

ПТИЧИЙ ГРИПП

УДК 619:616.98:578.832.1:636.5:616-073

А.В. Андриясов, В.В. Дрыгин

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛЕВОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ, ВЫДЕЛЕННОГО ВО ВРЕМЯ ВСПЫШКИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2005 году

Введение

Высокопатогенный грипп птиц (ВПП) является крайне контагиозным, системным вирусным заболеванием домашней и дикой птицы, вызывает высокую смертность, некробиотические повреждения, воспаления, кровотечения во внутренних органах, мозга и коже [1, 2, 4]. Гибель птицы может достигать 100%.

Возбудителем заболевания является вирус семейства Orthomyxoviridae, рода Influenzaevirus, типа А. Геном вируса представлен отрицательно заряженной РНК, состоящей из восьми сегментов, кодирующих десять вирусных белков [6]. По строению поверхностных гликопротеинов вирусы гриппа птиц (ВГП) можно разделить на 16 подтипов по гемагглютиниру (Н1–16) и 9 подтипов по нейраминидазе (N1–9). Изоляты вируса гриппа птиц существенно отличаются по патогенности. Использование термина ВПП подразумевает, что данный вирус высоковирулентен для домашней птицы и соответствует одному или нескольким критериям [4]:

а) любой вирус гриппа, вызывающий гибель 6 или более из 8 (летальность, равная 75 или более процентам) 4–8-недельных восприимчивых цыплят, в течение десяти дней после внутривенного введения 0.2 мл инфицированной аллантоисной жидкости в разведении 1:10;

б) любой вирус гриппа подтипа H5 или H7, не соответствующий первому критерию, но имеющий последовательность аминокислот на сайте разрезания гемагглютинина, схожую с таковой вирусов ВПП;

в) любой вирус гриппа другого подтипа, способный к размножению на культуре клеток без трипсина и имеющий последовательность аминокислот на сайте разре-

зания гемагглютинина, схожую с таковой вирусов ВПП.

В настоящее время напряженная ситуация по гриппу птиц наблюдается в странах на юго-востоке Азии. В Российской Федерации с июля по сентябрь 2005 года регистрировались вспышки ВПП в Сибирском, Уральском федеральных округах и Республике Калмыкия. В 2006 году зарегистрированы вспышки ВПП в 11 субъектах Южного федерального округа. В сложившейся ситуации быстрая диагностика, детектирование и типирование гриппа птиц (ГП) при вспышке является важным фактором своевременного купирования и ликвидации заболевания. Для диагностики ГП, наряду с классическими реакциями, успешно используется метод индикации и идентификации вируса на основе амплификации в ПЦР и определения первичной структуры фрагмента генома вируса, кодирующего сайт разрезания белка гемагглютинина (НА). Также это позволяет на основе первичной структуры сайта разрезания белка НА делать предположение о вирулентности исследуемого изолята вируса [2, 5].

Цель данной работы заключалась в типировании, анализе первичной структуры сайта разрезания белка НА, филогенетическом анализе изолята ВГП, выделенного во время вспышки в Новосибирской области Сибирского федерального округа в 2005 г.

Материалы и методы

Вирус. В работе был использован изолят вируса гриппа птиц — A/duck/Novosibirsk/2/2005 (H5N1), выделенный от домашней утки в июле 2005 года в Новосибирской области, Купинского района, с. Копкуль.

ПЦР и секвенирование. Суммарную

РНК выделяли, используя универсальный набор реактивов для пробоподготовки Биоком (Москва), в соответствии с инструкцией к набору.

Праймеры. Для индикации генома вируса гриппа птиц в ПЦР использовали универсальные праймеры для М гена — AIVM49F, AIVM88F, AIVM858R, AIVM941R. Для штаммовой дифференциации использовали праймеры, универсальные для генов H5 и N1 и специфические для генетической линии A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1): H5gg_125F, H5gg_1100R, aivH5_av_667F1, aivH5_av_1065R на ген HA и n1_nov_450f, n1_nov_934r, n1_nov_480f, n1_nov_912r на ген NA.

