

ИНФОРМАЦИЯ

Тропизъм на високопатогенни вируси на Инфлуенца А Н5 от епизоотията 2020/2021 при диви патици и гъски



Абстракт

Огнищата в птицефермите на високопатогенна Инфлуенца А по птиците (НРАІ) и особено случаите сред популациите на диви птици стават все по-чести и причиняват масова смъртност при много видове диви птици. Епизоотията 2020/2021 беше най-голямата и най-смъртоносна, докладвана някога в Европа, а много нови видове птици дадоха положителен тест за НРАІ вирус за първи път. Епизоотията продължава със засилени темпове и в началото на 2022 г. в цяла Европа.

Това проучване изследва тропизма на НРАІ вируса при диви птици.¹ Тестван е модела на прикрепване на вируса 2020 Н5N8 към чревните и дихателните тъкани на ключови видове птици и е характеризирана патологията на естествено инфектирани евразийски свирачки (*Mareca Penelope*, сравнително дребна птица от семейство Патицови) и гъски (*Branta leucopsis*). Това проучване установи, че вирусът Н5N8 2020 има високо ниво на тропизъм към чревния епител (ентеротропизъм) на гъски патици и гъски и запазва тропизма си към епитела на дихателните пътища (респиротропизъм). Естествената инфекция с вируса на НРАІ 2020 Н5 при евразийските Същински патици (подсем. *Anatinae*) и гъските също показва високо ниво на невротропизъм, тъй като и при двата вида се откриват мозъчни лезии, които са локализираны с експресия на вирусен антиген. Комбинацията от респиротропизъм, невротропизъм и евентуално ентеротропизъм допринася за успешната адаптация на 2020/2021 НРАІ Н5 вируси към популациите на диви водолюбиви птици.

¹ Caliendo, V.; Leijten, L.; van de Bildt, M.; Germeraad, E.; Fouchier, R.A.M.; Beerens, N.; Kuiken, T. Tropism of Highly Pathogenic Avian Influenza H5 Viruses from the 2020/2021 Epizootic in Wild Ducks and Geese. *Viruses* 2022, 14, 280. <https://doi.org/10.3390/v14020280>

1. Въведение

Случаите на НРАІ стават все по-чести сред популациите на диви птици и са причинили масова смъртност при много видове диви птици [1,2,3,4,5,6,7,8,9]. Наскоро циркулиращите НРАІ Н5 вируси, произхождащи от линията A/Goose/Guangdong/1/1996 (GsGd), главно вируси НРАІ Н5N8 и Н5N1, принадлежащи към клас 2.3.4.4, са отговорни за последните епидемични събития [6,7,8,9].



Качулата потапница (*Aythya fuligula*)



Евразийска свирачка (*Mareca penelope*)



Белобуза гъска (*Branta leucopsis*)



Сива гъска (*Anser anser*)

В Европа огнищата съвпадат с есенните миграции на дивите птици, време, когато много мигриращи на дълги разстояния водолюбивы птици се събират, за да презимуват или спират около богати на вода райони [10].

Двете най-смъртоносни епизоотии на НРАІ се наблюдават в **Европа** през сезоните на инфлуенцата по птиците през 2016/2017 и през 2020/2021 [11,12]. В **Нидерландия** се съобщава за над 13 000 мъртви диви птици по време на епизоотията 2016/2017 г.; при видовете патици като **Евразийска свирачка** (*Mareca penelope*) и **Качулата потапница** (*Aythya fuligula*) се наблюдават най-високите нива на смъртност [11].

Епизоотията 2020/2021 беше най-голямата и най-смъртоносна, докладвана някога в Европа; при гъските, по-специално при **Белобузата гъска** (*Branta leucopsis*) и **Сивата гъска** (*Anser anser*), се наблюдават най-високите нива на смъртност [6,7,8,9]. Освен това, подобно на гореспоменатата гъска, няколко **нови вида птици бяха съобщени за първи път заразени с НРАІ вирус**.

Временно вирусът продължава да циркулира в Европа доста след периодите на есенна миграция и зимуване и редовно се открива при диви птици през лятото на 2021 г. [9]. През първите месеци на епизоотията 2020/2021 г. Н5N8 беше най-често откриваният вирусен подтип; обаче, този вирусен подтип е локално реасортиран с нископатогенни вируси на инфлуенца по птиците (LPAIV), така че впоследствие са идентифицирани много различни вирусни подтипове (т.е. Н5N1, Н5N2, Н5N3, Н5N4, Н5N5, Н5N8) [6,7,8,9, 13].

Както експерименталните проучвания, така и теренните наблюдения идентифицират диви патици, и по-специално видовете потапници², като **Евразийската свирачка** и **Зеленоглавата патица**, като **най-**

подходящите вектори за разпространение на НРАІ вируси на дълги разстояния [1,2,14,15]. Дивите патици могат да бъдат заразени с НРАІ вирус, без да имат клинични признаци [15]. По време на епизоотията 2020/2021 г., само относително малък брой

² Патиците потапници са плитководни патици, които се хранят предимно по повърхността на водата или като се наклонят с главата напред във водата, за да пасат водни растения, растителност, ларви и насекоми. Тези патици са рядко гмуркащи се и обикновено се срещат в малки езера, реки и други плитководни площи, или може да останат близо до плитките, по-бавни брегове на по-големи водни площи и блата.

заразени Евразийски свирачки и Зеленоглави патици (*Anas platyrhynchos*) са докладвани за мъртви в Европа по време на наблюдение [6,7,8,9]. В някои случаи птиците от тези видове са дали положителен резултат след професионално ловуване и са докладвани като иначе очевидно здрави.

Тези открития показват относително по-ниска вирулентност на вирусите H5 при някои видове патици и могат да подкрепят теорията за повишена адаптация и репликация на вируса на HPAI при тези видове. Вирусната адаптация може да се отнася до повишен вирусен ентелотропизъм при тези гостоприемници, както е установено за ниско патогенните вируси на Инфлуенца А по птиците, които са ензоотични при някои видове водолубиви птици. Предишно проучване вече показва повишения ентелотропизъм на 2016 H5N8 [16].

