

Разработка и испытания ПЦР-тест-систем для диагностики гриппа птиц

Г.А.Шипулин^{1,2}, С.Б.Яцышина^{1,2}, А.Т.Подколзин¹, В.А.Терновой³, В.А.Евseenко³, А.В.Шестопалов³, С.И.Браславская¹, Т.Ю.Кондратьева¹, А.В.Шишова¹, Н.Ю.Абрамычева¹, Т.С.Астахова¹, И.Л.Обухов², С.В.Нетесов³, А.Н.Панин², В.И.Покровский¹

¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

²Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ), Москва;

³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

Эволюция высокопатогенных вирусов гриппа А может привести к возникновению пандемии. В связи с этим для быстрой оценки эпизоотологической и эпидемической ситуаций и своевременного введения санитарно-карантинных мероприятий, направленных на предотвращение распространения инфекции, актуальны разработка и внедрение эффективных методов экспресс-диагностики гриппа. Целью проведенных исследований явилась разработка ПЦР тест-систем для выявления РНК вируса гриппа А и идентификации субтипов H5N1 и H7, а также их апробация на полевом материале во время эпизоотии гриппа птиц в июле–ноябре 2005 г. в России. В работе использованы методы ПЦР, секвенирование ДНК и клонирование фрагментов ДНК. Разработаны тест-системы на основе ПЦР с детекцией методом электрофореза и мультиплексной ПЦР в формате гибридационно-флуоресцентной детекции. Специфичность и чувствительность тестов были определены на панели образцов, включающей возбудители вирусных и бактериальных респираторных инфекций человека и птиц, в том числе штаммы всех субтипов вируса гриппа А, а также образцы от здоровых птиц и людей. При анализе тестирования не было зарегистрировано ложно-положительных, ложно-отрицательных либо сомнительных результатов. Перекрестные реакции в типизирующих тестах также отсутствовали. Чувствительность анализа составила 5000 геномных эквивалентов вируса в 1 мл образца при тестировании всех типов рекомендованного материала. По сравнению с методикой ВОЗ для идентификации субтипа H5N1 предложенные нами тесты обладали более высокой аналитической чувствительностью и специфичностью. Аналитическая чувствительность и специфичность анализа при тестировании 163 образцов от больных и павших птиц, а также 1498 образцов от здоровых птиц составила 100%. Вирус гриппа А субтип H5N1 был обнаружен только в 163 образцах от больных и павших птиц. Ни в одном из образцов от птиц с птицефабрик вирус гриппа не был обнаружен. Положительные результаты ПЦР были подтверждены с помощью секвенирования фрагментов ПЦР и выделения вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим анализом (РГА-РТГА) с использованием панели специфических антисывороток, который показал наличие в этих образцах вируса гриппа серогруппы H5. Тест-системы рекомендованы к регистрации в РФ для использования в системе ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, ПЦР

Development and trial of PCR-based assays for the avian influenza virus detection

G.A.Shipulin^{1,2}, S.B.Yatsyshina^{1,2}, A.T.Podkolzin¹, V.A.Ternovoy³, V.A.Evseenko³, A.V.Shestopalov³, S.I.Braslavskaya¹, T.Yu.Kondratieva¹, A.V.Shishova¹, N.Yu.Abramycheva¹, T.S.Astakhova¹, I.L.Obukhov², S.V.Netesov³, A.N.Panin², V.I.Pokrovskii¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Federal Inspection Service for Protection of Consumer Rights, Moscow;

²State Scientific Research Institute of the Control, Standardization and Certification of Veterinary Preparations (Center of Quality of Veterinary Preparations and Forages), Moscow;

³State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk

The evolution of highly pathogenic Influenza A virus may lead to pandemic spread. In this respect, the usage of specific and sensitive tests for rapid diagnostics will prevent wide spread of infection. The aim of this study was to develop the PCR-based assays for the detection of Influenza A virus RNA with identification the main subtypes and to test them using field samples collected during the epizooty of avian flu which occurred in July–November 2005 in Russia.

Methods. PCR, Real Time PCR, the sequencing and cloning of DNA fragments.

Results. We have developed two assays for the detection of Influenza A virus RNA with identification of H5N1 or H7 subtypes. The assays were designed in multiplex PCR format with either electrophoretic detection or fluorescent Real Time/End Point detection. Specificity and sensitivity of the assays (100%) have been determined using the set of viral and bacterial strains causing the avian and human respiratory infections. The set included different subtypes of Influenza A virus, as well as the samples from healthy poultry and from healthy human individuals. Cross-reactivity with other subtypes of Influenza A virus was absent. The detection limit of the assays was 5000 genomic copies of recombinant RNA per 1 ml of all recommended kinds of specimen. In comparison with the WHO-recommended method for identification of Influenza AH5 our assays have better specificity and sensitivity. The diagnostic sensitivity of assays was 100% on 163 samples from infected and 1498 samples from healthy poultry. Influenza A-H5N1 virus RNA was detected only in samples from infected poultry. PCR results were confirmed by inoculation of chicken embryos by the same samples with the subsequent serological analysis. The specificity of PCR-fragments was confirmed by sequencing.

