

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ И ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ (ОБЗОР)

Резюме

В Республике Беларусь широко используется протокол диагностики гриппа птиц, включающий методы ОТ-ПЦР, реакции торможения гемагглютинации, заражение 4-8-недельных цыплят для определения патогенности вируса или методов ОТ-ПЦР, специфичных для сайта расщепления HA0 (особенность HPAIV). Все действия в случае вспышки гриппа птиц регулируются правительством. Ветеринарной службой проводятся тщательный мониторинг и научные исследования для ограничения доступа вируса гриппа птиц в Республику Беларусь.

Summary

Only careful laboratory research of an isolated subtype using a number of techniques can differentiate them properly. In the Republic of Belarus, it is commonly used the protocol of AI diagnosis which includes RT-PCR techniques, inhibition of hemagglutination reaction, infection of 4-8-weeks chickens for determination of virus's pathogenicity or RT-PCR techniques specific for HA0 cleavage site (the feature of HPAIVs). All actions in the case of AI outbreak are regulated by the government. Careful monitoring and scientific research are conducted by veterinarians to restrict AI from entering the Republic of Belarus.

Поступила в редакцию 09.04.2018 г.

Республика Беларусь считается свободной от гриппа птиц, однако всегда существует угроза попадания его в популяции диких птиц (особенно перелётных водоплавающих). Изучение биологических особенностей вируса гриппа птиц и совершенствование методов диагностики являются важной и трудоёмкой задачей, стоящей перед учёными.

Целью работы является обобщение информации о возбудителе гриппа птиц, методах и порядке диагностики данной болезни в Республике Беларусь.

Грипп птиц – инфекционная болезнь домашней и дикой птицы, вызываемая высокопатогенным вирусом гриппа А (HPAI) и H5/N7 его подтипами низкопатогенных изолятов (LPAI) [9].

Характеристика возбудителя. Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Данное семейство включает 3 рода: *Influenza virus* А, В и С. Вирус гриппа А, в отличие от гриппа В и С, инфицирует не только человека, но и многие виды млекопитающих и птиц, главным образом водного и околородного комплекса [4, 6, 9].

Ортомиксовирусы плеоморфны, в основном сферические, однако в свежих изолятах принимают нитевидную форму. Размер вириона составляет 80–120 нм. Нуклеокапсид имеет спиральную структуру и состоит из капсомеров разных размеров. Капсид вируса пронизан двумя типами гликопротеиновых молекул – пепломерами. Гомотримерные пепломеры называются гемагглютинидами, а гомотетрамерные – нейраминидазами [6].

Геном вируса представлен шестью семью линейными отрицательно-смысловыми сегментами одноцепочечной РНК общим размером от 10–13,6 kd. Каждый сегмент со стороны 3'– конца имеет одинаковые наборы последовательностей нуклеотидов. С геномом связаны три типа протеинов (PB1, PB2, PA), образующих РНК-полимеразу. Оболочка вируса выстлана матричным протеином (M1) и пронизана небольшим количеством ионных каналов, состоящих из тетрамеров второго матричного протеина (M2) [6].

Вирус неустойчив во внешней среде и разрушается под воздействием температу-

ры 56⁰С в течении 30 минут, кислоты (pH<3) и щёлочи губительно действуют на вирус, а липофильные растворители и детергенты мгновенно его инактивируют [4, 6].

Распространение. Носителями вируса гриппа А являются птицы водно-околоводного ареала обитания: семейство речные утки (*Anatinae*), семейство чайковые (*Laridae*) и крачковые (*Sternidae*), большая поганка или чомга (*Podiceps cristatus*), домашняя утка (*Anas platyrhynchos domesticus*), лебедь-шипун (*Cygnus olor*) и др. Вирус гриппа А обладает высокой антигенной изменчивостью вследствие мутационного (дрейф) и реассортационного (шифт) процессов, что наблюдаются у перелётных птиц во время зимовочно-гнездового периода [4, 6, 9].

Варианты вируса гриппа А, адаптированные к птицам, имеют $\alpha 2'-3'$ -специфичность. Концевые $\alpha 2'-3'$ -сиалозиды содержатся у птиц в основном на поверхности эпителиальных клеток слизистой кишечника, поэтому у птиц грипп протекает в форме энтерита. Передача вируса воздушно-капельным путём возможно в случае сочетания $\alpha 2'-6'$ - и $\alpha 2'-3'$ -специфичностей к сиаловым эпитопам. Такой комбинированной специфичностью обладает пандемический вирус гриппа А (H1N1) pdm09 и, как следствие, способностью распространяться воздушно-капельным путём и вызывать тяжёлые пневмонии у птиц и других животных. Способность вируса гриппа адаптироваться к разным хозяевам зависит от их способности к быстрому изменению их рецепторной специфичности [1, 4, 7].

