

Воронина Анна Георгиевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ЧЛЕНИСТОНОГИХ ПЕРЕНОСЧИКОВ
ДЕЛЬТЫ ВОЛГИ И ВОЛГО-АХТУБИНСКОЙ ПОЙМЫ ВИРУСОМ ЗАПДНОГО
НИЛА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ
LEIV-Ast00- 986-human И LEIV-Vlg99-27889-human ВЗН.**

03 00 03 -молекулярная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2005

Работа выполнена в НИИ Вирусологии имени Д И Ивановского
Российской Академии Медицинских наук

Научный руководитель
Кандидат биологических наук Алексей Геннадьевич Прилипов

Официальные оппоненты
Доктор биологических наук, профессор Мансур Мухамедович Гараев
Доктор биологических наук, профессор Вадим Викторович Месянжинов

Ведущая организация НИИ эпидемиологии и микробиологии им Н Ф Гамалеи РАМН

Защита состоится « 20 » июня 2005 г в 12 00 часов на заседании Специализированного
совета Д 001 020 01 при Институте Вирусологии им Д И Ивановского РАМН по адресу
123987, Москва, ул Гамалеи, д 16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Вирусологии
им Д И Ивановского РАМН

Автореферат разослан «20» мая 2005 г

Ученый секретарь диссертационного совета – д м н Н П Косякова

2006-4
6711

3

ВВЕДЕНИЕ.

2145323

Актуальность проблемы.

Эпидемические вспышки лихорадки Западного Нила (ЛЗН) различного масштаба и интенсивности регистрируются практически каждый год в странах Африки и Ближнего Востока, реже в Европе и Индии, иногда в Средней Азии (Львов, 2000; Murgue et al., 2002).

Обширная эпидемическая вспышка ЛЗН возникла в июле-октябре 1996 г в Юго-Восточной Румынии в южном течении Дуная. Заболеваемость достигла 12,4 на 100 тыс и охватила 7 областей, включая Бухарест

Вспышки лихорадки Западного Нила описывались в Израиле в период с 1950 по 1970 гг, однако продолжающиеся по сей день серологические и эпидемиологические исследования показывают, что циркуляция вируса в этом регионе продолжается (Hindiyeh, 2001)

Эпидемическая вспышка ЛЗН совершенно неожиданно возникла в конце июля-сентября 1999г с пиком во второй половине августа в Нью-Йорке и его окрестностях (Lancotti et al., 1999). В общей сложности выявлено 56 случаев (31 подтвержден лабораторно), из которых 7 с летальным исходом (12,5%) Вирус обнаружен в комарах *Culex ripiens*, отловленных в сентябре-октябре в Нью-Йорке, и округах Нассау и Суффолк, а с помощью ПЦР положительный результат получен с комарами *Culex spp* и *Aedes vexans*, собранных в середине сентября в округе Хадсон, Нью-Джерси С помощью ПЦР положительные результаты получены при обследовании мозга погибших птиц из Нью-Йорка (Бронис, Бруклин, Манхэттен, Квинс, о Статен, а также из округов Нассау,Оранж,Рокленд,Саратога,Суффолк и Вестчестер), в штате Нью-Джерси (12 округов), в штате Коннектикут (три округа) (Ebel, 2001) (Lanciotti, 2002)

Начиная с 1999 г существенно обострилась эпидемическая ситуация по лихорадке Западного Нила (ЛЗН) на юге России (Lvov, 2004).



Возникшие в последние 4 года на юге России вспышки лихорадки Западного Нила, свидетельствуют о приоритетной значимости проблемы новых и возвращающихся инфекций в системе биобезопасности (Львов, 2000).

В связи с широким распространением заболевания возникает необходимость исследования причин. Все это обусловило необходимость разработки программы комплексного изучения природных и синантропных очагов инфекции.

Инфекция ЛЗН относится к природно-очаговым зоонозам поскольку имеет выраженный очаговый характер (Львов и др., 1989). Природная циркуляция вируса ЗН в очаге происходит в системе «птицы – комары – птицы», при этом комары также эффективно заражают и других теплокровных, в том числе человека. Зараженность вирусом ЗН комаров является важным показателем активности природного очага и позволяет прогнозировать развитие эпидемической ситуации.

Молекулярные механизмы патогенеза вируса ЗН остаются малоизученными. Для улучшения понимания этих механизмов является необходимой работа по изучению природных вариантов вируса и их сравнению друг с другом, что при наличии данных об инфекционности различных штаммов вируса, позволит предполагать о значимости тех или иных последовательностей в геноме вируса ЗН.

Цель и задачи работы.

Целью данной работы явилась разработка молекулярно-биологических подходов к обследованию полевых материалов и оценка эпидемической ситуации распространенности вируса ЗН в дельте Волги и Волго-Ахтубинской пойме.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи

Задачи.

- Определение полноразмерной нуклеотидной последовательности штаммов LEIV-Ast00-986-human и LEIV-Vlg99-27889-human вируса ЗН, выделенных во время эпидемических вспышек 1999г и 2000г., с целью использования этих данных при дизайне праймеров для ОТ-ПЦР диагностической тест-системы
- Разработка ОТ-ПЦР системы для чувствительной и специфичной детекции РНК вируса ЗН в биологических образцах
- С использованием разработанной ОТ-ПЦР системы исследовать пробы полевого материала (комары и клещи), собранные в местах вспышки ЛЗН (дельта Волги и Волго-Ахтубинская пойма в 2001-2004гг), на наличие в них РНК вируса Западного Нила, определение процента зараженности переносчиков
- Нуклеотидный анализ фрагментов геномов вируса ЗН из проб полевого материала. На основании полученных нуклеотидных последовательностей с целью проведения филогенетического анализа и определения генетических характеристик выделенных штаммов вируса ЗН, циркулирующих в популяциях переносчиков в период вспышек 2001-2004гг

Положения, выносимые на защиту

- Полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов вируса ЛЗН LEIV-Ast00-986-human и LEIV-Vlg99-27889-human.
- Разработка и оптимизация ОТ-ПЦР тест-системы для обнаружения РНК вируса ЗН в полевых образцах.