В това проучване се изследва дали вирусът H5N8 2020 следва тенденцията на своя предшественик, 2016 H5N8 вирус, с повишен ентелотропен потенциал. Предполага се, че ентелотропизмът е вероятно да се поддържа, дори да се засили, особено при видове птици като Зеленоглава патица и Евразийска свирачка, за които се предполага, че са вектори за вирусна дисперсия на дълги разстояния. Освен това, ентелотропизмът може да бъде очевиден и при нови видове гостоприемници, като Сива гъска и Белобуза гъска, с предимството на продължителното запазването на вируса в тези глобално изобилни популации гостоприемници и техните движения.

Настоящото проучване се основава на хипотезата, че вирусът HPAI H5N8 от 2020 г. е по-ентелотропен от вируса HPAI H5N8 от 2016 г., както при установени, така и при нови видове гостоприемници. За да се проучи тази хипотеза, е определен модела на прикрепване на вируса 2020 H5N8 към чревните и респираторните тъкани на ключови видове диви патици и гъски, както и пилета, и след това е сравнен с моделите на прикрепване на по-стари HPAI вируси, като напр. вируси H5N1, 2014 H5N8 и 2016 H5N8. Освен това, са изследвани диви Евразийски свирачки и Белобузи гъски, които са умрели по време на епизоотията 2020/2021 г., и са определени разпространението на вируса, тъканния тропизъм и свързаните с тях лезии в основните им органи.

Тъй като гъската е нов вид гостоприемник за HPAI вируса, свързаните патологични находки при този вид все още не са описани. Тъй като се съобщава, че заразените с вируса на HPAI гъски показват главно неврологични клинични признаци (например тремор, некоординация, тортиколиз) [7], е особено интересен за проучване дали вирусът е невротропен при тези птици.

2. Материали и методи

2.1. Дизайн

Изследването се състои от две части. Първо, е направен вирусен хистохимичен анализ на четири HPAI вируса, за да се сравни модела на прикрепване на тези вируси в дихателните и чревните пътища на пет вида птици. Особено важно е да се определи дали вирусът 2020 H5N8 се прикрепя подобно на вирусите 2016 H5N8, 2014 HPAI H5N8 и 2005 H5N1 към храносмилателния тракт на три вида диви патици (Евразийска свирачка; Зеленоглава патица; Качулата потапница) и един ключов вид дива гъска (Сива гъска).

Второ, изследвани са труповете на 14 диви птици (5 Евразийски свирачки и 9 Белобузи гъски), които са намерени мъртви по време на епидемията H5N8 HPAI 2020/2021 в Нидерландия и които са положителни за H5 HPAI вирус, за да характеризират вирусологията, патологията, и клетъчния тип тропизъм на тази вирусна инфекция в различни органи. По време на аутопсия евразийските свирачки са току-що

умрели; трупите на гъските са на различни етапи на автолиза, вариращи от прясно мъртви до леко автолизирани. Особено важно е да се определи дали 2020 H5N8 HPAI вирус има подобен тропизъм като 2016 H5N8 HPAI вирус от епидемията 2016/17 за храносмилателния тракт на диви птици. Техниките на изследване са подобни на Caliendo et al., 2020 [16] и са описани по-долу.

2.2. Вирусна хистохимия

Използвани са следните четири вирусни изолата: 2005 HPAI вирус H5N1 (A/Turkey/Turkey/1/05), 2014 HPAIV H5N8 (A/Eurasian wigeon/Нидерландия/emc-1/2014), 2016 HPAI вирус H5N8 (A/Eurasian wigeon/Нидерландия/19/2016) и 2020 HPAI вирус H5N8 (A/Eurasian Wigeon/Нидерландия/3/2020). Вирусите бяха индивидуално пасирани в клетки на кучешки бърбек на Madin-Darby (MDCK). След 2-3 дни супернатантата се събира и се изчиства от клетъчни остатъци чрез нискоскоростно центрофугиране в продължение на 20 минути при $1455 \times g$. Вирусите се концентрират индивидуално чрез центрофугиране на изчистените супернатанти във филтърни епруветки (Amicon Ultra-15 100K филтърни епруветки, Millipore, UFC9100024, Дармщат, Германия) за 40 минути при $4000 \times g$ при $4^\circ C$. Концентрираният вирус се инактивира чрез диализа срещу 0,1% формалин в продължение на 3 дни при стайна температура (RT). След инактивиране, вирусният разтвор се диализира срещу фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS) и пълното инактивиране се потвърждава чрез пасажирание два пъти върху MDCK клетки. Вирусът се маркира чрез добавяне на равен обем от 0,1 mg/mL флуоресцеинизотиоцианат (FITC) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) в 0,5 M бикарбонатен буфер (pH 9,5) за 1 час при стайна температура при непрекъснато разбъркване. Белязаният вирус се диализира срещу PBS, за да се загуби целия несвързан FITC. Концентрацията на различните вирусни суспензии, използвани за хистохимия на вируса, беше стандартизирана при 50 хемаглутинационни единици/100 μL (HAU), като се използва хемаглутинационен анализ с пуешки червени кръвни клетки.

Използвани са тъканни срезове от следните видове: Качулата потапница ($n = 3$), Евразийска свирачка ($n = 3$), Зеленоглава патица ($n = 3$), Сива гъска ($n = 3$) и пиле (*Gallus domesticus*) ($n = 2$). Тези тъкани идват от тъканната банка на Erasmus MC и са от здрави животни, които не показват аномалии или хистологични лезии. От храносмилателния тракт на същите птици, избраните тъкани са дванадесетопръстник, йеюлум, илеум и дебело черво. Секции от йеюлум и илеум на сива гъска не бяха налични за хистохимия на вируса поради ограничения на вземането на проби поради голямото натоварване по време на избухването на HPAI. От дихателните пътища, избрани тъкани са трахея, първичен бронх, вторичен бронх, третичен бронх или парабронх, въздушни капиляри и въздушни торбички.

