

Ръководство за извършване на геномен надзор на вируса на инфлуенца по птиците (Avian Influenza Virus - AIV)

Контекст

Геномният надзор на вируса на инфлуенцата по птиците (AIV) е от съществено значение за характеризирание на генетичното му разнообразие и за откриване на появата на вируси, които могат да доведат до по-голяма трансмисивност, тежест на заболяването или да окажат въздействие върху здравеопазването на животните и общественото здравеопазване, както и върху мерките за контрол. Освен това спомага за бързо проучване на епидемиологичната, еволюционната и трансмисионната динамика на грипните вируси на местно, регионално и международно равнище, като по този начин дава възможност за подходяща оценка и управление на риска. Впоследствие секвенирането на вирусния геном в съчетание с добре дефинирана стратегия за вземане на проби и секвениране следва да бъде редовно интегрирана в системите за надзор, за да се гарантира представителност и надеждност на констатациите и да се осигури навременна и точна генетична информация за циркулиращите вируси в засегнатите райони.

Стратегии за вземане на проби от генома и план за изследването

Стратегиите за вземане на проби от генома зависят от търсените отговори и поради високите разходи за секвениране те са строго обвързани с наличните ресурси. Основното приложение на геномното секвениране на AIV в европейските държави членки (ДЧ) е:

- Проучване на генетичното разнообразие на вирусите, циркулиращи на европейските територии;
- Бързо откриване на появата на нови вируси;
- Установяване на произхода, разпространението и еволюцията на вируса;
- Установяване на връзките между огнищата и разграничаване на първичните и вторичните огнища при домашните птици;
- Установяване на молекулярните детерминанти за патогенност, трансмисивност, специфичност на гостоприемника и неуспешно диагностициране.

Поради това Референтната лаборатория на ЕС (РЛ на ЕС) препоръчва два допълващи се подхода за вземане на проби:

1. Представителни проби от положителните случаи на AIV, получени от националните системи за надзор;
2. Таргетирано вземане на проби от огнища на AIV, които се срещат в специални среди или популации.

Като се има предвид, че разходите и работата, свързани с геномното секвениране, са значителни, делът на пробите, които трябва да бъдат секвенирани, и на метаданните, докладвани в Таблица 1, е минимумът, необходим за описание на генетичното разнообразие на циркулиращите вируси.

Таблица 1. Подходи за вземане на проби за генетичното характеризирание на AIVs

Стратегия за вземане на проби	Метаданни за секвенирането	Цел	Подход за вземане на проби
Представителни проби от положителните случаи на AIV, получени от националните системи за надзор	Вид, дата и място на вземане на пробата, информация за клинични признаци	Характеризиране на генетичното разнообразие на AIV при <u>видовете домашни птици</u>	За огнища, причинени от вируси на ВПИП (и вируси на НПИП със зоонозен потенциал или повишена вирулентност), от всяко огнище на AIV при домашни птици следва да се секвенира поне една положителна проба. В случай на множество огнища (>2) за кратък период от време (<1 седмица), най-малко една положителна проба следва да се секвенира от всеки клъстер на инфекцията, определен чрез епидемиологичното проучване.

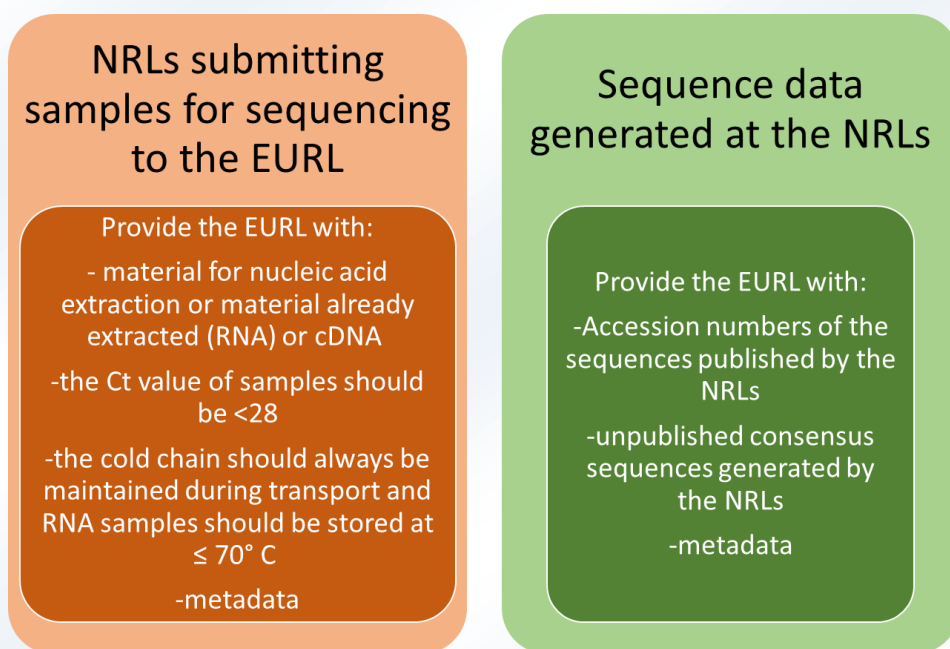
		<p>Характеризиране на генетичното разнообразие на ВПИП при <u>диви птици</u></p>	<p>За да се генерират данни, които отразяват състоянието на популацията на дивите птици във всяка държава, е важно да се гарантира, че секвенирането се извършва върху проби, представителни по отношение на времето, видовете и географията, както и по отношение на тежестта на заболяването. Поради това най-малко една положителна проба следва да секвенира от всеки подтип на ВПИП, вид птица и местоположение. В случай на постоянна циркулация на ВПИП следва периодично да се извършва секвениране (поне на всеки две седмици), за да се проследи развитието на вируса и болестта с течение на времето. Броят на секвенираните проби може да варира в зависимост от броя на огнищата:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <5 случая за 2 седмици от различни местоположения: секвенират се всички проби, подходящи за секвениране - >5 случая за 2 седмици от различни местоположения: за секвениране се избират представителни проби (≥10%)
<p>Таргетирано вземане на проби от огнища на AIV, които се срещат в специални среди или популации</p>		<p>Необичайни събития (промени в патогенността, клинични признаци, обхват на гостоприемниците)</p>	<p><u>Инфекция при бозайници:</u> плътно вземане на проби и секвениране на всички или по-голямата част от заразените животни на едно и също място и по едно и също време, когато възникнат такива събития.</p> <p><u>Инфекция при домашни или диви птици:</u> плътно вземане на проби и секвениране на представителен брой проби от едно и също огнище. По-специално, поне една проба за всяка епидемиологична единица за птицеферми и поне една проба от всеки вид, засегнат от случай при диви птици.</p>
		<p>Инфекции, предизвикани от пробив във ваксината (идентификация на изтеклите мутации по време на спешна ваксинация)</p>	<p>Плътно вземане на проби и секвениране на представителен брой проби от едно и също огнище. По-специално поне една проба за всяка епидемиологична единица.</p>

Генериране и споделяне на данните от секвенирането

Референтната лаборатория на Европейския съюз (РЛ на ЕС) е на разположение в подкрепа на европейските национални референтни лаборатории (НРЛ) при необходимост от съдействие (Фигура 1). Качеството на пробата и вирусното натоварване са от решаващо значение за постигането на оптимални резултати от секвенирането, а лабораториите, които търсят съдействие от РЛ на ЕС за генетично характеризиране, следва да изпратят проби, подбрани въз основа на горепосочената стратегия за вземане на проби, като се вземат предвид следните инструкции:

- осигуряване на достатъчно материал за екстракция на нуклеинова киселина (поне 200ul); може да се предостави и екстрахирана РНК или комплементарна ДНК (поне 30 µl);
- Ct стойността на пробите трябва да бъде <28;
- своевременно предоставяне на селектираните материали за секвениране;
- хладилната верига следва винаги да се поддържа по време на транспортирането, а РНК пробите следва да се съхраняват при температура $\leq 70^{\circ}\text{C}$;
- формулярът, придружаващ пробата ([Приложение](#)) следва да се попълни с изискуемите метаданни.

Европейските НРЛ, които са осигурени с оборудване за секвениране, се насърчават незабавно да споделят данните от секвенираните AIV с РЛ на ЕС (в идеалния случай не по-късно от две седмици след възникване на огнището). За да се използват данните от надзора на генома за вземане на решения относно здравеопазването на животните, данните от секвенирането на вируса следва да бъдат придружени от съответните метаданни ([Приложение](#)).



Фигура 1. Генериране и споделяне на данни от секвенирането

Управление, анализ и докладване на данни

РЛ на ЕС насърчава подаването на данни от секвенирането в GISAID (<https://www.gisaid.org>) или Genbank. Присъединителните номера на публикуваните секвенции или данните от секвентния анализ, генерирани от НРЛ от представителното секвениране на AIVs следва своевременно да се споделят с РЛ на ЕС. РЛ на ЕС и Европейската мрежа от НРЛ за инфлуенца и Нюкясълска болест по птиците са отговорни да анализират всички налични данни за установяване на произхода, предаването и пространствената динамика на AIV на европейско равнище, както и да наблюдават появата на мутации с голямо значение за здравеопазването на животните и хората. Резултатите от анализите, извършени от РЛ на ЕС, се обобщават в периодични доклади, които се споделят поверително с НРЛ и Европейската комисия (ЕК) чрез платформата

IZSve-EURL на *Mattermost Inc.* Честотата на докладване се адаптира в зависимост от епидемиологичната обстановка.

Забележка: Оригиналната версия на английски език на Ръководство за извършване на геномен надзор на вируса на инфлуенца по птиците, изготвено и публикувано от Референтната лаборатория на ЕС, е достъпно на интернет-сайта на лабораторията на следния линк: <https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/useful-resources/guidance-representative-genomic-avian-influenza-virus.pdf>