- Определение общего и видового процента зараженности вирусом ЗН комаров и клещей, обитающих в дельте Волги
- Типирование штаммов ЗН, циркулировавших среди переносчиков в период вспышек 2001-2004г с помощью филогенетического анализа фрагментов РНК

Научная новизна и практическая ценность работы.

В результате проведенной работы были определены полные нуклеотидные последовательности геномов двух штаммов вируса, выделенных на территории Астраханской и Волгоградской областей, предоставленных институтом вирусологии им Д И Ивановского

Созданная в процессе работы ОТ-ПЦР гест-система является высокочувствительной и достаточно проста в применении, что позволит использовать эту систему непосредственно в местах сбора полевого материала Разработанная тест-система способна детектировать РНК вируса ЗН, относящиеся ко всем четырем филогенетическим группам Таким образом это обеспечило максимально возможную, на данный момент, универсальность тест - системы Разработанная тест – система «Способ обнаружения вируса лихорадки Западного Нила» защищена патентом РФ №2199589 от 27 02 2003 (авторы изобретения: Воронина А Г , Прилипов А Г , Львов Д К , Самохвалов Е И , Садыкова Г К , Альховский С В ,)

Впервые в России проведено масштабное исследование зараженности вирусом ЗН членистоногих переносчиков в природных очагах дельты Волги и Волго – Ахтубинской поймы с использованием ПЦР Всего обследовано 284308 комаров и 7303 клещей, собранных как в диких, так и в антропогенных биоценозах за 2001-2004гг Согласно полученным результатам, средний уровень зараженности вирусом ЗН за 2001-2004гг среди комаров - 0,028%, среди клещей - 0,74% Также, в результате филогенетического анализа положительных ПЦР-фрагментов, были сделаны выводы относительно групповой принадлежности обнаруженных штаммов вируса ЗН Нами было определено, что на обследуемой территории

циркулировали 79 штаммов (91,86%) относящихся к I-му генотипу, 4 штамма (4,65%) – ко II генотипу, ни одного к III, и 3 штамма (3,49%) относятся к IV генотипу

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на совместном заседании отдела молекулярной вирусологии и апробационного совета ГУ НИИ вирусологии им Д И Ивановского РАМН 18 мая 2005 г. в 12 00 часов.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи, тезисы 2-х докладов в материалах российских конференций, в GenBank депонированы полноразмерные нуклеотидные последовательности 2-х штаммов вируса ЗН, получен патент «Способ обнаружения вируса лихорадки Западного Нила» РФ №2199589 от 27 02 2003 (авторы изобретения Воронина А Г , Прилипов А Г , Львов Д К , Самохвалов Е И , Садыкова Г К , Альховский С В ,)

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 113 страницах машинописного текста Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, включающего в себя 135 источников Работа иллюстрирована 14 таблицами и 13 рисунками

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследуемые штаммы Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human, выделенные во время эпидемических вспышек 1999г и 2000г, были получены из коллекции института Вирусологии им Д И Ивановского

Полевой материал был собран в летне-осенний период 2001-2004 г г в дельте Волги и Волго-Ахтубинской пойме Сбор комаров осуществлялся с

помощью автоматического заплочного аспиратора и световых ловушек Хранили и транспортировали собранные пробы в жидком азоте Для дальнейшего обследования пулы комаров гомогенизировали в 199 среде с добавлением BSA Затем пробы помещали на -70°C Каждый пул содержал 4-100 комаров.

Исследование зараженности вирусом ЗН собранного полевого материала проводилось с использованием ОТ-ПЦР для выявления вирусной РНК

Подбор праймеров для детекции вируса ЗН методом ОТ-ПЦР проводили с использованием нуклеотидных последовательностей различных изолятов вируса ЗН, доступных в базе DDBJ/EMBL/GenBank К началу проведения работ в доступных нам базах данных были обнаружены четыре полноразмерные нуклеотидные последовательности: Кунджин MRM61C (GenBank #D00246), WN-Wengler (GenBank #M12294) и два штамма HNY-99 (GenBank #AF260869), NY99-flam (GenBank #AF196835) (Табл 1) Также использовались полноразмерные последовательности штаммов Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human, полученные нами в ходе работы

Таблица 1. Полноразмерные нуклеотидные последовательности вируса ЗН, опубликованные в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank.

Название	Год изоляции	Материал	Место изоляции	<u>GenBank</u> <u>ID</u>
WNFCG	1957	Человек	Уганда	M12294
KUNMRM61C	1960	<i>Culex annulirostris</i>	Австралия	D00246
HNY-99	1999	Человек	США	AF260969
NY99-flam	1999	<i>Phoenicopterus chilensis</i> (Chilean flamingo)	США	AF196835

При амплификации и структурном анализе исследуемых штаммов Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human мы использовали праймеры,

подобранные на основе анализа полноразмерных нуклеотидных последовательностей, имевшихся в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank. Определение нуклеотидной последовательности выделенных фрагментов производили на автоматическом секвенаторе фирмы “Applied Biosystems” согласно инструкциям фирмы – изготовителя. При работе с нуклеотидными последовательностями использовали пакет программ “DNASTAR V 3.12”, производства “Lasergen Inc.” (Madison, WI). Подбор праймеров проводили с использованием программ “Megalign” и “Amplify”. Сравнение нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили методом ClustalW с помощью программы “Megalign”.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

1. Определение полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов штаммов вируса ЛЗН Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human.

Нами были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности штаммов вируса Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human, выделенные во время эпидемических вспышек 1999г и 2000г в Волгоградской и Астраханской областях. Для проведения этих исследований необходимым условием явился подбор оптимальных праймеров для амплификации фрагментов генома вируса ЗН. С этой целью было проведено сравнение полноразмерных нуклеотидных последовательностей штаммов вируса ЗН, опубликованных в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank, с использованием пакета компьютерных программ DNASTAR. К началу нашего исследования полноразмерные нуклеотидные последовательности были известны только для четырех изолятов вируса ЗН: Кунджин MRM61C (GenBank #D00246), WN-Wengler (GenBank #M12294) и двух штаммов HNY-99 (GenBank #AF260869), NY99-flam (GenBank #AF196835), выделенных в 1999 г в Нью-Йорке (Табл. 1). Также нужно

отметить, что в базе данных не было опубликовано ни одного отечественного изолята.

