

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, ЦИРКУЛИРОВАВШЕГО ВО ВРЕМЯ ЭПИЗООТИИ 2005-2007 ГГ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СТРАН СНГ

Яцышина С.Б., Астахова Т.С., Браславская С.И., Кондратьева Т.Ю., Виткова О.Н.², Вангели Е.², Калмыков М.В.², Шварсалон Н.К.³, Хайтович А.Б.³, Шипулин Г.А.

ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; 1 - Крымская противочумная станция Минздрава Украины, Симферополь, Украина; 2 - Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, Москва, Россия.

Введение

В июле 2005 года впервые в России была зарегистрирована крупная эпизоотия, вызванная вирусом гриппа А/Н5N1 среди домашней и дикой птицы, которая началась на территории Новосибирской области и в дальнейшем распространилась в Юго-Западном направлении на Омскую, Тюменскую, Курганскую, Челябинскую, Астраханскую области, Краснодарский край и другие регионы России, сопредельные страны и страны Европы. Несмотря на то, что на территории России случаев заболевания людей зарегистрировано не было, события в Турции и Азербайджане в 2006 г., где фиксировали случаи заболевания с высокой смертностью (33 и 62 % соответственно), свидетельствуют о патогенности некоторых штаммов данного субтипа вируса для людей. В связи с этим в случае возникновения эпизоотий гриппа с целью разработки правильной тактики противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий чрезвычайно важным является детальное изучение изолятов вируса для определения субтипа, оценки патогенности для животных и человека, эпидемической опасности и резистентности к противовирусным препаратам.

Цели и задачи

Целью данной работы послужило проведение мониторинга и молекулярно-генетического анализа изолятов вирусов гриппа А у диких перелетных и домашних птиц в ряде регионов России, АР Крым и Азербайджан за период июль 2005 г – сентябрь 2007 г.

Материалы и методы

Первичная идентификация вирусов гриппа А осуществлялась с помощью ПЦР тест-системы «АмплиСенс Influenza virus A/Н5N1» (ФГУН ЦНИИЭ). Экстракцию РНК из суспензии вирусов проводили с использованием набора реагентов «Рибо-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ), реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора «Реверта-Л» (ФГУН ЦНИИЭ). Для секвенирования протяженных участков всех сегментов вируса гриппа Н5N1 были выбраны праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов ДНК.

ПЦР проводили на приборах «Терцик» (ДНК-технология) с использованием реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ. Секвенирование фрагментов амплификации выполняли на базе ФГУН ЦНИИЭ методом “cycle sequence” с набором ABI PRISM Big Dye v.1.1 (Applied Biosystems, USA), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с использованием блока программ DNASTAR по алгоритму Clustal. Филогенетический анализ проводился с помощью программы MEGA 3.1 методом Neighbor Joining по алгоритму Kimura 2-parameter с выполнением Bootstrap Test of Phylogeny (1000 повторов).

Результаты

Проведено секвенирование кДНК вируса гриппа А/Н5N1, выделенной из материала от павших домашних птиц в селе Суздалка Доволенского района Новосибирской области, в селе Яновка Ефремовского района Тульской области в 2005 г, в районе Одинцово в Подмосковье в 2007 г., в селе Черноземельное Советского района АРК в 2005 г.; в селе Горностаевка и посёлке Приморский АРК в 2006 г.; в населенных пунктах Биласувар, Гилязи, Баку республики Азербайджан; в г. Лобинск Краснодарского края в 2007 г., а также из материала от павших диких лебедей в дельте реки Волга в районе Астраханской области в 2005 г. и от больших бакланов на о. Безымянный в Херсонской обл. в 2006 г. Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в Gen Bank под номерами DQ212791, DQ212792, DQ279300, DQ279301, DQ320136, DQ320137, DQ340847, DQ340848, DQ840518 - DQ840533, EF605591 - EF605596, EF605597 - EF605604.

Заключение

Исследование показало, что вирус относится к высоко патогенным вариантам, возникшим в Китае в результате явления реассортации циркулировавших в резервуарах диких и домашних птиц геновариантов вирусова А/Н5N1, относящихся к генотипам Z и V. Первая вспышка, вызванная этим геновариантом вируса, была зарегистрирована среди водоплавающей птицы весной 2005 г. на озере Цинхай, которое находится на пересечении путей миграции птиц из Южной Азии, Новой Зеландии, Австралии и Сибири. В изолятах вируса обнаружен ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности вируса для птиц отряда куриные и млекопитающих, и не обнаружены мутации, облегчающие инфицирование людей. Не были зарегистрированы реассортанты вирусов сезонного гриппа и вируса А/Н5N1. Показано, что циркулировавшие в данной эпизоотии на исследованной территории варианты вируса гриппа А/Н5N1 чувствительны к ремантадину. В материале от диких лебедей обнаружен вариант вируса, имеющий мутацию резистентности к озельтамивиру (Тамифлю).