Синтез кДНК. Синтез первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса миелобластома птиц. Для реакции обратной транскрипции к 10 мкл раствора суммарной РНК добавляли реакционную смесь, содержащую 2,5 мкл 10 mM dNTP, 4 мкл 5X ревертазного буфера, 10 пмоль праймеров AIVM49F, H5gg_125F, n1_nov_450f 5 ед. фермента и воду до конечного объема 20 мкл, перемешивали и инкубировали при 42° С 30 мин. После инкубации инактивировали фермент при 95° С 3 мин. и быстро охлаждали смесь.

Аmplификация кДНК. ПЦР проводили в программируемом амплификаторе PTC-100 MiniCycler (MJ Research Inc, США).

Индикация (М ген). В 0,5 мл пробирку вносили 3 мкл раствора 1 цепи кДНК, по 10 пмоль праймеров AIVM49F и AIVM941R, 5 мкл буфера для ПЦР (10X), 6 mM MgCl₂, 1,5 мкл 10 mM dNTP, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы и воду до конечного объема 50 мкл, сверху наслаивали 50 мкл минерального масла. Проводили 35 циклов амплификации при следующих режимах: 93° С — 0,5 мин., 55° С — 0,5 мин., 72° С — 1 мин.

Для повышения чувствительности реакции, при отсутствии вирусспецифической полосы после первой ПЦР, использовали «гнездовой» вариант ПЦР с парой внутренних праймеров — AIVM88F и AIVM858R (15–25 циклов).

Дифференциация (H5 и N1 гены). В 0,5 мл пробирку вносили 3 мкл раствора 1 цепи кДНК, по 10 пмоль праймеров (H5gg_125F, H5gg_1100R, n1_nov_450f, n1_nov_934r), 5 мкл буфера для ПЦР (10X), 6 mM MgCl₂, 1,5 мкл 10 mM dNTP, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы и воду до конечного объема 50 мкл, сверху наслаивали 50 мкл минерального масла. Проводили 35 циклов амплифика-

ции при следующих режимах: 93° С — 0,5 мин., 55° С — 0,5 мин., 72° С — 1 мин.

При необходимости постановки «гнездового» варианта ПЦР использовали следующие пары внутренних праймеров aivH5_av_667F1, aivH5_av_1065R, n1_nov_480f, n1_nov_912r (15–25 циклов).

Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов “WizartTM PCR Preps DNA Purification Kit” (Promega, США).

Секвенирование кДНК. Нуклеотидную последовательность фрагментов H и N генов определяли методом прямого секвенирования амплифицированных фрагментов с помощью набора “fmol DNA Sequencing System” (Promega, США). Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет прикладных программ SeqProgs (Data handling for molecular epidemiology), версия 1.0 (N.J. Knowles, IFAN, Великобритания). Для сравнения использовали опубликованные ранее последовательности вируса птичьего гриппа (<http://www.flu.lanl.gov>).

Результаты исследований и их обсуждение

Для выявления генома вируса гриппа птиц из патологического материала была выделена РНК, которую использовали для реакций ОТ и ПЦР. Первичную индикацию на М ген проводили с праймерами AIVM49F и AIVM941R. После амплификации был синтезирован вирусспецифический фрагмент кДНК размером 892 пары нуклеотидов (п.н.). После получения положительного результата в ПЦР на индикацию генома вируса ПГ мы проводили штаммовую дифференциацию. В результате амплификации с праймерами aivH5_av_667F1, aivH5_av_1065R, n1_nov_480f, n1_nov_912r был синтезирован вирусспецифический фрагмент кДНК размером 398 п.н. (H5 ген) и 432 п.н. (N1 ген).

Проведение определения и сравнительный анализ первичной структуры амплифицированных фрагментов кДНК показало, что исследованная проба содержала фрагменты генома полевого изолята вируса гриппа птиц. Определенная первичная структура сайта разрезания белка HA данного изолята имела вид PQGRERRRRKKR*GLF. Это позволило нам предположить, что исследуемый изолят вируса гриппа птиц может относиться к группе высокопатогенных штаммов вируса ГП.

Далее мы проводили сравнение полученных последовательностей с последовательностями гена гемагглютинаина подти-

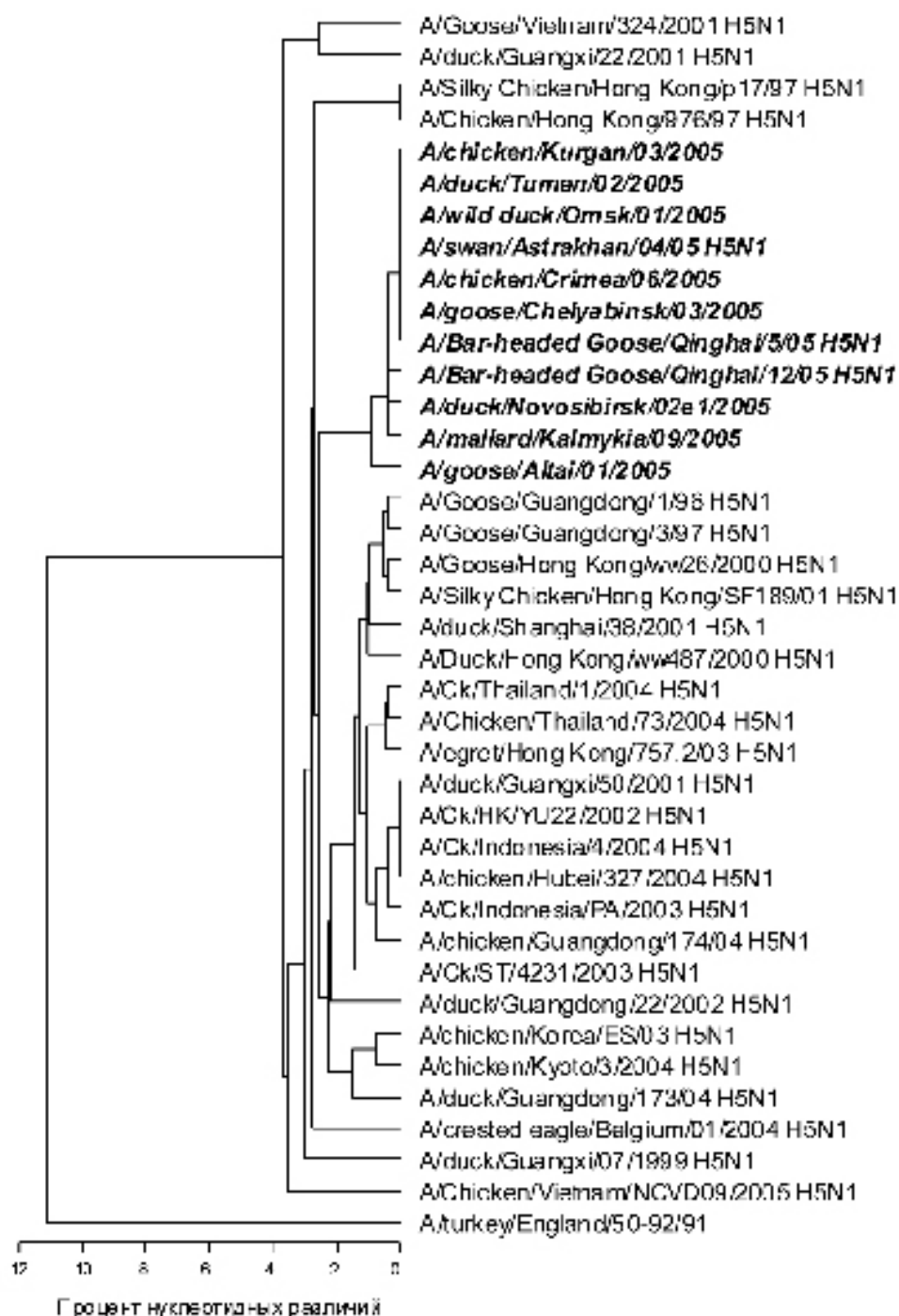


Рисунок 1. Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена H5 (802–1074 н.) штаммов и изолятов ВГП генетической линии A/Goose/Guangdong/1/96. Жирным шрифтом и курсивом выделены названия изолятов подгруппы Qinghai.