В результате проведенного анализа были определены участки нуклеотидной последовательности, которые соответствовали сформулированной задаче и отличались значительной степенью гомологии (до 100 %) среди всех четырех штаммов вируса ЗН. Выбранные консервативные участки в 3' области генома и в первой трети 5' конца использовали для конструирования праймеров. В результате были выбраны праймеры (3594R, 10960R), которые мы использовали для получения кДНК. Полученные препараты кДНК хранили на -70°C в отдельных аликвотах. Препараты кДНК использовали в реакциях ПЦР с экспериментальными праймерами, комплементарными наиболее консервативным областям генома вируса ЗН. Таким образом было получено 11 (для штамма LEIV-Vlg99-27889-human) и 9 (для штамма LEIV-Ast00-986-human) перекрывающихся фрагментов генома вируса ЗН, которые содержали полную нуклеотидную последовательность генома (Рис 1). На рисунке отражена стратегия определения полной нуклеотидной последовательности наших штаммов. В центре рисунка – схематичное расположение геномной вирусной РНК (11 kb). Стрелки указывают расположение на геноме праймеров для получения кДНК. В верхней части рисунка расположены фрагменты, полученные для штамма LEIV-Ast00-986-human, в нижней части рисунка расположены фрагменты, полученные для штамма LEIV-Vlg99-27889-human. Пунктиром изображены фрагменты, полученные при амплификации кДНК, синтезированной с праймера 3594R. Сплошной линией изображены фрагменты, полученные при амплификации кДНК, синтезированной с праймера 10960R. Над фрагментами обозначены номера праймеров, использованных при амплификации.

В результате этих экспериментов впервые были получены полные нуклеотидные последовательности геномов вирусов, выделенных на территории нашей страны (accession AY277252, AY278441).

Полученные нуклеотидные последовательности мы использовали для определения филогенетического положения этих штаммов. С этой целью было построено филогенетическое древо (методом ClustalW с помощью программы “Megalign”) с известными к тому моменту 13 последовательностями. Как следует из представленных данных (Рис.2) оба российских штамма принадлежат к I группе.

Таким образом, были получены полноразмерные нуклеотидные последовательности штаммов вируса Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human, и эти данные в дальнейшем были использованы нами для дизайна праймеров для диагностической тест-системы.

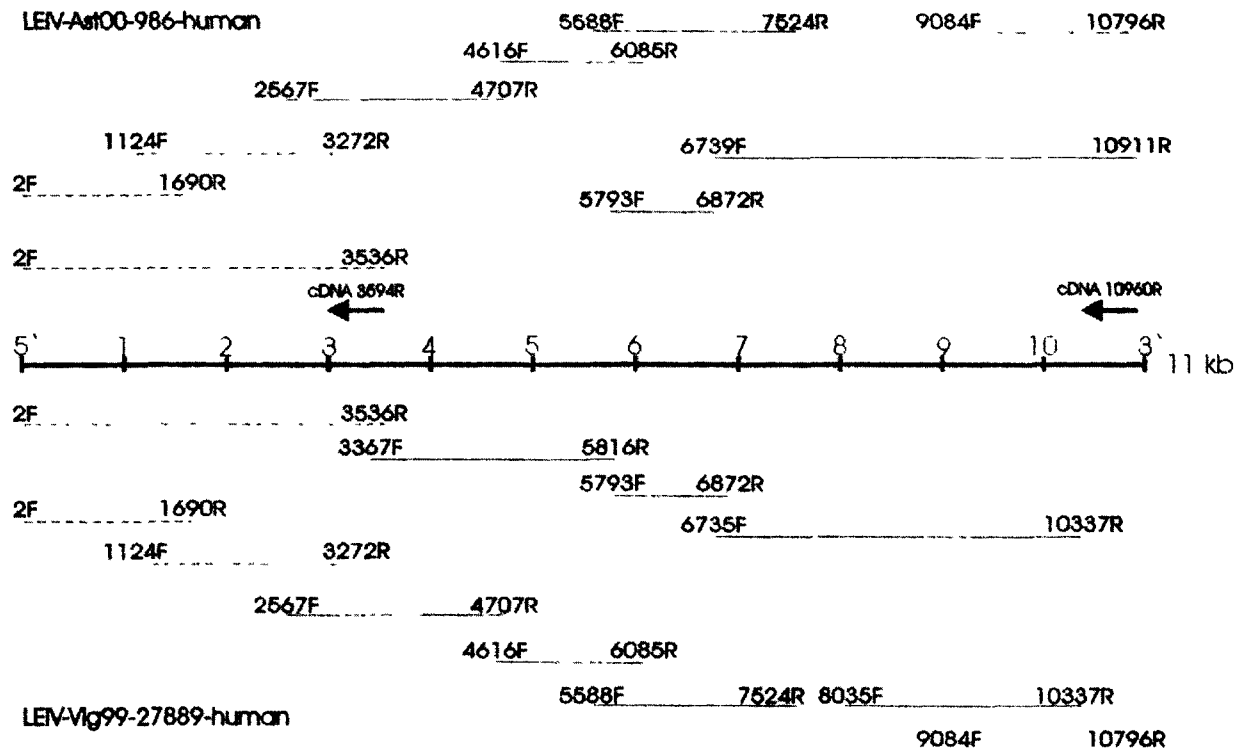


Рис. 1. Стратегия определения полной нуклеотидной последовательности штаммов вируса 3H Ast00-986-human и LEIV-Vlg99-27889-human (пояснения в тексте)

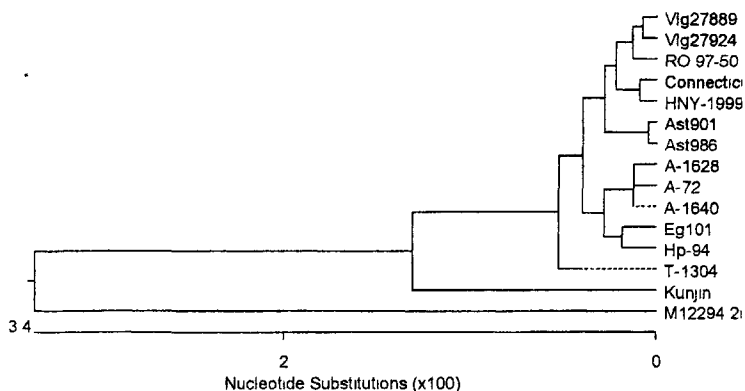


Рис 2 Сравнительный филогенетический анализ полученных последовательностей между собой, с имеющимися в GenBank данными, а также с другими штаммами вируса ЗН из коллекции института вирусологии. Штамм LEIV-Vlg99-27889-human обозначен на рисунке как Vlg27889 и штамм LEIV-Ast00-986-human обозначен как Ast986.