Фиксирани с парафин участъци с формалин с дебелина три μm от всяка тъкан се депарафинизират в ксилен и се хидратират с помощта на градиращи алкохоли и се инкубират една нощ при $4^\circ C$ с FITC-маркирани вируси при концентрация 50 HAU/100 μL . За да се даде възможност за визуализация чрез светлинна микроскопия, FITC беше свързан с белязано с пероксидаза заешко анти-FITC антителио (ДАКО, Glostrup, Дания). Сигналят се усилва с помощта на система за усилване на тирамид (Perkin-Elmer, Бостън, Масачузетс, САЩ). Пероксидазата се разкрива с 3-амино-9-етилкарбазол (Sigma-Aldrich), което води до яркочервена утайка. Тъканите се оцветяват с хематоксилин и се вграждат в глицерол-желатин (Merck, Whitehouse Station, NJ, САЩ). Пропускането на FITC-маркирания вирус беше използван като отрицателна контрола.

Слайдовете са оценени със светлинна микроскопия, за да се оцени изобилието от вирусно прикрепване към епителните клетки и оценени, както следва: прикрепване към <1% от епителните клетки (-), прикрепване към ≥ 1 и <10% от епителните клетки (\pm), прикрепване до $\geq 10\%$ и <50% от епителните клетки (+) и прикрепване към $\geq 50\%$ от епителните клетки (++) . Накрая, средният резултат беше определен за всеки вид на различните анатомични места. Разрезите бяха разгледани без да се знае идентичността на птиците.

2.3. Вирусология, патология и имунохистохимия на естествено заразени диви птици



Трупове на 14 диви птици (5 Евразийски свирачки и 9 Белобузи гъски) са събрани в Нидерландия през ноември и декември 2020 г. От всяка птица са взети фарингеални и клоакални тампони за вирусна диагностика, като се използват стерилни памучни тампони, поставени в 1 mL вирус транспортна среда. Всички птици са с положителни тестове за HPAIV H5 2020 чрез PCR анализи с обратна транскрипция в реално време (RRT-PCR) в орофарингеални и/или клоакални тампони, както е описано по-горе [12].

При следсмъртния преглед се изследват следните тъкани, когато са налични: мозък, бели дробове, въздушни торбички, панкреас, черен дроб, стомах (проventрикулус и вентрикулус), тънки черва (дванадесетопръстник, йеюnum на 5, 15, 35 см по дължината му, илеум, илеоцекална връзка), дебело черво (сляпо черво, дебело черво), бъбреци, надбъбречна жлеза, далак и сърце. Дублирани тъканни срезове се събират за откриване на вируси и се държат при -80°C до анализа или се фиксират в 10% неутрален буфериран формалин и се вграждат в парафин. Органите на гъските не бяха достъпни за вирусология.

За откриване на вируси тъканните проби първо се претеглят и след това се хомогенизират с FastPrep 24 (MP Biomedicals, Айнховен, Холандия) в балансиран солев разтвор на Hank и се центрофугират за кратко преди разреждане в лизисен буфер за екстракция на РНК [14,15]. Извлечената обща РНК от тъканни проби, фарингеални и клоакални тампони се тества за наличие на матричен ген-фрагмент на грипния вирус А; вируси във фарингеални и клоакални тампони бяха допълнително подтипирани, като се използва RT-PCR в реално време на насочени фрагменти на H5 и N8 гените [17]. Накратко, РНК от тъканни и тампони суспензии се изолира с помощта на MagNaPure LC система с комплект за изолиране на обща нуклеинова киселина MagNaPure LC (Roche Diagnostics, Almere, Холандия). RT-PCR се извършва на машина ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) с помощта на TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems). Олигонуклеотидите (5'-CTT-CTR-ACC-GAG-GTC-GAA-ACG-TA-3') и (5'-TCT-TGT-CTT-TAG-CCA-YTC-CAT-GAG-3') и маркираните сонди (5' 6-FAM-TCA-GGC-CCC-CTC-AAA-GCC-GAG-A-BHQ-3') и (5' 6-FAM-TCA-GGC-CCC-CTC-AAA-GCC -GAA-A-BHQ-3') са използвани за откриване на матриксния сегмент на грипните А вируси. Пробите се считат за вирус-положителни, ако стойността на прага на цикъла (Ct) е <40 [14,15,17].

За хистопатология и имунохистохимия, тъканите се нарязват на 3 μm и се оцветяват с хематоксилин и еозин за хистопатологичен анализ или се оцветяват с моноклонално антитяло срещу нуклеопротеин на вируса на инфлуенца А за

имунохистохимично откриване на грипен вирусен антиген [14,15, както е описано по-горе].

3. Резултати

3.1. Модел на прикрепване на вируса към епитела на храносмилателния и дихателния тракт

В чревния епител 2014 H5N8, 2016 H5N8 и 2020 H5N8 имат общо по-високо прикрепване от H5N1 (Таблица 1).