па H5 и гена нейраминидазы подтипа N1 из банка данных “Flu. The Influenza Sequence Database” (<http://www.flu.lanl.gov/>). Было установлено, что гемагглютинин выделенного изолята принадлежит к подтипу H5, а нейраминидаза к подтипу N1 обшир-

ной линии изолятов ВГП A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1), выделенных на территории Юго-Восточной Азии (включая Индонезию) и Китая, начиная с 1996 г. и по настоящее время (рис. 1, 2).

Ближайшими аналогами российско-

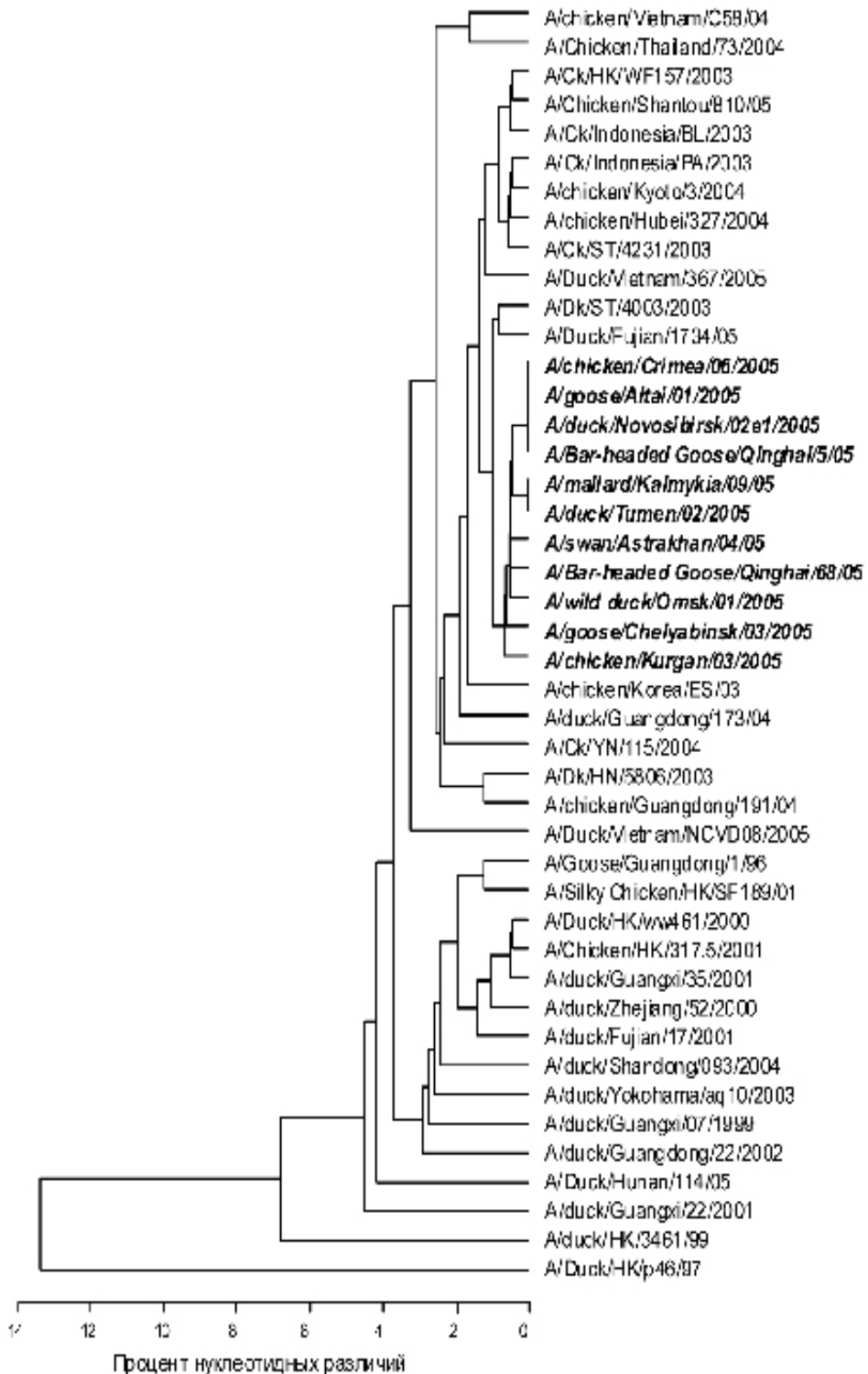


Рисунок 2. Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена N1 (598–849 н.) штаммов и изолятов ВГП генетической линии A/Goose/Goangdong/1/96. Жирным шрифтом и курсивом выделены названия изолятов подгруппы Qinghai.