2. Создание ОТ-ПЦР тест системы для обнаружения РНК вируса ЗН в клинических образцах и пробах полевого материала

Учитывая вариабельность генома вируса ЗН, при его обнаружении необходимо использовать праймеры, соответствующие наиболее консервативным участкам вирусного генома, которые совпадают по нуклеотидной последовательности в штаммах вируса ЗН, принадлежащих к различным филогенетическим группам. В связи с этим, для поиска консервативных областей были использованы нуклеотидные последовательности по всей длине генома для вируса ЗН, EMBL accession AF196835, D00246, M12294, NC_001563, AF206518, AF202541, а также последовательности российских изолятов, включая штаммы LEIV-Ast00-986-human и LEIV-Vlg99-27889-human, ранее депонированные нами в базу данных GenBank. Анализ консервативных областей проводился на компьютере с помощью программы Megalign (DNASTAR). В результате было установлено, что наиболее консервативные участки локализованы в 5'-

нетранслируемой области, а также области генов *core* и *pre-M* (Рис 3) Поиск праймерных последовательностей, проведенный с помощью программ “Megalign” и “Amplify” позволил отобрать четыре последовательности, пригодных для синтеза соответствующих праймеров Структуры праймеров приведены в табл 2

Таблица 2 Праймеры, подобранные для детекции вируса ЗН методом ОТ-ПЦР (полу-гнездовой способ)

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина (н о)	Место посадки (позиция на геноме)	Расчетная температура отжига (°C)
<u>1F</u>	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGA	23	1 – 23 (5'НТР)	73,1
<u>26F</u>	AACCTTAGTAGTGTTTGTGAGGA	22	26 – 47 (5'НТР)	65,8
<u>518R</u>	TCAGTAGCATTTACCGTCATCAT	23	496-518 (preM)	68,7
<u>626R</u>	GGGCATTCCATAAGTGATAGTATC	23	604-626 (preM)	68,7

Подобранные праймеры были использованы для постановки ОТ-ПЦР в полу-гнездовом варианте На первом этапе с помощью праймера 626R получали кДНК, затем проводили I раунд амплификации с помощью праймеров 518R и 1F, при этом образовывался фрагмент размером 518 н о На втором этапе проводили II раунд ПЦР с использованием праймеров 26F и 518R В результате получался ампликон длиной около 500 н о Продукты ПЦР идентифицировались в агарозном геле

Для определения чувствительности обнаружения генома вируса ЗН с помощью отобранных праймеров использовали препараты вируса ЗН LEIV-Ast989 С этой целью препарат вируса ЗН LEIV-Ast989 раститровывали в ростовой среде и использовали для одновременной идентификации вируса предложенным методом ОТ-ПЦР и определением БОЕ препарата на культуре клеток Vero E6

Анализ ампликонов проводили как после первого, так и после второго раунда ПЦР. Результаты анализа представлены на рисунке 3б-в. Как следует из приведенных данных, после первого раунда ПЦР чувствительность системы составила 10^4 БОЕ/мл исходной вирусной суспензии или $2 \cdot 10^3$ БОЕ в ПЦР пробирке. После второго раунда амплификации чувствительность ПЦР повысилась на три порядка, что составляет 50 БОЕ/мл исходной вирусной суспензии или 10 БОЕ в ПЦР пробирке. Таким образом, чувствительность системы составила 50 БОЕ/мл.

Специфичность разработанной ОТ-ПЦР была определена с использованием различных вирусов, хранящихся в государственной коллекции вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Среди них были представители флавивирусов (вирусы желтой лихорадки (ЖЛ), японского энцефалита (ЯЭ), клещевого энцефалита (КЭ), денге (Ден)), альфавирусов (вирус Синдбис (Син)) и буньявирусов (вирусы Тягина (Тяг), Крымско - Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ)). На рис. 3а представлены результаты тестирования ОТ-ПЦР тест-системы с перечисленными вирусами. Ни в одном случае использования в качестве матрицы РНК вирусов, отличных от вируса ЗН, специфического продукта амплификации не наблюдали.

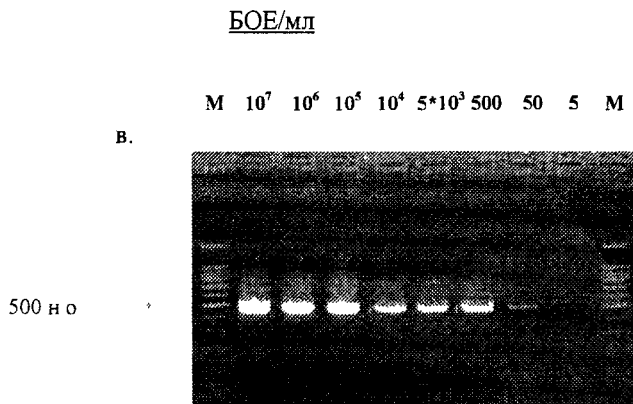
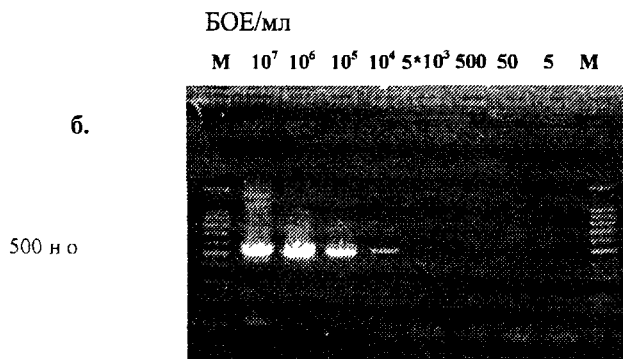
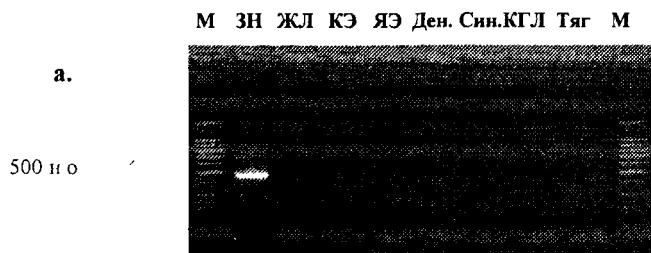


Рисунок 3 Определение специфичности и чувствительности разработанной ОТ-ПЦР тест – системы (полу-гнездовой метод) а Результаты тестирования ОТ-ПЦР системы с различными вирусами (объяснения в тексте) б, в Результаты тестирования в ОТ-ПЦР разведений штамма Ast986 после I-го (б) и II-го (в) раунда ПЦР Над лунками указан соответствующий титр вируса

Представляло интерес также проверить разработанную тест-систему на способность выявлять РНК вируса ЗН всех четырех известных к настоящему моменту генотипов вируса ЗН (Рис 4) Реакция ПЦР проводили с музейными штаммами, представляющими все четыре генотипа Для проведения эксперимента использовали в качестве представителя первой группы вируса ЗН LEIV-Vlg99-27889-human; второй группы вируса ЗН. LEIV-Ukr80-3266-rook ; третьей группы вируса ЗН Ig2266, четвертой группы вируса ЗН LEIV-Krnd88-190-ticks , титр 50 БОЕ/мл Как следует из представленных данных, все четыре группы эффективно амплифицировались в разработанной нами ОТ-ПЦР тест-системе

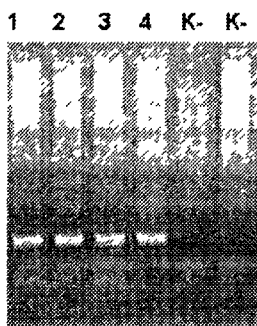


Рис 4 Проверка тест-системы с четырьмя различными генотипами ВЛЗН 1 - LEIV-Vlg99-27889-human; 2 - LEIV-Ukr80-3266-rook 3 - Ig2266; 4 - LEIV-Krnd88-190-ticks.

Таким образом, на данном этапе работы была разработана высокоспецифичная и чувствительная ОТ-ПЦР тест-система для для детекции всех известных генотипов вируса Западного Нила Определенная нами чувствительность системы как 50 БОЕ/мл является достаточной для исследований, связанных с детекцией вируса ЗН в биологических образцах

Вместе с этим, высокая специфичность и универсальность позволяют рассматривать разработанную тест-систему как методический инструмент, который может использоваться и в диагностических целях

Лабораторная модификация тест-системы

В связи с тем, что работы проводились с такими биологическим и объектами, как комары (малая биомасса, низкая концентрация РНК в пробах), при использовании вышеописанной системы мы получали большое количество неспецифических продуктов амплификации (рис 5). Для устранения подобного рода артефактов возникла необходимость адаптации тест-системы к объекту исследования. Нами были использованы два приема, типичные для подобных случаев: переход от полу-гнездовой системы к гнездовой; сдвиг кДНК-праймера дистальнее от 5'-конца на 30 н.о

Мы подобрали праймеры, несколько отличные от используемых ранее (Табл 3)

Таблица 3 Праймеры, подобранные для детекции вируса ЗН методом ОТ-ПЦР (гнездовой способ)

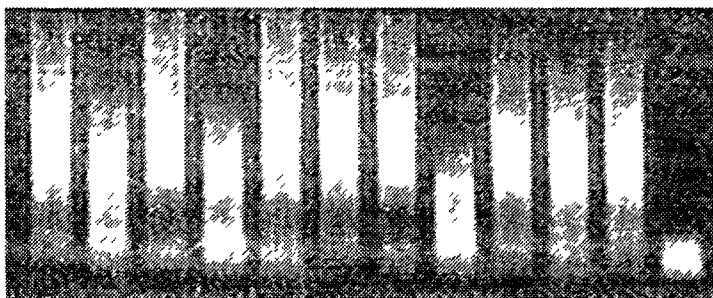
Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина	Место посадки (позиция на геноме)	Расчетная температура отжига (°C)
<u>2F</u>	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGA	23	1 – 23 (5'НТР)	73,1
<u>26F</u>	AACTTAGTAGTGTTTGTGAGGA	22	26 – 47 (5'НТР)	65,8
<u>326F</u>	GCTGTTTGTTTGTTACACCTCTCCA	26	326-352	77
<u>518R</u>	TCAGTAGCATTTACCGTCATCAT	23	496-518 (preM)	68,7
650R	GGGCATTTCATAAGTGATAGTATC	23	627-650 (preM)	68,7

Полученная тест-система была апробирована на полевом материале (комары и клещи). Результаты сравнительного опыта приведены на рисунке 5. Как

следует из приведенных данных, мы видим, что , при использовании модифицированной системы (Рис 5а) значительно сокращается количество неспецифических продуктов амплификации



а)



б)

Рис 5 Сравнение гнездовой (а) и полу-гнездовой (б) ПЦР тест-систем в типичном опыте
На наличие РНК вируса ЗН тестировались пулы комаров

Таким образом, в результате проведенных исследований созданы два варианта тест-системы, позволяющие достоверно детектировать РНК вируса ЗН как в теплокровных, так и в членистоногих.

3. Исследование комаров и клещей дельты Волги и Волго-Ахтубинской поймы на наличие вируса ЗН при помощи ОТ-ПЦР системы.

Для определения наличия РНК вируса Западного Нила в пробах полевого материала, мы использовали ОТ-ПЦР тест систему, гнездовой вариант (лабораторная модификация) Так как для амплификации

использовали пулы комаров, содержащих 4-100 особей, то, при получении положительного результата, мы считали, что в данном пуле находится по крайней мере одна особь, инфицированная вирусом ЗН. Всего были обследованы 289782 комаров, собранных в период с 2001 по 2004гг, и 7303 клещей, собранных в 2002-2003 гг. Суммарные результаты анализа представлены в таблице 4 и на рисунке 6.

Таблица 4 Анализ зараженности членистоногих переносчиков вирусом ЗН в период 2001-2004гг

Год сбора материала/ анализа материала	Кол-во особей	Кол-во «+» особей	Процент зараженности
2001/2002	19425 комаров	5 комаров	0,026%
2002/2003	77419 комаров 4563 клещей	34 комаров 49 клещей	0,043% 1,073%
2003/2004	113082 комары 2740 клещей	18 комаров 5 клещей	0,015% 0,18%
2004/2004 (перезимовавшие)	76647 комаров	36 комара	0,047%
ИТОГО.	289782 комаров 7303 клещей	93 комаров 54 клещи	0,032% 0,740%

Сопоставляя полученные данные (табл 4, рис 6) о зараженности комаров в дельте Волги и Волго-Ахтубинской пойме с аналогичными данными для других регионов земного шара, можно сделать вывод о высокой активности циркуляции вируса ЛЗН среди членистоногих, обитающих в этом регионе. Итого процент зараженности членистоногих переносчиков (комаров) за 2001 г - 0,025%, за 2002 г - 0,043%, за 2003 г. - 0,015%, за 2004 г - 0,047, (рис 6) клещей за 2002 г - 1,073%, за 2003г. - 0,18%. Средняя величина процента зараженности за весь изучаемый период 2001-2004 гг. составила для комаров-0,018%, клещей-0,74%.

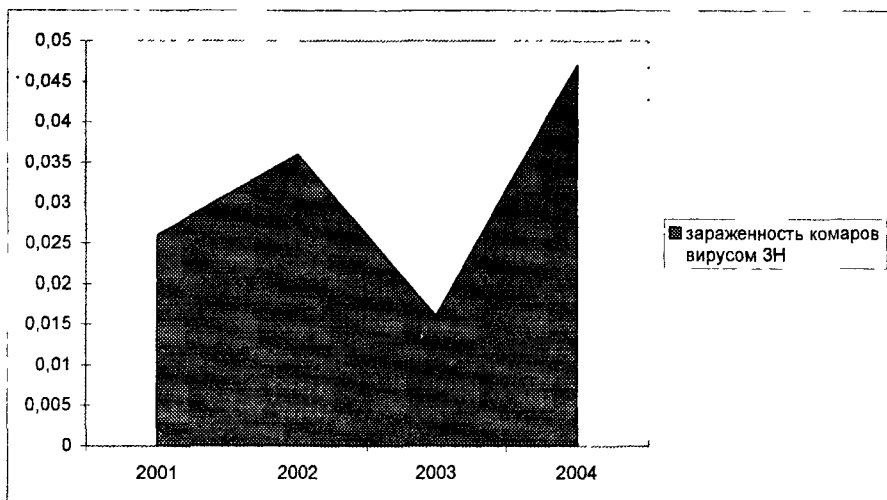


Рис 6 Зараженность вирусом ЗН комаров в дельте Волги и Волго-Ахтубинской пойме за 2001 – 2004гг. По оси абсцисс – зараженность комаров (%), по оси ординат – годы.

Как следует из представленного графика (рис.6), наблюдается существенное колебание в значении инфицированности по годам. Однако причины, приводящие к этим изменениям, остаются неясными.

4. Анализ зараженности видового состава комаров

Среди обследованных 289782 комаров было обнаружено 9 видов, собранных как в диких, так и в антропогенных биоценозах, в то время как все собранные и проанализированные пулы клещей были представлены только одним видом – *Hyalomma marginatum*.

Таблица 5 Видовой состав и зараженность комаров за 2001-2004 гг.

Вид	Собрано особей				
	2001	2002	2003	2004	всего за период 2001-2004 г.
<i>Aedes caspius</i>	0	0	320 -*)	1/600 -*)	1/920 -*)
<i>Aedes flavescens</i>	0	0	0	38 -*)	38 -*)
<i>Aedes vexans</i>	0	0	100 -*)	600 -*)	700 -*)
<i>Anopheles hyrcanus</i>	2450 -*)	8/27135 (0,026%)	8/21813 (0,037%)	2/11700 (0,017%)	18/63098 (0,028%)
<i>Anopheles messeae</i>	395 -*)	13/29460 (0,044%)	3/32089 (0,010%)	11/28183 (0,052%)	27/88127 (0,031%)
<i>Coquillettidia richiardii</i>	4/4880 (0,080%)	2/6700 (0,030%)	7/46907 (0,015%)	13/21300 (0,061%)	26/79787 (0,033%)
<i>Culex modestus</i>	1/11200 (0,009%)	3/8596 (0,035%)	1683 -*)	600 -*)	4/22079 (0,018%)
<i>Culex pipiens</i>	500 -*)	8/21585 (0,046%)	9850 (<0,01)	8/13622 (0,058%)	16/45457 (0,035%)
<i>Culiseta annulata</i>	0	0	0	1/4 -*)	1/4 -*)
9 видов	5/19425 (0,026%)	34/93476 (0,036)	18/112762 (0,016%)	36/76647 (0,047%)	93/289782 (0,032%)

*) – процент зараженности не подсчитывался в связи с незначимостью выборки

Суммированные данные по видовому составу и зараженности комаров представлены в таблице 5

Анализ полученных данных (Табл 5, рис.7) показал, что уровень зараженности комаров различных видов является сравнимым (от 0,018% до 0,035%) и мы не можем утверждать о предпочтительности заражения вирусом ЗН какого-либо вида

