

## РАЗРАБОТКА И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

С. Б. Яцышина, Т. С. Астахова, А. Шишова, Т. Ю. Кондратьева, Г. А. Шипулин

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора ([syatsyshina@pcr.ru](mailto:syatsyshina@pcr.ru)), Москва, Россия

В условиях угрозы развития пандемии гриппа для быстрой оценки эпизоотологической и эпидемической ситуаций и своевременного введения санитарно-карантинных мероприятий для ликвидации распространения инфекции, актуальна разработка и внедрение эффективных методов экспресс диагностики этого заболевания. ВОЗ для диагностики гриппа птиц рекомендует проводить вирусологическое исследование с верификацией выделенных культур методами РА-РТГА с использованием панели специфических антисывороток или иммунофлуоресценции с моноклональными антителами к вирусу гриппа А определенного субтипа, а также метод ПЦР с амплификацией специфических участков гена гемагглютинина типа 5 и нейраминидазы типа 1 с последующим секвенированием фрагментов амплификации. В связи с этим в ФГУН ЦНИИ эпидемиологии совместного с 2003 г. велась разработка ПЦР тест-систем с различными вариантами детекции продуктов ПЦР для обнаружения РНК вируса гриппа А с последующей идентификацией наиболее значимых на данный момент субтипов.

Для ветеринарных служб разработана и производится тест-система «ГРИПП», позволяющая обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтипы H5 и H7 с использованием как электрофоретического способа детекции, так и с помощью гибридационно-флуоресцентной детекции в формате реального времени и после окончания ПЦР. Последний из упомянутых способов позволяет сократить время анализа, а также обеспечить более высокую аналитическую чувствительность с сохранением высокой специфичности теста и автоматизировать интерпретацию результатов анализа. ПЦР проводили на приборах «Терцик» (ДНК-технология). Для детекции флуоресценции после окончания ПЦР «по конечной точке» использовали приборы «Джин» (ДНК-технология) и Ala-1/4 (Биосан-Интерлабсервис). ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили на приборе Rotor Gene-3000 (Corbett Research, Австралия). Тест-система показала 100% специфичность в рамках панели, включавшей 12 штаммов вируса гриппа А различных субтипов, штаммы других возбудителей заболеваний птиц, а также образцы различных типов биологического материала. Показано, что тест-система выявляет  $5 \times 10^3$  геномных эквивалентов вируса в 1 мл тестируемого образца при детекции методом электрофореза и  $1 \times 10^3$  геномных эквивалентов вируса в 1 мл тестируемого образца при использовании метода гибридационно-флуоресцентной детекции. Тест-система «ГРИПП» была включена в Государственный заказ и в количестве 600 наборов поставлена в региональные и районные ветеринарные Центры для проведения мониторинга за гриппом птиц на территории РФ.

Для учреждений системы эпиднадзора разработана тест-система «АмплиСенс Influenza virus A/H5N1» на основе мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией (зонды типа TaqMan), позволяющая обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтип H5N1. Аналитическая и диагностическая специфичность тест-систем при работе с клиническим материалом от людей оценивалась при тестировании 50 образцов мазков из носоглотки от взрослых доноров и 30 образцов мазков из носоглотки детей без симптомов ОРЗ, а также с гетерологичными возбудителями респираторных заболеваний человека (штамм и изоляты вируса гриппа

В; штаммы аденовируса человека — 3, 5, 6, 7, 37, 40 типов; штамм респираторно-синцитиального вируса «Лонг» тип А; штамм вируса парагриппа 1 (Сендай), 2 и 3 типов; клинические изоляты: коронавирус человека групп ОС43 и Е229; респираторно-синцитиальный вирус тип А и В; вирус парагриппа тип 1–4; риновирус тип 1В и 2, а также штаммы бактериальных возбудителей ОРЗ человека). В результате тестирования не было зарегистрировано положительных либо сомнительных результатов. Все штаммы гриппа А различных субтипов были идентифицированы как грипп А. Не было зарегистрировано перекрестных реакций в тесте по идентификации субтипа H5N1. Показано, что тест-система выявляет  $1 \times 10^3$  геномных эквивалентов вируса в 1 мл тестируемого образца. Тест-система успешно прошла Государственные испытания в ГИСК им. Тарасевича, после чего была рекомендована к регистрации и использованию в системе санэпиднадзора.

За период с 27 июля по 14 декабря 2005 г. на базе ФГУП ГНЦ ВВ «Вектор», ФГУ ВГНКИ и ФГУН ЦНИИЭ проведена апробация разработанных тест-систем на материале от больных и павших птиц во время эпизоотии гриппа птиц на территории РФ и АР Крым. Исследованию подвергались образцы селезенки, трахей, легких и мозга, фекалии и мазки из клоаки. Было исследовано 173 образца из частных хозяйств Сибирского федерального округа, Тульской области и АР Крым и 1498 образцов из 155 птицефабрик 28 областей, и 8 автономных республик России. Во всех образцах от павших птиц из частных хозяйств с территории Сибирского федерального округа (155 образцов) и из д. Яндовка Тульской обл. (8 образцов) была обнаружена РНК вируса гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. В 7 из 10 исследованных образцов от 7 птиц из Крыма был обнаружен вирус гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. Исследован патологический материал от павших лебедей из Астраханской области (2 объединенных образца), в котором также была обнаружена РНК вируса гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. Ни в одном из образцов, поступивших с птицефабрик от клинически здоровых птиц (1 498 образцов), не была обнаружена РНК вируса гриппа А. Ни один из этих образцов также не дал положительных результатов в тестах по идентификации субтипов H5, H7 или N1 вируса гриппа А. Положительные результаты ПЦР были подтверждены дополнительными методами исследований. Проведено секвенирование продуктов, полученных амплификацией с праймерами, рекомендованными ВОЗ для выявления гемагглютинирина H5 и нейраминидазы N1, и с праймерами на другие локусы этих генов. Секвенирование подтвердило, что обнаруженный в образцах материала вирус гриппа А относится к субтипу H5N1. Для секвенирования продуктов ПЦР использовали набор ABI PRISM Big Dye™ Terminator kit v.1.1, и генетический анализатор ABI-3100 PRISM™ (Applied Biosystems, USA). 10 положительных в ПЦР образцов из Омской области и 2 образца из Астраханской области параллельно были исследованы с помощью выделения вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим серологическим анализом (РГА-РТГА) с использованием панели специфических антисывороток. Результаты этого исследования также показали наличие в этих образцах вируса гриппа серогруппы H5.

Таким образом, разработаны тест-системы на основе ПЦР с детекцией методом электрофореза, и мультиплексной ПЦР в формате гибридизационно-флуоресцентной детекции для выявления РНК вируса гриппа А и идентификации субтипов H5, H7 и H5N1. Проведена оценка аналитических и диагностических характеристик тест-систем в сравнении с существующими методами диагностики. Разработанные тесты показали большую чувствительность, чем методика, рекомендованная ВОЗ, для выявления субтипа H5. Проведена их апробация на полевом материале во время эпизоотии гриппа птиц в июле-ноябре 2005 г. в России. Тест-системы зарегистрированы в РФ для использования в системе ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора.