – ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводили с наборами реагентов «Реверта-Л» и «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» в соответствии с инструкциями производителя (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»

Роспотребнадзора). ПЦР и детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени производили в аппарате «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия). Для учета накопления продуктов ПЦР в режиме реального времени были использованы стандартные образцы в виде кДНК, полученные из разведений ВЖ с концентрациями вируса 5,5 и 1,5 lg ЭИД₅₀/мл. Контрольные образцы были приготовлены из ВЖ с титром 8,5 lg ЭИД₅₀/мл путем последовательных 10-кратных разведений. Из пробы от каждого разведения выделена РНК, синтезирована кДНК и проведена ПЦР с учетом накопления продуктов реакции в режиме реального времени. Вычисление накопления продуктов ПЦР при проведении реакции с исследуемыми образцами проводили путем обработки результатов в стандартной программе аппарата «Rotor-Gene 6000», используя известные значения концентраций контрольных образцов.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1]. Для установления статистических взаимосвязей был использован корреляционный анализ с установлением простой линейной корреляции (Пирсона) [2].

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проведены исследования, с использованием РКЭ для титрования биологических проб, по изучению динамики распространения ВГП в организме кур, инфицированных 10–100 ЛД₅₀. Результаты исследований представлены в табл. 1. Отмечено, что первичным очагом накопления ВГП в организме кур при интраназальном инфицирова-

Таблица 1

Динамика накопления вируса гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур при интраназальном заражении 10–100 ЛД₅₀

Вид органов и тканей	Концентрация ВГП в органах кур [lg ЭИД ₅₀ /г(мл)] через разные временные промежутки после инфицирования									
	1 ч		18 ч		30 ч		42 ч		54 ч	
	М	Sm	М	Sm	М	Sm	М	Sm	М	Sm
Стенки носовой полости	<0,2	-	0,43	0,27	1,60	0,21	3,15	0,29	5,80	0,17
Легкие	<0,2	-	<0,2	-	1,39	0,28	4,01	0,27	7,76	0,30
Клоака	<0,2	-	<0,2	-	1,05	0,22	2,17	0,27	6,39	0,27
Сыворотка крови	<0,2	-	<0,2	-	0,70	0,17	1,50	0,24	7,20	0,21
Почка	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	4,33	0,27	7,07	0,29
Кишечник (тонкий и толстый)	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,97	0,28	6,07	0,22
Печень	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	3,27	0,22	5,98	0,27
Селезенка	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	4,24	0,21	5,80	0,15
Головной мозг	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	3,67	0,21	5,66	0,27
Желудок	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	2,54	0,28	5,47	0,22
Поперечно-полосатая мышечная ткань	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,85	-	4,69	0,17
Трахея	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,47	0,27	3,66	0,17
Пищевод	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	2,00	0,30	3,57	0,27
Поджелудочная железа	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	0,62	0,21

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; «-» – величина не определена.

нии является слизистая носовой полости, где вирус появляется через 18 ч после заражения и достигает максимальной концентрации к 54 ч (5,80 lg ЭИД₅₀/г). Позднее (через 30 ч) патоген регистрировали в легких, клоаке и сыворотке крови, к 54 ч после заражения отмечались высокие концентрации. Причем в легких в данный период наблюдается самое высокое накопление вируса (7,76 lg ЭИД₅₀/г) по сравнению с таковым в других органах и сыворотке крови кур. Затем (через 42 ч) ВГП обнаруживается практически во всех изучаемых органах. При этом обращает на себя внимание тот факт, что самых высоких концентраций вирус достигает в почках, кишечнике, печени, селезенке и головном мозге также к 54 ч после заражения.

В дальнейшем нами проведены исследования, связанные с изучением возможности использования метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки накопления вируса гриппа птиц (ВГП) субтипа H5N1 во внутренних органах инфицированных птиц. После проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени и оценки концентрации вируса в органах методом титрования на РКЭ были получены данные, представленные в табл. 2. Данные корреляционного анализа указывают на наличие высокой положительной корреляционной связи между результатами, полученными методом ПЦР и инфицирования РКЭ ($r=0,89$), что говорит о возможности использования ПЦР для изучения накопления ВГП в органах животных и птиц.

Результаты исследования по выявлению у инфицированных кур первичного очага инфекции (слизистая носа) для ВГП (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) подтвердили ранее полученные нами данные аналогичного эксперимента с использованием другого штамма ВГП: A/Chicken/Suzdalka/

Nov-11/2005. Появление вируса одновременно через 30 ч после заражения в крови, легких и клоаке свидетельствует о том, что его проникновение в эти органы происходит, скорее всего, гематогенным путем из слизистой носа, возможно, через эндотелий кровеносных сосудов обонятельной области. Более поздняя регистрация вируса в трахее, чем в легких, подтверждает это предположение, но не исключает вероятности существования нисходящего способа распространения патогена из носовой полости по дыхательному тракту кур.

К моменту гибели кур (через 54 ч после заражения) в некоторых органах их пищеварительной системы (тонком и толстом кишечнике, печени, желудке) вирус накапливается до высоких концентраций (5,0–6,1 lg ЭИД₅₀/г). Вероятно, эти органы инфицированных кур являются одним из источников поступления вируса в каловые массы. Более высокий уровень накопления вируса в этот период отмечен в клоаке, которая, несомненно, добавляет в ее содержимое существенную порцию патогена. Еще более высокие концентрации патогена регистрируются в почках (7,1 lg ЭИД₅₀/г) по сравнению с таковыми в пищеводе, желудке, тонком и толстом кишечнике, печени, поджелудочной железе и клоаке, что дает основание считать, что основной вклад в обсеменение патогеном клоакального содержимого инфицированных кур вносит вирус, поступающий в клоаку с мочой.

В последние годы для идентификации вируса гриппа и определения контаминации им объектов внешней среды используются молекулярно-биологические методы, в частности, коммерческие и лабораторные варианты тест-систем, основанные на ОТ-ПЦР [8] и количественной ПЦР с регистрацией сигнала накопления продуктов амплифика-

Таблица 2

Динамика накопления вируса гриппа птиц (ВГП) в органах и сыворотке крови интраназально инфицированных кур, оцененные с помощью методов ПЦР и титрования на РКЭ

Вид органа (время после заражения, ч)	Средняя концентрация ВГП в различных органах интраназально инфицированных кур, оцененная разными методами:	
	титрование на РКЭ, lg ЭИД ₅₀ /мл	ПЦР, lg копий РНК/мл
Стенки носовой полости (42)	3,7	3,8
Стенки носовой полости (54)	6,3	6,2
Легкие (30)	1,2	4,0
Легкие (54)	7,2	6,5
Трахея (54)	4,3	5,2
Сыворотка крови (30)	0,7	0
Сыворотка крови (54)	7,2	7,2
Мозг (42)	3,7	4,8
Мышца (42)	1,8	3,2
Мышца (54)	4,8	5,8
Кишечник (42)	2,2	2,0
Кишечник (54)	6,3	6,0
Селезенка (42)	4,2	3,2
Селезенка (54)	5,9	6,1
Желудок (54)	5,8	6,2

ции в режиме реального времени [7]. Однако эти молекулярно-биологические реакции не позволяют оценить концентрацию жизнеспособного (инфекционного) вируса в отличие от способа определения количества ЭИД₅₀ в исследуемом образце при титровании на РКЭ. Тем не менее, некоторые исследователи применяют метод ПЦР для изучения динамики накопления вируса гриппа птиц в органах животных и птиц [5]. Судя по результатам наших исследований по сравнительному изучению накопления ВГП в различных органах и сыворотке крови инфицированных кур, регистрируемого двумя методами (путем титрования на РКЭ и ОТ-ПЦР в режиме реального времени) с получением высокой степени корреляции между данными, применение этого молекулярно-генетического метода вполне оправдано. Наличие высокой положительной корреляционной зависимости между данными по накоплению ВГП в различных органах и сыворотке крови инфицированных кур, полученными с использованием двух методов – титрования на РКЭ и ОТ-ПЦР в режиме реального времени, свидетельствуют о том, что применение молекулярно-генетического метода вполне оправдано.

Таким образом, первичный орган накопления ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур при интраназальном способе инфицирования дозой вируса 10–100 ЛД₅₀ находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), в котором патоген регистрируется уже через 18 ч после заражения, через 30–42 ч наблюдается во многих органах кур. К моменту гибели животных (54 ч после заражения) концентрация вируса во всех исследованных пробах органов достигает максимальных значений. При этом наивысшие показатели, превышающие 7 lg ЭИД₅₀/г (мл), отмечены в легких, сыворотке крови и почках животных. Показана высокая степень корреляции (коэффициент корреляции $r=0,89$) между результатами оценки концентрации ВГП путем титрования проб от животных с использованием куриных эмбрионов и ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962.
2. *Lakin G.F.* Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. С. 208–215.
3. *Meixu B.*, редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988.
4. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
5. *Antarasena C., Sirimujalin R., Prommuang P., Blacksell S.D., Promkuntod N., Prommuang P.* Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*). *Avian Pathol.* 2006; 35(3):250–3.
6. *Das A., Spackman E., Thomas C., Swayne D.E., Suarez D.L.* Detection of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in meat and tracheal samples from experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 2008.52(1):40–8.
7. *Lee C.W., Suarez D.L.* Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J. Virol. Methods.* 2004; 119(2):151–8.
8. *Pantti-Jackwood M.J., Swayne D.E.* Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis.* 2007; 51(1 Suppl):250–9.
9. *Phipps L.P., Essen S.C., Brown I.H.* Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J. Virol. Methods.* 2004; 122(1):119–22.
10. *Swayne D.E., Beck J.R.* Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. *Avian Dis.* 2005; 49(1):81–5.
11. *Swayne D.E.* Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 2007; 51(1 Suppl.):242–9.

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.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. *Lakin G.F.* [Biometry]. M.: Vysshaya Shkola; 1990. P. 208–15.
3. *Meikhi B.*, editor. [Virology Methods]. M.: Mir; 1988.
4. National Research Council. [Guide for the Maintenance and Use of Laboratory Animals]. Washington: National Academy of Sciences; 1996.

Authors:

Demina O.K., Sergeev Ar.A., P'yankov O.V., Shikov A.N., Sergeev Al.A., Berillo S.A., Sergeeva E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: demina@vector.nsc.ru

Об авторах:

Демина О.К., Сергеев Ар.А., Пьянков О.В., Шиков А.Н., Сергеев Ал.А., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: demina@vector.nsc.ru

Поступила 21.06.11.