Необходимо отметить, что, из-за крайне небольшой выборки комаров видов *Aedes vexans*, *Aedes flavescens* и *Aedes caspius*, мы не можем сделать достоверный вывод о реальной зараженности комаров этих видов. Тем не менее, в отношении комаров вида *Aedes caspius* можно предположить, что

они, по-видимому, способны являться переносчиками вируса ЗН, так как при анализе пулов комаров этого вида были обнаружены инфицированные особи (табл.5)

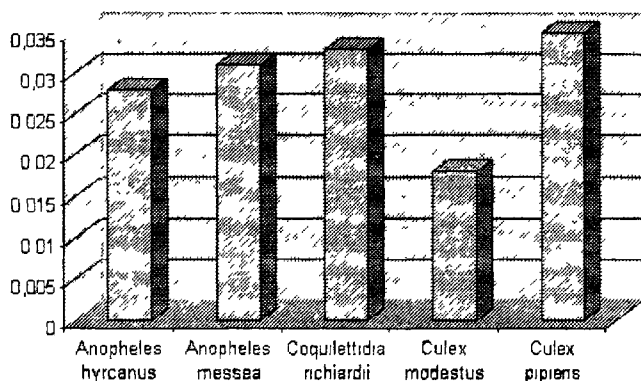


Рис 7 Зараженность вирусом ЗН различных видов комаров за период 2001 – 2004 гг.

5. Нуклеотидный и филогенетический анализ 5'-концевой области генома вируса ЗН у полевых изолятов .

Для 86 проб из 147, дававших положительный сигнал в ОТ-ПЦР, была определена частичная нуклеотидная последовательность. Сопоставление этих последовательностей с данными литературы позволило установить, что во-первых все положительные ПЦР – пробы содержали действительно фрагмент последовательности вируса ЗН и не являлись ложноположительными результатами ПЦР-анализа, во-вторых практически все последовательности хотя бы минимально отличаются друг от друга, что указывает на их независимый первичный источник и отсутствие контаминации при проведении молекулярно-биологических манипуляций с материалом, В-третьих впервые показано на пробах полевого материала (пулы комаров и клещей) возможность разработанной ранее ОТ-ПЦР тест-системы выявлять наличие РНК вариантов вируса ЗН, относящихся ко второй и четвертой группам

При обработке данных нуклеотидных последовательностей пакетом программ DNASTAR было установлено, что циркулирующий в дельте Волги и Волго-Ахтубинской пойме вирус ЗН относится к первому, второму и четвертому генотипам. При этом основная масса образцов была отнесена к I генотипу (91,86%), штаммы II и IV генотипов встречались значительно реже (4,65% и 3,49% соответственно), а также мы не обнаружили ни одного штамма вируса ЗН, относящегося к III генотипу.

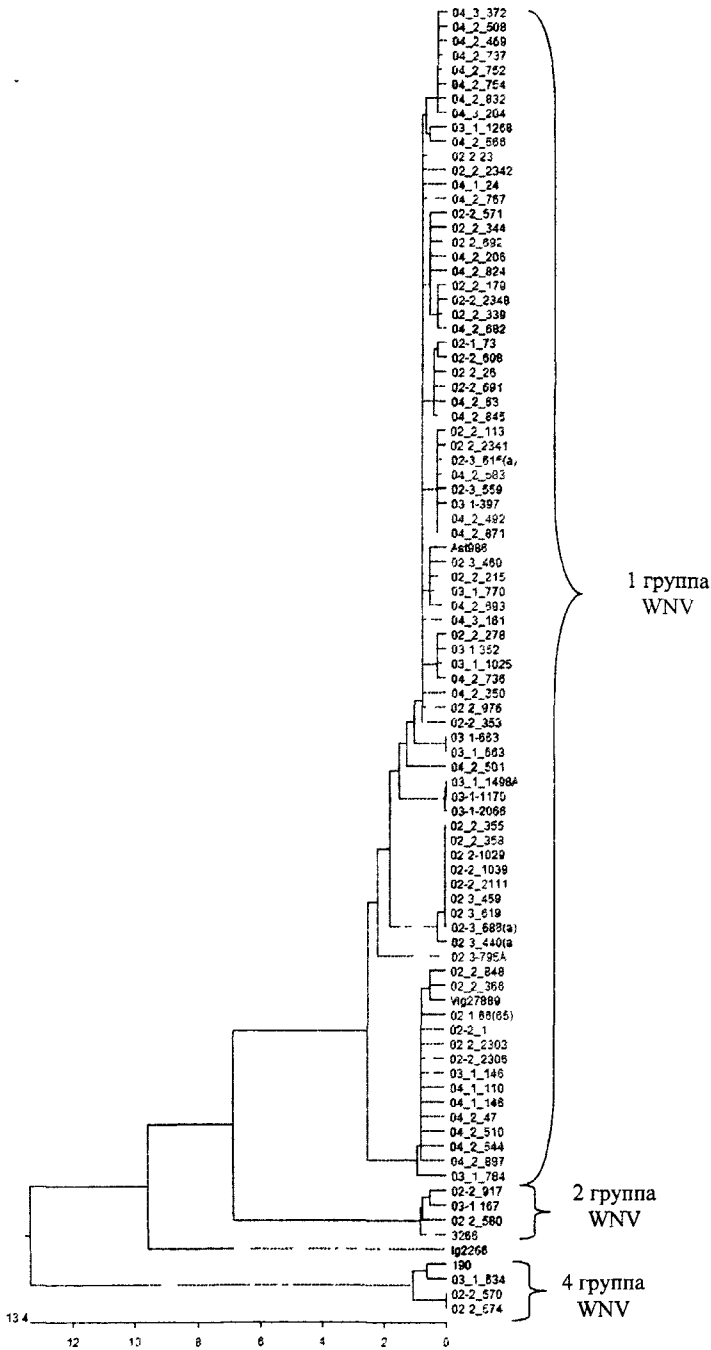


Рис 9 Филогенетическое древо, отражающее родство штаммов, выделенных из биологического материала. В качестве стандартных последовательностей для сравнения были использованы аналогичные участки штаммов из коллекции Института вирусологии им Д И Ивановского РАМН. Штаммы первой группы вируса ЛЗН Ast00-986-human и LEIV-Vlg99-27889-human; второй группы вируса ЛЗН LEIV-Ukr80-3266-rook, третьей группы вируса ЛЗН Ig2266, четвертой группы вируса ЛЗН LEIV-Krmd88-190-ticks.