Таблица 1. Модел на прикрепване на вируси на инфлуенца А по птиците към епителните клетки на чревния тракт

Species	Tissues	Avian Influenza Viruses			
		2005 H5N1	2014 H5N8	2016 H5N8	2020 H5N8
Зеленоглава патица	Duodenum	++	+	++	++
	Jejunum	++	++	++	++
	Peum	+	+	++	++
	Colon	+	+	++	++
Евразийска свирачка	Duodenum	±	±	±	±
	Jejunum	-	±	±	±
	Peum	-	±	-	±
	Colon	-	±	-	±
Качулата потапница	Duodenum	±	±	±	±
	Jejunum	-	±	±	-
	Peum	-	±	-	-
	Colon	±	±	-	-
Сива гъска	Duodenum	±	±	±	+
	Jejunum	nd	nd	nd	nd
	Peum	nd	nd	nd	nd
	Colon	±	±	±	±
Пилета	Duodenum	++	++	++	++
	Jejunum	++	++	++	++
	Peum	++	++	++	++
	Colon	+	+	+	+

Средният тропизъм на прикрепване се оценява, както следва: прикрепване към <1% от епителните клетки (-), прикрепване към ≥1 и <10% от епителните клетки (±), прикрепване към ≥10% и <50% от епителните клетки (+) и прикрепване към ≥50% от епителните клетки (++) . nd, не е направено.

В сравнение между видовете гостоприемници, прикрепването на вируса към чревния епител е ниско при Качулатата потапница, средно при Евразийска свирачка и Сива гъска и високо при пиле (сем. Кокошеви) и зеленоглавата патица.

Нивото на тропизъм на H5N8 от 2020 г. за вид гостоприемник е: при зеленоглава патица, подобно на H5N8 от 2016 г. и по-високо от H5N1 и H5N8 от 2014 г.; в евразийски свирачки, подобно на 2014 H5N8, по-високо от H5N1 и малко по-високо от 2016 H5N8; при качулата потапница, по-ниско от 2014 H4N8, 2016 H5N8 и H5N1; при Сива гъска, малко по-високо от 2014 H5N8, 2016 H5N8 и H5N1, поради по-високото прикрепване към дванадесетопръстника; при пилето всички вируси имат еднакво високо ниво на тропизъм.

При респираторния епител вирусното прикрепване на всеки вирус като цяло е било високо при всички видове, особено в трахеята, първичния и вторичния бронх (Таблица 2).

Таблица 2. Модел на прикрепване на вируси на Инфлуенца А по птиците към епителните клетки на дихателните пътища

Видове птици	Тъкани	Avian Influenza Viruses			
		2005 H5N1	2014 H5N8	2016 H5N8	2020 H5N8
Зеленоглава патица	Trachea	++	++	++	++
	Primary bronchus	++	++	++	++
	Secondary bronchus	++	++	++	++
	Parabronchus atria	±	±	±	±
	Air capillaries	+	±	±	±
	Air sac	++	++	++	++
Евразийска свирачка	Trachea	+	++	++	++
	Primary bronchus	+	++	++	++
	Secondary bronchus	++	++	++	++
	Parabronchus atria	±	±	±	±
	Air capillaries	+	±	±	±
	Air sac	++	++	++	++
Качулата потапница	Trachea	++	+	++	++
	Primary bronchus	++	++	++	++
	Secondary bronchus	++	++	++	±
	Parabronchus atria	+	±	±	±
	Air capillaries	+	±	±	±
	Air sac	++	+	++	++
Сива гъска	Trachea	++	++	++	++
	Primary bronchus	nd	nd	nd	nd
	Secondary bronchus	++	++	++	++
	Parabronchus atria	++	+	+	+
	Air capillaries	+	+	++	+
	Air sac	++	++	++	++

Видове птици	Тъкани	Avian Influenza Viruses			
		2005 H5N1	2014 H5N8	2016 H5N8	2020 H5N8
Пилета	Trachea	++	++	++	++
	Primary bronchus	+	++	++	++
	Secondary bronchus	+	++	++	++
	Parabronchus atria	++	+	++	++
	Air capillaries	+	-	±	+
	Air sac	++	++	++	++

Средният тропизъм на прикрепване се оценява, както следва: прикрепване към <1% от епителните клетки (-), прикрепване към ≥1 и <10% от епителните клетки (±), прикрепване към ≥10% и <50% от епителните клетки (+) и прикрепване към ≥50% от епителните клетки (++) . nd, не е направено.

Нивото на прикрепване (тропизмът) на 2020 H5N8 е по-ниско от 2016 H5N8 във вторични бронхи на Качулата потапница и въздушни капиляри на Сива гъска; и по-високо от 2016 H5N8 във въздушните капиляри на пилето.

3.2. Вирусология, експресия на антиген на грипния вирус и свързани лезии при естествено заразени диви птици

За евразийските свирачки, фарингеалните и клоакалните тампони са положителни при всичките пет тествани птици (Таблица 3).

Таблица 3. RT-PCR резултати* в тампонни проби и органи на инфектирани с H5N8 диви птици Евразийска свирачка (Mareca penelope) и Белобуза гъска (Branta leucopsis)

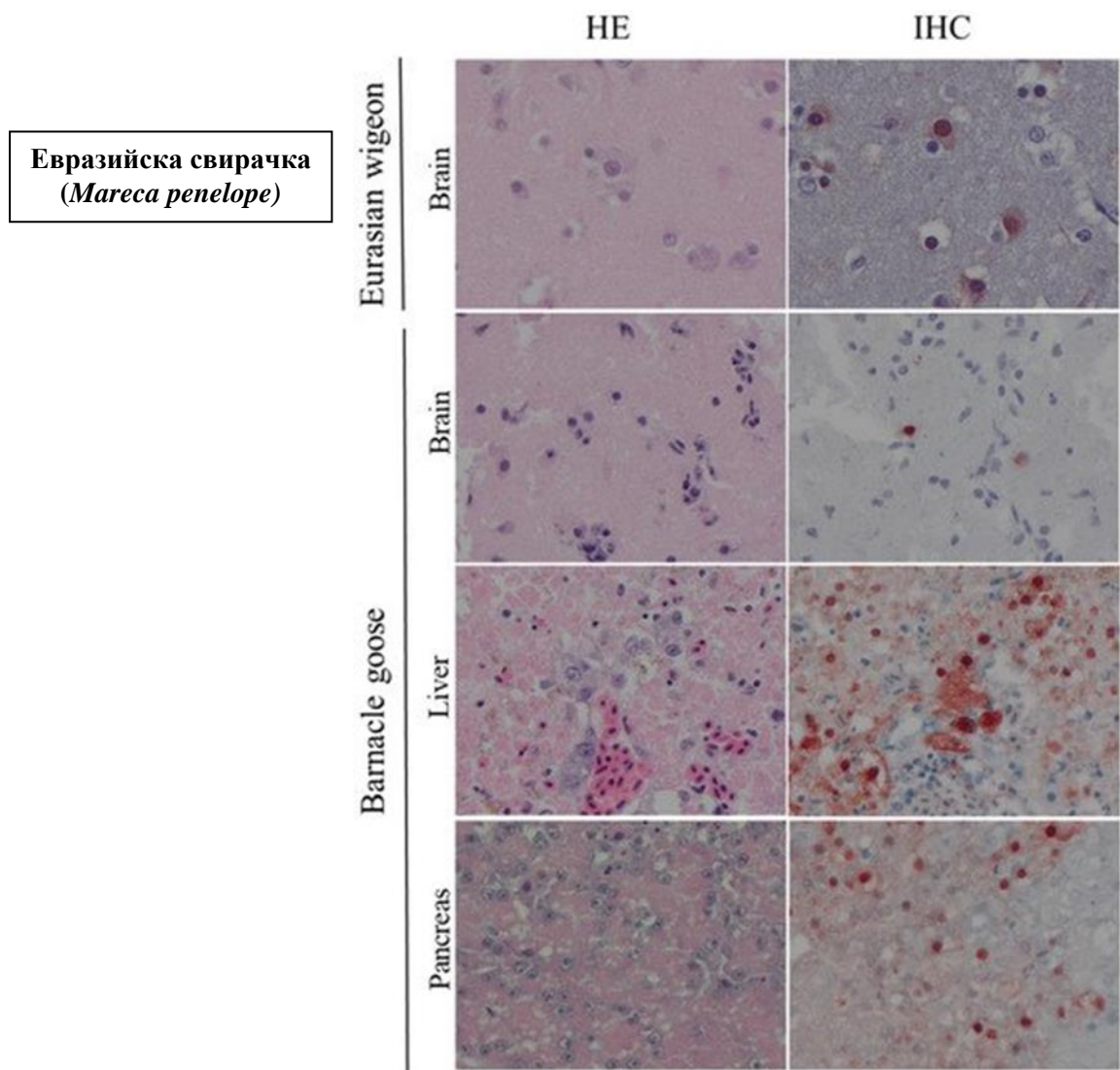
Проби	Евразийска свирачка					Белобуза гъска								
	W1	W2	W3	W4	W5	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Вирус	H5N8	H5N1	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5N8	H5	H5N8	H5N8
Фарингеални тампони	22	30	28	33	23	np	27	29	33	np	33	np	22	27
Клоакални тампони	30	27	26	24	27	28	29	np	28	30	29	34	28	28
Бял дроб	25	32	23	31	27	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Черен дроб	29	30	35	34	22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Сърце	23	30	23	32	27	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Йеюну	27	30	23	30	22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Мозък	28	34	24	32	28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* Стойност на прага на цикъла (Ct), граничната стойност е 40; np, не присъства; nd, не е направено.

Вирусна РНК е открита във всички изследвани органи (т.е. бял дроб, черен дроб, сърце, йеюну, мозък), което означава, че вирусът се е разпространил системно.

При белобузите гъски клоакални тампони са по-често положителни от фарингеалните тампони (88% клоакален тампон, положителен/тестван 8/9; 66% фарингеален тампон, положителен/тестван 6/9), но когато и двата са положителни, като цяло съдържат подобно количество вирус.

Най-общо, основните патологични промени се състоят от мултифокална некроза в черния дроб и панкреаса; точкови кръвоизливи в мозъка; субперикардни кръвоизливи и мултифокална белодробна. Хистологично са открити лезии в черния дроб, мозъка,



бъбреците, белите дробове, сърцето (Фигура 1, Таблица 4 и Таблица 5).

Фигура 1. Хистологични промени и експресия на антигена на инфлуенцния вирус в тъканите на заразени с H5 Евразийска свирачка (*Mareca penelope*) и Белобуза гъска (*Branta leucopsis*). Тъканните участъци в лявата колона са оцветени с хематоксилин и еозин (HE). Серийните тъканни срезове в дясната колона са оцветени за антиген на грипния вирус чрез имунохистохимия (IHC). Във всички тъкани има некроза и възпаление, свързани с експресията на вирусния антиген.

Таблица 4. Честота и разпределение на грубите и хистологични лезии в трупове на дивни птици

		Брой та птиците с груби (G) и хистологични (H) лезии в:															
		Дихателната система				Храносмилателната система						Други системи					
		Бял дроб		Въздушен сак		Черва		Панкреас		Черен дроб		Мозък *		Сърце		Бъбреци	
Вид	Бр. птици	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H
Евразийска свирачка	5	3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	3	1	1	0	0
Белобузга	9 *	3	2	0	0	0	0	5	3	0	1	3	4	2	0	0	1

* за 4 птици.

Таблица 5. Експресия на антиген на вируса на Инфлуенца А по птиците в клетъчни типове на различни органи на дивни птици

		Number of Birds Expressing Influenza Virus Antigen in a Cell Type of an Organ																	
		Respiratory System						Digestive System						Other Systems					
		Lung			Air Sac			Intestine			Pancreas			Liver		Brain *		Heart	
Species	No of Birds	EP	E	N	EP	E	N	EP	E	N	E	EP	E	H	E	N	E	M	
Eurasian wigeon	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	1	
Barnacle goose	9 *	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	4	0	0	

EP – епителна клетка; E – ендотелна клетка; N – неврон; H – хепатоцит; M – миоцити; * за 4 птици.

В черния дроб и панкреаса лезиите се характеризират като мултифокална, лека до умерена некроза; тези некротични огнища, локализиращи съвместно с наличие на вирусен антиген. В мозъка лезиите се характеризират като мултифокален енцефалит с огнища на глиоза, невронална дегенерация и некроза; изобилие от вирусен антиген присъства в ядрото и цитоплазмата на няколко неврона в тези лезии. В бъбреците лезиите се характеризират като лек интерстициален нефрит, без наличие на вирусен антиген. В сърцето лезиите се характеризират като мултифокална до фокално екстензивна миокардна некроза; малко миокардни клетки в тези лезии представят вирусен антиген. В белите дробове се наблюдават леки до умерени възпалителни промени и инфилтрация с мононуклеарни клетки и малко епителни клетки в тези лезии представят вирусен антиген. Няма хистологични лезии и откриваем вирусен антиген в стомашно-чревния тракт на изследваните птици.

4. Обсъждане

Големият брой птици и нарастващият брой видове дивни птици, заразени по време на скорошни епидемии от НРАИ, предполагат, че вирусите на НРАИ H5 се адаптират към дивните птици. По време на минали епизоотии домашните птици са играли важна роля за линията Gs/Gd, като са действали като основен резервоар, където може да се осъществи еволюция на вируса [1,2]. Постепенно вирусът се адаптира по-добре към дивните птици и сега изглежда се поддържа в дивни популации независимо от

популациите на домашни птици [6,7,8,9]. Един от факторите зад тази адаптация може да бъде **новопридобитият тропизъм на НРАІ вирусите за чревния тракт на техните гостоприемници** [16]. Ентеротропизмът е механизъм, по-често наблюдаван при LPAIV, но също така наскоро докладван за НРАІ H5N8 и позволява фекално-орално предаване на вируса при диви птици [18]. Резултатите от това проучване частично подкрепят хипотезата на авторите, че вирусът H5N8 2020 има по-висок тропизъм за чревния тракт на дивите птици, отколкото вируса H5N8 2016. Първо, вирусът H5N8 от 2020 г. има малко по-високо ниво на тропизъм към чревния епител на Евразийска свирачка и Сива гъска. При зеленоглавите патици нивото на тропизъм към чревния тракт на вируса H5N8 от 2020 г. е непроменено високо в сравнение с вируса H5N8 от 2016 г. Качулатата потапница е по-малко вероятен вектор за НРАІV на дълги разстояния, а вирусът H5N8 2020 има ниско ниво на прикрепване към чревния епител на този вид.

Второ, клоакалните тампони са последователно положителни за вирусна РНК в естествено заразени евразийски свирачки и белобузи гъски и са по-надеждни при откриване на инфекцията при белобузите гъски. В допълнение, йеюнуът на петте заразени евразийски свирачки е постоянно положителен за вирусна РНК чрез RT-PCR. Тези открития контрастират с предишни проучвания, където клоакалната екскреция на заразени с вируса на НРАІ птици обикновено е необичайна и, ако е налице, по-ниска от фарингеалната екскреция [14,15,16]. **Тези открития подкрепят възможността за репликация на вируса на НРАІ в чревния тракт на дивите птици.**

Въпреки това, находка срещу хипотезата на авторите е липсата на експресия на вирусен антиген и свързаните с тях хистологични лезии в чревния епител на естествено заразени евразийски свирачки и белобузи гъски. По-рано е докладвана експресия на вирусен антиген в стомашно-чревния епител на Евразийска свирачка и Сива гъска, естествено заразени с 2016 H4N8 [16]. Следователно авторите не могат да потвърдят репликацията на вируса H5N8 2020 в чревния тракт на тези птици.

Евразийските свирачки и гъските имат сходни биологични черти, които могат да бъдат от значение за епидемиологията на НРАІ. Евразийските свирачки вече са описани като вектори на дълги разстояния; Инфекцията с вируса на НРАІ при белобузи и сиви гъски е по-скорошно и по-малко проучено събитие. Въпреки че по-рано не е установено, че мигриращите видове гъски разпространяват LPAIV [19], този въпрос трябва да бъде преразгледан за вирусите на НРАІ, като се има предвид новото участие на белобузите гъски и сивите гъски в последните епизоотии на НРАІ.

Друга често срещана черта между евразийските свирачки и гъските е тяхната биология на хранене. Освен да се потапят в плитките води за треви, насекоми, ларви, **евразийските свирачки** използват разнообразна стратегия за хранене, която включва търсене на храна чрез паша на сушата [20,21]. По време на миграция свирачките използват голямо разнообразие от местообитания като влажни зони, включително мокри земеделски полета, и често се хранят с трева, листа, стъбла и корени.

Използването на богата на вода земя за почивка и хранене също е често срещана характеристика при **гъските**, тъй като тези птици редовно се събират и се хранят с облагородени земеделски пасища [22,23]. По време на тези събития се наблюдава висока плътност на птиците на ограничено повърхностно пространство. Близкият контакт и фактът, че птиците замърсяват тревата, която ядат, с потенциално заразени изпражнения, могат да увеличат шансовете за инфекция с инфлуенчен вирус по орофекален път в стадата и от евразийски свирачки, и от гъски.

Респиротропизмът се запазва за вируса H5N8 от 2020 г., въз основа на модели на прикрепване на вируса и експресия на вирусен антиген, наблюдавани в това проучване. Комбинацията от тези два механизма (т.е. респиротропизъм и ентеротропизъм) може да даде предимство на HPAI вирусите пред LPAIV, които се екскретират главно по орофекален път.