Межвидовая передача вируса гриппа А является многофакторным процессом и происходит достаточно редко. Примерами преодоления межвидового барьера служат случаи инфицирования людей вирусами гриппа А птиц и свиней субтипов H5N1, H9N2, H7N7, H7N3, H7N2, H1N2, H1N1v, H3N2v в странах Юго-Восточной Азии и некоторых странах Европы и США [1, 4, 5, 7, 10, 11].

В 2016 г. эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц в мире

резко обострилась, в связи с чем существует потенциальная угроза заноса вируса гриппа в популяцию домашних птиц и его распространения на территории Республики Беларусь [2, 3].

Очаги высокопатогенного гриппа птиц в 2016 г. были зарегистрированы в 47 странах мира, в том числе в 19 странах Европы: в Венгрии – 215 очагов, Германии – 98, Швейцарии – 8, Франции – 73, Нидерландах – 49, Дании – 36, Польше – 20, Швеции – 12, Болгарии – 9, Финляндии – 8, Австрии – 5, Румынии – 5, Сербии – 4, Украине – 4, Великобритании – 2, Италии – 2, Хорватии – 2 очага, Словакии, Черногории, России – по одному очагу [8, 9, 10, 11].

В ноябре 2016 г в мире были зарегистрированы случаи высокопатогенного гриппа среди домашних и диких птиц, обусловленные следующими подтипами: H5N1, H5N2, H5N6, H5N8, H5N9, H7N8, H7N3, H7N7, H7N1 [8, 9].

Патогенез. Инкубационный период составляет 21 день. Вирус гриппа проявляет тропизм к эпителиальной ткани желудочно-кишечного и респираторного тракта. Реплицируясь в слизистой оболочке, он вызывает дегенерацию и отторжение клеток с формированием очагов воспаления и некроза. Патологические изменения развиваются быстро, и вскоре после репродукции вируса у ворот инфекции наступает виремия, которая может продолжаться до 14 суток. Токсическое действие в результате репродукции вируса оказывается на сердечно-сосудистую и нервную системы. Накопление свободных радикалов в организме приводит к деструкции эндотелия кровеносных сосудов, что выражается в геморрагическом диатезе, очаговых некрозах и разлитыми воспалительными процессами во многих органах и тканях [4].

Клиническая картина. Заболевание может протекать сверхостро (внезапная смерть), остро (с наличием различных клинических признаков, включающих катаральные истечения из глаз и носа, кашель, чихание, нарушение дыхания, опухание синусов головы, апатию, снижение вокализа-

ции (изменение голоса), отказ от корма и воды, цианоз гребня и серёжек, нарушение координации, нервные явления, диарею) и подостро (снижение яйценоскости, привесов, прогрессирующее истощение, смерть). Однако данные признаки не являются патогномоничными. В некоторых случаях низкопатогенные штаммы способны вызвать клинические признаки, приближающиеся по интенсивности к таковым при инфекции высокопатогенными штаммами [9].

У диких и домашних птиц при внешнем осмотре отмечается период вялости (до 12 ч), затем животное садится на брюхо, поджимает лапы. Могут отмечаться временные беспокойства, затруднённые движения и опрокидывания на бок, температура тела поднимается до 43⁰С. Отмечается характерное запрокидывание головы и искривление шеи, помутнение роговицы глаз, двусторонний конъюнктивит, может отмечаться дерматит с выпадением перьев. Птица, находящаяся на воде, кружит, запрокидывает голову на спину, отмечается скованность движений конечностей [4, 5].

Патологоанатомические изменения.

При инфицировании высокопатогенным штаммом вируса гриппа производные кожи (гребни и сережки) гиперемированы и отёчны. Отмечается опухание синусов головы и параорбитальной клетчатки глаз. Катаральный конъюнктивит и катаральные или катарально-геморрагические истечения из носа и клюва. На аптериях (кожа, лишённая перьев) отмечаются кровоизлияния [6].

При вскрытии отмечается геморрагический диатез: петехии и экхимозы на серозных оболочках органов грудобрюшной полости, на слизистых оболочках пищеварительного тракта, в мышцах. Чаще всего наблюдаются геморрагии на слизистой оболочке железистого желудка и слепок кишечника, миндалинах, гипертрофия почек с очаговыми некрозами, мочекишный диатез (отложения кристаллов мочевой кислоты в мочеточниках). Поджелудочная железа является основным местом репликации вируса, вследствие чего наблюдается панкреатит с очаговым или диффузным некрозом

паренхимы и интерстициальный отёк органа. В результате таких изменений развивается фибринозный плевроперитонит. Лёгкие гипертрофированы, отёчны, в некоторых случаях отмечается двусторонняя катарально-геморрагическая пневмония, а в слизистой оболочке трахеи, ближе к месту бифуркации, заметны кровоизлияния. На фолликулах яичника видны геморрагии и очаги фибринозного воспаления [6].

Инфицирование низкопатогенными штаммами вируса гриппа носит подострый характер, вследствие чего патологоанатомические признаки проявляются стёрто и будут определяться активизацией вторичной микрофлоры [6].

Лабораторная диагностика. Серологическими методами исследований было выявлено 16 подтипов гриппа птиц, отличающихся по гемагглютинирующей способности (H1-16) и 9 подтипов, отличающихся по нейраминидазной активности (N1-9). Однако далеко не все подтипы вируса являются патогенными для птиц. В настоящее время все патогенные штаммы гриппа птиц относились к подтипам H5 и H7, однако среди этих подтипов были выявлены низкопатогенные изоляты. С помощью молекулярных исследований было установлено, что у высокопатогенных изолятов имеется HA0 cleavagesite (участок гена, кодирующий основные аминокислоты на участке деления предшественников гемагглютинирующей способности) [6, 9]. Изоляты H5 и H7 вируса гриппа птиц, у которых отсутствует данная последовательность, считаются низкопатогенными типами.

Выделение вируса производится путём заражения 9–11-тидневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). От павших эмбрионов отбирают аллантоисную жидкость и исследуют в реакции гемагглютинации. Параллельно может проводиться исследование на присутствие генома вируса в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Также может использоваться реакция иммунодиффузии и иммуноферментный анализ. В случае обнаружения вируса с помощью скрининговых тестов проводится патотипирование вируса в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) или ПЦР. Ес-

ли в отобранной аллантоисной жидкости вирус не выявлен, проводятся повторные серии заражений РКЭ (как правило, 2–3 пассажа) с целью накопления вируса с учётом его возможного присутствия в материале в малых количествах [2, 6, 9].

Патотипирование вируса гриппа по гемагглютиниру проводится в РТГА с использованием известных типоспецифических сывороток. При этом не исключается возможность явления кросс-контаминации между штаммами различных комбинаций. С другой стороны, с помощью ПЦР на сегодняшний день можно проводить не только индикацию вируса, но также его патотипирование и определение патогенности выделенного изолята. Однако для достижения максимально точного результата следует руководствоваться двумя методами по патотипированию выделенного штамма [9].

Оценка патогенности может проводиться постановкой биопробы на 4–8-недельных цыплятах с выведением индекса патогенности или методом ПЦР с использованием специальных зондов, соответствующих участку генома вируса, кодирующему HA0 ген (cleavagesite – молекулярный маркер HPAI, представляющий собой обогащение сайта протеолитического нарезания HA базофильными аминокислотными остатками [6, 9]). Обнаружение HA0 последовательности может осуществляться методом секвенирования. Если рисунок аминокислот сходен с тем, что наблюдается в других изолятах высокопатогенного вируса гриппа птиц, исследуемый изолят признаётся HPAI.

На сегодняшний день диагностика гриппа птиц проводится в следующем порядке:

1 Обнаружение генетического материала вируса гриппа птиц (ген M) методом одношаговой ПЦР в реальном времени;

2 Идентификация генетического материала подтипов H5, H7 и H9 вируса гриппа птиц методом одношаговой ПЦР в режиме реального времени;

3 Изоляция вируса проводится на куриных эмбрионах (2–3 пассажа). Если акти-

вность выделенного изолята в РГА в титре $\geq 1:16$, то проводится идентификация выделенного изолята в РТГА со специфическими референтными антисыворотками;

4 Определение патогенности путём биопробы на 4–8 недельных цыплятах или выведение индекса патогенности на 6-недельных цыплятах, а также постановка ПЦР с использованием специфических зондов для обнаружения HA0 участка генома.

В Республике Беларусь высокопатогенным гриппом считается инфекция домашних птиц, вызванная вирусами гриппа А подтипов H5 или H7, имеющая индекс внутривенной патогенности $\geq 1,2$ у цыплят в возрасте 6 недель или вызывающая смертность не менее 75% цыплят в возрасте 4–8 недель, зараженных внутривенно. Подтверждением патогенности также может служить обнаружение методом ПЦР участка HA0 генома вируса [2, 9].

Меры борьбы. В очаге инфекции устанавливается карантин, проводятся мероприятия по убою и уничтожению восприимчивого поголовья согласно «Ветеринарно-санитарным правилам уничтожения и утилизации биологических отходов при гриппе птиц». Все мероприятия по профилактике и борьбе с гриппом птиц проводятся в соответствии с утвержденными ветеринарно-санитарными правилами по борьбе с гриппом птиц и планом мероприятий по предупреждению заноса и распространения гриппа птиц на территории Республики Беларусь [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Вирус гриппа А вызывает заболевание у домашних птиц и других видов животных. Инфицирование у диких птиц приводит к активной иммунизации или вирусоносительству и, как следствие, повсеместному распространению вируса. В настоящее время существует потенциальная угроза заноса вируса гриппа в популяцию домашних птиц и его распространения по территории Республики Беларусь.

2 Высокопатогенные и низкопатогенные штаммы в своем проявлении вызывают различные клинические и патологоанато-

мические признаки. Лабораторная диагностика вируса гриппа птиц является многоэтапным процессом, включающим не только обнаружение вируса в материале, но также и определение подтипа вируса и его патогенности.

3 В Республике Беларусь диагностика вируса гриппа птиц нацелена на обнаружение H5 или H7 подтипов вируса в материале, что является окончательным диагнозом, на основании которого разворачивается целый ряд комплексных мероприятий по

борьбе с возбудителем.

4 В настоящее время в Республике Беларусь принимается комплекс мер по недопущению заноса и распространения вируса на территории страны. Изучение биологических свойств вируса гриппа птиц, проведение мониторинговых исследований, разработка новых и совершенствование имеющихся методов диагностики являются актуальными задачами, требующими научного подхода к их решению.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гамбарян, А.С. *Рецепторная специфичность вирусов гриппа разных хозяев: автореф. дисс. ... д-ра. биол. наук: 03.02.02 / А.С. Гамбарян.* – М., 2007. – 47 с.
- 2 *Об утверждении ветеринарно-санитарных правил по борьбе с гриппом птиц: Постановление министерства сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь, 16 марта 2006 г., № 19 / Нац. центр правовой информ. Респ. Беларусь.* – Минск, 2006.
- 3 Онищенко, Г.Г. *Ситуация по заболеваемости гриппа птиц в мире и Российской Федерации. Совершенствование надзора и контроля за гриппом при подготовке к возможной пандемии / Г.Г. Онищенко // ЖМЭИ.* – 2006. – № 5. – С. 4–16.
- 4 *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных; редкол.: Д.К. Львова [и др.].* – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. – 1200 с.
- 5 Щелкунов, М.Ю. *Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005-2009 гг.): дисс. ... д-ра. биол. наук: 03.02.02 / М.Ю. Щелкунов.* – М., 2010. – 488 с.
- 6 Capua, I., Alexander, D.J. *Avian Influenza and Newcastle Disease: Field and laboratory Manual / I. Capua, D.J. Alexander // Italy: Springer, 2009.* – 198 p.
- 7 Koopmans M. *Transmission of H7N7 avianinfluenza A virus to human during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands / M. Koopmans, B. Wilbrink, M. Conyn, [et al.] // Lancet.* – 2004. – V. 393. – P. 587–593.
- 8 OFFLU [Electronic resource] web portal. – Mode of access: <http://www.offlu.net/fileadmin/home>. Date of access: 19.03.2018.
- 9 *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / ed. OIE Biological Standards Commission and adopted by the International Committee of the OIE.* – Paris: rue de Prony, 2015. – 8 vol.
- 10 WHO [Electronic resource]: *Human to animal interference.* – Mode of access: http://www.who.int/influenza/human_animal_interferemce/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html/. – Date of access: 19.02.2018.
- 11 WHO [Electronic resource]: *Monitoring of surveillance.* – Mode of access: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2012_03_02_GIP_peer_reviewed/en/. – Date of access: 21.02.2018.

диарея

ЭНТЕРОПОЛИСОРБ

Свежее решение
для защиты ваших
животных

• показание к применению –
диарея и пищевые интоксикации

• обладает сорбционным и
детоксикационным действием