ВЫВОДЫ

1. Определена полная нуклеотидная последовательность двух штаммов вируса Западного Нила, выделенных от человека (Ast00- 986-human и LEIV-Vlg99-27889-human), и установлено, что эти штаммы относятся к I генотипу.
2. Разработан и апробирован оригинальный метод, основанный на использовании специфических праймеров и условий реакции, позволяющий детектировать РНК вируса Западного Нила в биопробах комаров и клещей с высокой чувствительностью и специфичностью.
3. По результатам обследования биопроб (289782 комаров, 7303 клещей) методом ОТ-ПЦР, зараженность комаров, собранных в дельте Волги и Волго – Ахтубинской пойме составила за 2001-2004гг 0,032%, клещей (2002-2003гг) – 0,74%, что свидетельствует о высоком уровне напряженности природных очагов вируса Западного Нила в дельте Волги и Волго – Ахтубинской пойме.
4. На основании определения первичной структуры участков генома вируса Западного Нила (5'-НТР –core) в 86 образцах ВЗН, установлено, что в дельте Волги и Волго – Ахтубинской пойме циркулируют вирусы ЗН, относящиеся к I, II и IV генотипу. Показано, что наибольшее распространение имеют штаммы первого генотипа (91,86%), штаммы

второго и четвертого генотипа встречаются значительно реже (4,65% и 3,49% соответственно)

Список опубликованных работ по теме диссертации.

- 1 Прилипов А Г , Кинни Р.М., Самохвалов Е И ,Сэведж Г М , Альховский С В ,Тсучия Р , Громашевский ВЛ,Садыкова Г К , Шаталов А Г , Выпшемирский ОИ,Усачев Е В , Мохонов В В , **Воронина А.Г** , Бутенко А М , Ларичев В Ф , Жуков А Н , Ковтунов А И ,Гублер Д Дж , Львов Д К
Анализ новых вариантов вируса Лихорадки Западного Нила // Вопросы вирусологии 2002 N 5 С 36-44.
- 2 Прилипов А Г , Кинней Р М , Самохвалов Е И ,Сэвадж Х М , Альховский С В ,Цучай Р , Громашевский ВЛ, Садыкова Г К , Шаталов А Г , Выпшемирский ОИ, Усачев Е В , Мохонов В В , **Воронина А.Г.**, Бутенко А М , Ларичев В Ф . Гублер Д Дж , Львов Д К Филогенетический анализ новых вариантов вируса Западного Нила // Тезисы II-ой Конференции по проблемам инфекционной патологии в Сибири, Дальнем Востоке и северных регионах азиатской части России (Новосибирск), 29–31 Мая, 2002 - С 175.
- 3 Прилипов А Г , Кинней Р М , Самохвалов Е И , Сэвадж Х М , Альховский С В , Цучай Р , Громашевский ВЛ, Садыкова Г К , Шаталов А Г Выпшемирский ОИ, Усачев Е В , Мохонов В В , **Воронина А.Г** , Бутенко А М , Ларичев В Ф , Ковтунов А И , Жуков А Н , Гублер Д Дж , Львов Д К
Генетический анализ вируса Западного Нила в Волгограде и Астрахани за 1999-2000 эпидемические сезоны // Тезисы II-ой Конференции по проблемам инфекционной патологии в Сибири, Дальнем Востоке и северных регионах азиатской части России (Новосибирск), 29–31 Мая, 2002 - С 175.
- 4 Львов Д К ,Ковтунов А И ,Яшкулов К Б ,Громашевский ВЛ,Джаркенов А Ф ,Щелканов М Ю ,Куликова Н ,Сэвидж Г.,Чимидова Н М ,Михаляева Л Б ,Васильев А В ,Галкина И В ,Прилипов А Г ,Кимми Р ,Самохвалов Е И ,Бушкиева Б Ц ,Гублер Д ,Альховский С К ,Аристова В А ,Дерябин П Г ,

Бутенко А М ,Москвина Т М ,Львов Д.Н.,Злобина Л.В.,Ляпина О В ,Садыкова Г К ,Шаталов А Г ,Усачев Е В ,**Воронина А.Г** ,Лунева Л И
Особенности циркуляции вируса Западного Нила (Flaviviridae,Flavivirus) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000–2002 гг) // Вопросы вирусологии №3, 2004гг , С 45-51

5 Львов Д К ,Бутенко А М ,Громашевский В Л ,Ковтунов А И ,Прилипов А Г ,Кинни Р ,Аристова В А ,Джаркенов А Ф ,Самохвалов Е.И.,Сэвидж Г М ,Щелканов М Ю ,Галкина И В.,Дерябин П.Г ,Гублер Дж ,Куликова Л Н ,Альховский С К ,Москвина Т М ,Злобина Л В ,Садыкова Г К ,Шаталов А Г.,Львов Д Н ,Усачев Е В ,Воронина А Г West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations// Archives of Virology, 2004,С 85-96

6 Прилипов А Г , Львов Д К , Самохвалов Е И , Садыкова Г К , Альховский С В , Воронина А Г Способ обнаружения вируса лихорадки Западного Нила// Патент РФ № 2199589 от 27 02 2003

7 Prilipov,A.GKinney,R.M., Samokhvalov,E.I., Savage,H M , Alkhovsky,S.V., Tsyhia,R.,Gromashevsky,V.L.,Sadykova,G.K.,Shatalov,A.GUsachev,E.V.Mokhopov,V VVoronina,A.G.,Butenko,A.M Larichev,V.FGubler,D.J. and Lvov,D.K. Полные нуклеотидные последовательности штаммов ЛЗН Vlg27889 и Ast986, депонированные в GenBank// accession AY277252, AY278441.

Принято к исполнению 19/05/2005
Исполнено 19/05/2005

Заказ № 885
Тираж: 75 экз .

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2006-4

6711

№ - 99 14