Това проучване също описва вирусологията и патологията на инфекцията с вируса на HPAI при белобузи гъски, нов вид гостоприемник за вируса. Инфекцията с вируси на HPAI H5 както при евразийските свирачки, така и при белобузите гъски се характеризира с високо ниво на невротропизъм. И при двата вида се наблюдават мозъчни лезии, свързани с експресия на вирусен антиген. Най-вероятно това е и причината за смъртта на птиците. Мозъчните лезии също са съвместими с неврологични признаци (т.е. некоординация, тремор на тялото, тортиколис), показани от много птици и описани от оператори на терен по време на наблюдението на HPAI 2020/2021 [7]. **Високият невротропен потенциал** на HPAI вирусите е докладван при домашни видове и по-често се съобщава и при диви птици [24,25,26,27]. В предишни проучвания, мултифокален вирусен енцефалит, свързан с тежки неврологични признаци, е наблюдаван при **Качулата потапница** (Патици) и **Кафявоглава потапница** (Патици) (*Aythya ferina*), заразени с вируса HPAI 2005 H5N1 [14]; полиоенцефалит и свързаните с него високи вирусни натоварвания в мозъка са наблюдавани при **Домашна патица** (*Anas platyrhynchos domesticus*), заразени с вируса HPAI 2016 H5N8 [27]. По същия начин, изразен невротропизъм, характеризиращ се с мултифокален енцефалит с огнища на глиоза, невронална дегенерация и некроза, се наблюдава при **евразийски свирачки и белобузи гъски**, заразени с вируси HPAI 2020 H5.

Смъртността на водолюбивите птици от невротропизма на HPAIV H5N8 от 2020 г. може да послужи за достигане до още нови видове гостоприемници. Заразените водолюбивы птици с неврологични признаци са по-видими и предизвикват ловните инстинкти и реакции на своите хищници; те стават по-лесна плячка за улов и е вероятно да бъдат изядени [28,29]. През 2020/2021 г. новоинфектираните с HPAI вирус видове са **хищни птици като скуа** (*Stercorarius skua*, сем. Морелетникови) и **златен орел** (*Aquila chrysaetos*) [8,9]. Освен това, за първи път след епидемията на HPAI H5N1 през 2005/2006 г., по време на епидемията от HPAI H5 2020/2021 г. беше съобщено, че **дивите хищници от бозайниците** са заразени с HPAI вирус; Европейски лисици (*Vulpes vulpes*), сиви тюлени (*Halichoerus grypus*) и обикновени тюлени (*Phoca vitulina*) са открити мъртви, вероятно от контакт или поглъщане на заразени диви птици [8,9]. Поради относително ограничената история на HPAI при диви птици, възможно е нивата на вирулентност все още да не са оптимизирани за предаване чрез естествен подбор [30,31] и непрекъснатата развиващата се динамика на HPAI при дивите птици може да доведе до нови посоки за развитие на вирулентност и тропизъм на вируса на HPAI при диви птици.

В заключение, HPAI H5 вирусите от епидемията 2020/2021 показват разнообразен репертоар от тъканен тропизъм, включително респиротропизъм и невротропизъм, както и високо ниво на ин витро ентеротропизъм при заразяване на диви патици и гъски. Поради постоянната еволюция, показвана от HPAI вирусите, непрекъснатото наблюдение на бъдещите огнища е жизненоважно за по-добро разбиране на новата динамика между вируса и неговите гостоприемници.

Използвана литература и повече подробности:

Caliendo, V.; Leijten, L.; van de Bildt, M.; Germeraad, E.; Fouchier, R.A.M.; Beerens, N.; Kuiken, T. Tropism of Highly Pathogenic Avian Influenza H5 Viruses from the 2020/2021 Epizootic in Wild Ducks and Geese. *Viruses* **2022**, *14*, 280. <https://doi.org/10.3390/v14020280>; <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/280/htm>



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:

Както и други материали:

<http://corhv.government.bg/>

<http://corhv.government.bg/?cat=27>

<http://corhv.government.bg/?cat=71>

14.02.2022 г. д-р Мадлен Василева

За повече научна информация прилагаме библиографията на оригиналната публикация:

References

1. Lycett, S.J.; Pohlmann, A.; Staubach, C.; Caliendo, V.; Woolhouse, M.; Beer, M.; Kuiken, T. Global Consortium for HN, Related Influenza V. Genesis and spread of multiple reassortants during the 2016/2017 H5 avian influenza epidemic in Eurasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 20814–20825. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lycett, S.; Bodewes, R.; Pohlmann, A.; Bank, J.; Banyai, K.; Boni, M. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science* **2016**, *354*, 213–217. [[Google Scholar](#)]
3. Madslie, K.; Moldal, T.; Gjerset, B.; Gudmundsson, S.; Follestad, A.; Whittard, E.; Tronerud, O.H.; Dean, K.R.; Åkerstedt, J.; Jørgensen, H.J.; et al. First detection of highly pathogenic avian influenza virus in Norway. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 218. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Li, X.; Lv, X.; Li, Y.; Peng, P.; Zhou, R.; Qin, S.; Ma, E.; Liu, W.; Fu, T.; Ma, P.; et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus in Swans, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1732–1734. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, E.; Smietanka, K.; Staubach, C.; Terregino, C.; Baldinelli, F. Avian influenza overview—Update on 19 November 2020, EU/EEA and the UK. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6341. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, E.; Staubach, C.; Terregino, C.; Baldinelli, F. Scientific Report: Avian influenza overview August–December 2020. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6379. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, É.; Staubach, C.; Terregino, C.; Lima, E.; Muñoz Guajardo, I.; et al. Scientific report: Avian influenza overview December 2020–February 2021. *EFSA J.* **2021**, *19*, 6497. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, É.; Staubach, C.; Terregino, C.; Aznar, I.; Muñoz Guajardo, I.; et al. Scientific report: Avian influenza overview February–May 2021. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06951. [[Google Scholar](#)]
9. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, É.; Staubach, C.; Terregino, C.; Aznar, I.; Muñoz Guajardo, I.; et al. Scientific report: Avian influenza overview May–August 2021. *EFSA J.* **2021**, *18*, e06270. [[Google Scholar](#)]
10. Verhagen, J.H.; Fouchier, R.A.M.; Lewis, N. Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild–Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. *Viruses* **2021**, *13*, 212. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Kleyheeg, E.; Slaters, R.; Bodewes, R.; Rijks, J.M.; Spierenburg, M.A.H.; Beerens, N.; Kelder, L.; Poen, M.J.; Stegeman, J.A.; Fouchier, R.A.M.; et al. Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A