го изолята являются вирусы ГП, выделенные в мае 2005 г. во время вспышки у дикой

водной птицы (гуси, чайки) [озеро Qinghai в одноименной провинции КНР (северо-

восток Тибета)] [3]. Консенсусные последовательности изолятов Qinghai исследуемого вируса ГП A/duck/Novosibirsk/2/2005 (H5N1) и других российских изолятов совпадают полностью. Отдельные изоляты (как китайские, так и российские) могут нести 1–2 аминокислотные и 2–3 нуклеотидные замены, причем для российских изолятов можно предполагать корреляцию наличия определенных замен с географическим местом выделения вируса.

Обращает внимание то, что озеро Qinghai расположено значительно западней районов Китая, где ВГП H5N1 регистрировался до этого. Можно предположить, что эта вспышка и случаи заболевания ВППП на юге Западной Сибири связаны с миграцией из Южного Китая диких перелетных водоплавающих птиц в северо-западном направлении по Центрально-Азиатскому миграционному пути, пересекающему Новосибирскую область. Анализ случаев заражения ГП домашней и дикой птицы в Новосибирской области показывает, что все населенные пункты, в которых ре-

гистрировались вспышки заболевания, находятся около водоемов, озер, водохранилищ, рядом с реками. Именно здесь происходила передача вируса от диких представителей околотовной фауны к домашним водоплавающим птицам.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что изученный изолят вируса гриппа птиц A/duck/Novosibirsk/2/2005 относится к подтипу H5N1, обладает структурой сайта разрезания PQGRERRRKKR*GLF и относится к единой генетической группе штаммов из юго-восточной части Азии. Определенная структура сайта разрезания белка гемагглютинаина позволяет нам предположить, что он относится к группе высокопатогенных штаммов вируса ГП. Однако, для постановки окончательного диагноза и определения биологических свойств изученного изолята вируса гриппа птиц необходимо проведение тестов на патогенность с использованием чувствительных систем.

РЕЗЮМЕ

При постановке ПЦР с последующим генетическим анализом нуклеотидных последовательностей фрагментов генов H5 и N1 было установлено, что исследуемый изолят вируса гриппа птиц обладает структурой сайта разрезания PQGRERRRKKR*GLF, характерной для вирусов высокопатогенного гриппа птиц, и относится к генетической группе штаммов вируса гриппа птиц из юго-восточной части Азии.

ABSTRACT

PCR with subsequent genetic analysis of H5 and N1 gene fragment nucleotide sequences showed that the examined isolate had the structure of the PQGRERRRKKR* cleavage site characteristic of highly pathogenic avian influenza viruses and belonged to genetic group of South-Eastern Asia influenza viruses.

Литература

1. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных. М.: ВНИИТиБП, 1998. С. 324–336.
2. D.J. Alexander. Orthomyxovirus infections // Virus infections of birds. Amsterdam etc., 1993. P. 287–316.
3. H. Chen, G.J. Smith, S.Y. Zhang et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl // Nature. 2005. V. 436, № 7048. P. 191–192.
4. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, adopted 05.2005.
5. D.E. Swayne. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza viruses for chickens // Vet. Pathol. 1997. V. 34. P. 557–567.
6. D.E. Swayne, D.A. Halvorson. Influenza // Diseases of poultry. 11th ed. Ames, Iowa, 2003. P. 135–160.

УДК 619:578.832.1:636.5.004.12

И.А. Чвала, В.В. Дрыгин

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТА ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/DUCK/NOVOSIBIRSK/2/2005 H5N1

Введение

Высокопатогенный грипп птиц — острая контагиозная вирусная инфекция домашних и диких птиц, характеризующаяся общим угнетением, отеками, множес-

твенными кровоизлияниями и поражением внутренних органов, мозга и кожи [2, 4, 6]. Гибель птицы, особенно молодняка, может достигать 100%. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий