

УДК: 619:616.98:578.832.1

Д. В. МУЗИКА, кандидат ветеринарних наук
Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків)

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ H5N2, ІЗОЛЬОВАНОГО ВІД ДИКИХ КАЧОК

Наведено результати досліджень біологічних властивостей вірусу грипу птиці підтипу H5N2, який ізолювано від диких водоплавних птахів. Встановлено належність цього вірусу до низькопатогенних вірусів грипу птиці, здатність вірусу викликати утворення специфічних антитіл при інтравенозному та інтраназальному інфікуванні. Визначено, що вірус не викликає захворювання курчат при інтраназальному та інтравенозному інфікуванні. За результатами проведених досліджень вірус рекомендується до депонування та подальшого використання в якості виробничого штаму для виробництва вакцин і тест-систем.

Ключові слова: вірус грипу, антитіла, інфікування, депонування, птиця.

Важливою складовою системи прогнозування епізоотичної ситуації щодо особливо небезпечних хвороб птиці є дослідження природних резервуарів збудників, ізоляція їх від природних носіїв, а також вивчення їх біологічних і молекулярно-генетичних властивостей. Вірусологічний моніторинг основних природних носіїв збудників інфекційних захворювань птиці дозволяє отримувати нові віруси, що на даний час циркулюють у природних резервуарах. Велике значення для ветеринарної вірусології має не тільки отримання вірусу та його вивчення, а й подальше зберігання в колекції з метою використання у біотехнологічному виробництві чи наукових дослідженнях. Колекціонування нових штамів дозволяє проводити поглиблені дослідження етіології, класичної та молекулярної епізоотології захворювань тварин і птиці, походження вірусів, а також проводити прогнозування подальшої еволюції вірусів. Крім того колекція штамів вірусів є джерелом штамів-кандидатів при розробці нових засобів і методів діагностики, профілактики та лікування інфекцій, а також оновлення вже існуючих виробничих штамів вірусів новими більш актуальними. Це в першу чергу стосується вірусів, що здатні швидко змінюватися, наприклад - віруси грипу.

У відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» існує Колекція вірусів збудників інфекційних захворювань птиці, що ізолювані від сільськогосподарських, свійських та диких птахів, яка постійно поповнюється та підтримується. Перед закладанням на зберігання в колекцію обов'язковими є ретельні дослідження біологічних, у тому числі і молекулярно-генетичних властивостей вірусів.

Метою наших досліджень було вивчення біологічних властивостей низькопатогенного вірусу грипу птиці, який виділено від диких качок та встановити перспективність його подальшого використання в якості виробничого штаму для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів.

Матеріали та методи.

У дослідженнях було використано вірус грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2, який було ізолювано від диких качок. Вірус виділений та іденти-

За результатами обрахунку індекс інтравенозної патогенності становив 0,00, що дозволило нам віднести цей ізолят до низькопатогенних вірусів грипу птиці. Він не викликав захворювання у птиці протягом 10 діб після інтравенозного інфікування.

Після цього нашим завданням було встановити здатність цього вірусу викликати захворювання у курчат при інфікуванні природним шляхом. Для цього курчат 42 добового віку інфікували інтраназально вірусом низькопатогенного грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 в дозі $10^{6,0}$ ЕІД₅₀. Після інфікування за курчатами спостерігали протягом 10 діб. Крім того через 4 доби після інфікування було забито 2 курчат для проведення вірусологічних досліджень. Замість них до групи інфікованої птиці було підсаджено 2 неінфікованих здорових курчати. Протягом періоду спостереження (10 діб) у інфікованих курчат, а також у контактних підсаджених курчат не було виявлено жодних змін у клінічному стані. Усі курчата були активними, приймали корм і воду.

Наявність репродукції вірусу в організмі інфікованих і контактних курчат визначали за результатами вірусологічних досліджень клоакальних, назооральних змивів і проб внутрішніх органів. Результати досліджень представлені в таблицях 2, 3.

Таблиця 2

Результати вірусологічних досліджень клоакальних і назооральних змивів курчат, інтраназально інфікованих вірусом грипу А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2

	Діб після інфікування	Зразки для досліджень	Результати вірусологічних (наявність репродукції вірусу) досліджень
Інфіковані курчата	2	клоакальні змиви	-
		назооральні змиви	-
	4	клоакальні змиви	-
		назооральні змиви	-
	7	клоакальні змиви	-
		назооральні змиви	-
	10	клоакальні змиви	-
		назооральні змиви	-
Неінфіковані контактні курчата	2*	клоакальні змиви	-
		назооральні змиви	-
	4*	клоакальні змиви	-
		клоакальні змиви	-
- діб після підсаджування до інфікованих інтраназально курчат			

Як видно з даних таблиці при проведенні вірусологічних досліджень клоакальних, назооральних змивів і зразків внутрішніх органів живого вірусу не ізолювано. Це свідчить про відсутність виділення цього вірусу в навколишнє середовище. Результати наших досліджень співпадають з дослідженнями закордонних учених. Так, Gloria Ramirez-Nieto та співавтори при інфікуванні курчат 3-тижневого віку низькопатогенним вірусом грипу H5N2, який ізолювано від диких водоплавних птахів, не встановили репродукції вірусу в трахеї та легенях з 2 по 7 добу після інфікування [4]. При інфікуванні курчат низькопатогенним вірусом

H4N8, він також не викликав клінічних ознак у птиці. При вірусологічних дослідженнях не виявлено вірусного антигену у внутрішніх органах [5]. При інфікуванні курчат низькопатогенним вірусом грипу H7N3, який також ізольовано від диких водоплавних птахів, вірус було виявлено тільки у одного з 5 інфікованих курчат в трахеальному змиві через 2 доби після інфікування. Протягом наступних 6 діб вірус не виявлено ні в трахеальних, ні в клоакальних змивах. Крім того він не викликав ніяких клінічних ознак інфекції [6]. Таким чином усі описані вище відомості та результати наших власних досліджень є характерними для так званих «диких вірусів» – збудників, які ізольовано з природного резервуару – диких водоплавних птахів. Зовсім інші характеристики мають низькопатогенні віруси грипу птиці, які ізольовані від свійських птахів. Для них є типовою здатність викликати високу захворюваність та низьку смертність, що супроводжується слабкими або середніми клінічними ознаками [7].

Таблиця 3

Результати вірусологічних досліджень внутрішніх органів курчат, інфікованих вірусом грипу А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2

Діб після інфікування	Зразки для досліджень	Результати вірусологічних (наявність репродукції вірусу) досліджень
4	трахея	-
	легені	-
	селезінка	-
	тонкий кишечник	-
	товстий кишечник	-
10	трахея	-
	легені	-
	селезінка	-
	тонкий кишечник	-
	товстий кишечник	-
6 (Контактні курчата)	трахея	-
	легені	-
	селезінка	-
	тонкий кишечник	-
	товстий кишечник	-

При проведенні подальших досліджень, ознаки репродукції вірусу нами виявлені під час патологоанатомічного розтину та за результатами серологічних досліджень.

Нами проведено патологоанатомічний розтин інфікованої інтраназально та контактної птиці при забої на 4, 6, 10 добу. Будь-яких макроскопічних змін при зовнішньому огляді не виявлено: шкіра, м'язові тканини мали звичайний вигляд, набряків не було. У той же час при розтині інфікованих курчат через 4 доби після інфікування встановлено збільшення селезінки, катальний ентерит у тонкому та товстому кишечнику. Крім того було виявлено невеликі крововиливи на слизовій оболонці дванадцятипалої кишки та в цекальних тонзилах. При розтині контактних курчат, які були підсажені до інфікованої інтраназально птиці жодних макроскопічних змін при розтині не виявлено.

Серологічні дослідження сироваток крові курей через 10 діб після інфікування були спрямовані на виявлення специфічних антитіл до гемаглютиніну H5 та нуклеопроतेїну NP. Дослідження проводили в РЗГА (визначення антитіл до гемаглютиніну H5) та ІФА (визначення антитіл до нуклеопротеїну). Результати серологічних досліджень наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Результати досліджень сироваток крові інфікованих курчат через 10 діб після інфікування низькопатогенним вірусом грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2

№ сироватки	Інтраназальне інфікування		Інтравенозне інфікування	
	Результати РЗГА	Результати ІФА	Результати РЗГА	Результати ІФА
1	.*	-	1:16	-
2	1:2	-	1:8	-
3	-	-	1:8	-
4	1:8	+**	1:16	-
5	1:4	-	1:8	-
6	1:4	-	1:16	+
7	1:16	-	1:2	-
8	-	-	1:8	-
9	-	-	1:4	-
10	-	-	1:16	+

*- АТ не виявлено
 ** - наявність антитіл до нуклеопротеїну вірусу грипу типу А

Нами встановлено, що серед курчат, які були інфіковані інтраназально, тільки у одного курчати (12,5 %), виявлені антитіла до вірусу грипу H5 у РЗГА в діагностичному титрі (1:16). Середній титр антитіл в групі інфікованих інтраназально курчат становив $1,2 \log_2$. Такі ж результати нами отримані і за результатами ІФА. При дослідженні сироваток крові курчат, які були інфіковані інтравенозно, антитіла в діагностичних титрах виявлено у 4 курчат (40 %). Необхідно зазначити, що рівень антитіл був невисоким, середній титр становив $3,0 \log_2$, максимальний титр – 1:16. Що стосується контактних не інфікованих курчат, які були підсажені до інфікованих інтраназально, то у них у сироватці крові антитіл не було виявлено ні в РЗГА, ні в ІФА.

Результати серологічних досліджень про низьку імунну відповідь при зараженні низькопатогенними «дикими вірусами» також підтверджуються і результатами інших вчених, які не виявляли антитіл до вірусу ні в РЗГА, ні в ІФА при інфікуванні вірусами різних підтипів (H5N2, H4N8 та ін.) протягом 14 діб [4, 5].

На сьогоднішній день актуальним для ветеринарної медицини України та інших країн світу є контролювання циркуляції та діагностика високопатогенного грипу птиці, який викликають віруси грипу птиці підтипу H5. У зв'язку зі здатністю вірусів грипу до швидкої мінливості, то здійснення якісної діагностики необхідно постійно оновлювати штами вірусів, які використовуються в якості виробничих. У колекції штамів ННЦ «ІЕКВМ» зберігаються виробничі віруси грипу птиці підтипу H5 - вірус високопатогенного грипу птиці H5N1 А/курка/Сиваш/02/05 та вірус грипу H5N3 А/крячок/Південна Африка/61. Що стосується вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/05 H5N1, то це виробничий вірус високопатогенного грипу птиці, який використовується для виробництва інактивно-

ваних вакцин проти високопатогенного грипу птиці та діагностичної тест-системи для виявлення антитіл до вірусу високопатогенного грипу птиці «АвіФлуТест H5N1». Він є високо активним у серологічних реакціях, імуногенним, але головний його недолік – належність до високопатогенних вірусів, що обумовлює необхідність наявності спеціальних умов для роботи з цим вірусом, а також певні складності у роботі з ним при отриманні вірусної сировини високої якості. Крім того, за рекомендаціями МЕБ, при розробці засобів специфічної профілактики та діагностики бажано надавати перевагу низькопатогенним вірусам. Вірус H5N3 А/крячок/Південна Африка/61 – виробничий вірус і використовується при виробництві тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів H1-N14. Головним недоліком цього вірусу є його антигенні відмінності від сучасних штамів вірусу H5, що циркулюють в теперішній час.