- (H5N8) Virus Outbreak, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2050–2054. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Poen, M.J.; Bestebroer, T.M.; Vuong, O.; Scheuer, R.D.; van der Jeugd, H.P.; Kleyheeg, E.; Eggink, D.; Lexmond, P.; van den Brand, J.M.A.; Begeman, L.; et al. Local amplification of highly pathogenic avian influenza H5N8 viruses in wild birds in The Netherlands, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 17-00449. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 13. Lewis, N.S.; Banyard, A.C.; Whittard, E.; Karibayev, T.; Al Kafagi, T.; Chvala, I.; Byrne, A.; Meruyert Akberovna, S.; King, J.; Harder, T.; et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg. Microbes Infect.* **2021**, *10*, 148–151. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 14. Keawcharoen, J.; Van Riel, D.; Van Amerongen, G.; Bestebroer, T.; Beyer, W.; Van Lavieren, R.; Osterhaus, A.; Fouchier, R.; Kuiken, T. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 600–607. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 15. Van den Brand, J.M.A.; Verhagen, J.H.; Veldhuis Kroeze, E.J.B.; van de Bildt, M.W.G.; Bodewes, R.; Herfst, S.; Richard, M.; Lexmond, P.; Bestebroer, T.M.; Fouchier, R.A.M.; et al. Wild ducks excrete highly pathogenic avian influenza virus H5N8 (2014–2015) without clinical or pathological evidence of disease. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 67. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 16. Caliendo, V.; Leijten, L.; Begeman, L.; Poen, M.J.; Fouchier, R.A.M.; Beerens, N.; Kuiken, T. Enterotropism of highly pathogenic avian influenza virus H5N8 from the 2016/2017 epidemic in some wild bird species. *Vet. Res.* **2020**, *51*, 117. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 17. Munster, V.J.; Baas, C.; Lexmond, P.; Bestebroer, T.M.; Guldemeester, J.; Beyer, W.E.; de Wit, E.; Schutten, M.; Rimmelzwaan, G.F.; Osterhaus, A.D.M.E.; et al. Practical considerations for high-throughput influenza A virus surveillance studies of wild birds by use of molecular diagnostic tests. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 666–673. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 18. Kuiken, T. Is low pathogenic avian influenza virus virulent for wild waterbirds? *Proc. Biol. Sci.* **2013**, *280*, 1763. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 19. Yin, S.; Kleijn, D.; Müskens, G.J.D.M.; Fouchier, R.A.M.; Verhagen, J.H.; Glazov, P.M.; Si, Y.; Prins, H.H.T.; de Boer, W.F. No evidence that migratory geese disperse avian influenza viruses from breeding to wintering ground. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177790. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 20. Guillemain, M.; Martin, G.R.; Fritz, H. Feeding methods, visual fields and vigilance in dabbling ducks (Anatidae). *Functional. Ecol.* **2002**, *16*, 522–529. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 21. Dessborn, L.; Brochet, A.L.; Elmberg, J.; Legagneux, P.; Gauthier-Clerc, M.; Guillemain, M. Geographical and temporal patterns in the diet of pintail *Anas acuta*, wigeon *Anas penelope*, mallard *Anas platyrhynchos* and teal *Anas crecca* in the Western Palearctic. *Eur. J. Wildl. Res.* **2011**, *57*, 1119–1129. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 22. Percival, S.M.; Percival, T. Feeding ecology of barnacle geese on their spring staging grounds in northern Iceland. *Ecography* **1997**, *20*, 461–465. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 23. Black, J.M.; Carbone, C.; Wells, R.L.; Owen, M. Foraging dynamics in goose flocks: The cost of living on the edge. *Anim. Behav.* **1992**, *44*, 41–50. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 24. Swayne, D.E. Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Birds. *Avian Dis.* **2007**, *51*, 242–249. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Bröjer, C.; Ågren, E.O.; Uhlhorn, H.; Bernodt, K.; Jansson, D.S.; Gavier-Widén, D. Characterization of Encephalitis in Wild Birds Naturally Infected by Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1. *Avian Dis.* **2012**, *56*, 144–152. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. van den Brand, J.M.; Krone, O.; Wolf, P.U.; van de Bildt, M.W.; van Amerongen, G.; Osterhaus, A.D.; Kuiken, T. Host-specific exposure and fatal neurologic disease in wild raptors from highly pathogenic avian influenza virus H5N1 during the 2006 outbreak in Germany. *Vet. Res.* **2015**, *46*, 24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Grund, C.; Hoffmann, D.; Ulrich, R.; Naguib, M.; Schinköthe, J.; Hoffmann, B.; Harder, T.; Saenger, S.; Zscheppang, K.; Tönnies, M.; et al. A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 132. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 28. Genovart, M.; Negre, N.; Tavecchia, G.; Bistuer, A.; Parpal, L.; Oro, D. The young, the weak and the sick: Evidence of natural selection by predation. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9774. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 29. Lebarbenchon, C.; Feare, C.J.; Renaud, F.; Thomas, F.; Gauthier-Clerc, M. Persistence of highly pathogenic avian influenza viruses in natural ecosystems. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1057–1062. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 30. Geoghegan, J.L.; Holmes, E.C. The phylogenomics of evolving virus virulence. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 756–769. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
 31. Lloyd-Smith, J.O.; George, D.; Pepin, K.M.; Pitzer, V.E.; Pulliam, J.R.C.; Dobson, A.P.; Hudson, P.J.; Grenfell, B.T. Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science* **2009**, *326*, 1362–1367. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0