Таким чином, за результатами серії дослідів нами встановлено, що вірус грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 є низькопатогенним вірусом грипу, який не викликає захворювання у чутливої птиці ні при інтравенозному, ні при інтраназальному інфікуванні. Також нами встановлено, що репродукція вірусу в організмі птиці є дуже низькою і підтверджується тим фактом, що протягом періоду спостереження виділення збудника в навколишнє середовище не встановлено. Це було підтверджено і негативними результатами досліджень контактних не інфікованих курчат, які були підсажені до курчат інфікованих інтраназально. Вище наведені результати свідчать про те, що вірус не передається від інфікованої птиці до неінфікованої при контакті. У той же час вірус при інфікуванні птиці викликав імунну відповідь у курчат. Доказом цього є наявність специфічних антитіл у сироватці крові інфікованих курчат.

Отже, аналізуючи вище викладене та враховуючи отримані результати, ми вважаємо штам вірусу грипу А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 перспективним штамом-кандидатом до виробничих штамів. У подальшому він може бути використаний для виробництва діагностичних тест-систем та інактивованих вакцин, у тому числі для специфічної профілактики грипу за DIVA-технологією з диференціацією інфікованої птиці від вакцинованої. Вважаємо за необхідне продовжити вивчення штаму з метою з'ясування його антигенних властивостей.

Висновки:

За результатами вірусологічних досліджень встановлено, що вірус грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 має індекс інтравенозної патогенності 0,00 та відноситься до низькопатогенних вірусів грипу птиці.

При інтравенозному та інтраназальному інфікуванні курчат вірус не викликає клінічних змін щодо фізіологічного стану птиці. Вірус не виділяється у навколишнє середовище. Це підтверджується негативними результатами вірусологічних досліджень клоакальних, назооральних змивів, зразків внутрішніх органів інфікованих і контактних курчат.

У організмі курчат у відповідь на введення живого вірусу відбувається напрацювання специфічних антитіл у невисоких титрах $1,2 - 3,0 \log_2$.

1. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Electronic resource]. – Access mode : <http://www.oie.int>. – The title from the screen.

2. A laboratory manual for the Isolation, identification, and characterization of avian pathogens [Text]. – Fifth edition. – OmnoPress, Madison, 2008. – 250 p.

3. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] : справочник / В. Н. Сбрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. – М. : Агропромиздат, 1991. – 528 с.

4. Adaptation of a Mallard H5N2 Low Pathogenicity Influenza Virus in Chickens with Prior History of Infection with Infectious Bursal Disease Virus [Text] / G. Ramirez-Nieto [et. al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54, № 1. – P. 513–521.

5. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity [Text] / I. Mo [et. al.] // Avian Dis. – 1997. – Vol. 41, № 1. – P. 125–136.

6. Increased pathogenicity and shedding in chickens of a wild bird-origin low pathogenicity avian influenza virus of the H7N3 subtype following multiple in vivo passages in quail and turkey [Text] / F. Cilloni [et. al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54, № 1. – P. 555–557.

7. Avian influenza [Text] / ed. David E. Swayne. – Ames, Iowa : Blackwell Publishing, 2008. – 605 p.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИЗКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦЫ H5N2, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ ДИКИХ УТОК /

Музыка Д. В.

Представлены результаты исследований биологических свойств вируса гриппа подтипа H5N2, который изолирован от диких водоплавающих птиц. По результатам исследований установлена принадлежность этого вируса к низкопатогенным вирусам гриппа, способность его вызывать иммунный ответ при интравенозном и интраназальном заражении. Установлено, что вирус не вызывает заболевания цыплят при интравенозном и интраназальном инфицировании. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать вирус к депонированию в качестве производственного штамма для изготовления вакцин и тест-систем.

Ключевые слова: вирус гриппа, инфицирование, депонация, птица.

STUDYING THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N2 ISOLATED FROM WILD BIRDS/

Denys Muzyka

It was presented the results of studies biological properties of influenza virus subtype H5N2, which has been isolated from wild waterfowl. According to the research it was established that the virus belongs to the low pathogenic influenza viruses, the ability to elicit an immune response at intranasal and intravenous infection. It was established that the virus does not cause disease in chickens infected intravenously and intranasally. By the results of the studies it was recommended to deposited the virus as a productive strain for vaccine production and test systems.

Key word: influenza virus,infected, deposited,avian.

Рецензент – доктор ветеринарных наук А. П. Герілович.