Conclusions. The assays have demonstrated good analytical characteristics, have been recommended to be approved and will be used for future monitoring of Influenza A infection in Russia.

Keywords: avian Influenza virus, PCR

Материалы и методы

Одной из наиболее острых проблем, вставших перед современной системой здравоохранения, явилась проблема возвращающихся и вновь возникающих инфекций. Трагические события, связанные с пандемией тяжелого острого респираторного синдрома в 2003 г., наглядно свидетельствуют о серьезности данной угрозы. Активизация миграционных потоков в человеческих популяциях в сочетании с активным эволюционным процессом в некоторых группах возбудителей инфекций создает предпосылки для возникновения и глобального распространения инфекционных болезней. В настоящий момент значительную обеспокоенность вызывает ситуация, связанная с эпизоотиями гриппа птиц, сопровождающимися инфицированием людей с отдельными случаями тяжелого течения заболевания вплоть до летального исхода.

Основным резервуаром вируса гриппа А служат дикие перелетные водоплавающие птицы, от которых можно выделить изоляты, содержащие все известные субтипы гемагглютинина и нейраминидазы. Из них два субтипа – Н7, Н5 и в меньшей степени Н9 являются высоко патогенными для домашних птиц, вызывая у них почти 100% смертность [1]. В 2003–2004 гг. была зарегистрирована крупная эпизоотия гриппа в странах Юго-Восточной Азии, где в течение нескольких месяцев было уничтожено более 100 миллионов домашних птиц. В этот же период отмечались случаи заболевания птиц гриппом в Италии, Голландии, Бельгии и Германии. За время этих вспышек было уничтожено около 50 миллионов домашних птиц. С мая 2005 г. в странах Юго-Восточной Азии началась новая эпизоотия, вызванная высоко патогенным вирусом гриппа А субтипа Н5Н1.

До 1997 г. считалось, что вирусы гриппа птиц не опасны для людей, так как регистрировались лишь редкие случаи инфицирования людей с клинической картиной конъюнктивита или легких ОРЗ в случае непосредственного контакта человека с инфицированной птицей. Однако при эпизоотиях в Гонконге в 1997 г., Таиланде и Вьетнаме в 2003–2004 гг., во Вьетнаме в 2005 г. вирус гриппа птиц выделяли от людей с тяжелыми формами пневмонии. По данным Всемирной организации здравоохранения, с декабря 2003 г. по 16 декабря 2005 г. в мире зарегистрировано 139 лабораторно подтвержденных случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц А/Н5Н1, из них 71 – с летальным исходом.

Таким образом, в условиях угрозы развития пандемии для быстрой оценки эпизоотологической и эпидемической ситуаций и своевременного введения санитарно-карантинных мероприятий для ликвидации распространения инфекции актуальны разработка и внедрение эффективных методов экспресс-диагностики данного заболевания. В связи с этим целью исследований, проведенных ФГУН ЦНИИ эпидемиологии совместно с ВГНКИ, явилась разработка ПЦР-тест-систем для выявления РНК вируса гриппа А и идентификации субтипов Н5Н1 и Н7, а также их апробация на полевом материале на базе ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор», ФГУ ВГНКИ и ФГУН ЦНИИЭ.

Для корреспонденции:

Шипулин Герман Александрович, заместитель директора Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495) 974-9646

Статья поступила 15.11.2005 г., принята к печати 26.12.2005 г.

В работе использовали следующие штаммы и клинические изоляты: штаммы вируса гриппа А, выделенные от животных: А/черноголовый хохотун/Астрахань/1421/79 (Н13Н2), А/индюк/Висконсин 1/66 (Н9Н2), А/индюк/Онтарио/6118/69 (Н8Н4), А/утка/Германия/1215/73 (Н2Н3), А/утка/Чехословакия/56 (Н4Н6), А/утка/Англия/56 (Н11Н6), А/утка/Альберта60/76 (Н12Н5), А/утка/Украина/1/63 (Н3Н8), А/утка/Альберта35/76 (Н1Н1), А/индюк/Массачусетс/3740/65 (Н6Н2), А/цыпленок/Германия/49 (Н10Н7), А/крячка/Ю. Африка/61 (Н5Н3), А/утка/вирус чумы птиц/Росток/34 (Н7Н1), А/свиная/1976/31 (НСН1), А/утка/Поттсдам/1402–6/86 (Н5Н2); штаммы вируса гриппа А, выделенные от человека: А/Кумamoto/102/2002 (Н3Н2), А/Ленинград/549/80 (Н2Н2), А/Киев/3304/84 (Н0Н1), А/Гонконг/03 (Н5Н1), А/Новая Каледония/20/99 (Н1Н1), А/Гонконг/1073/99 (Н9Н2); штамм вируса гриппа В – В/Токио/53/2000; штаммы других возбудителей инфекционных болезней птиц: реовирус, вирус инфекционного бронхита кур (ИБК «Чапаевский», ИБК МВА-6, ИБК Н-120, ИБК АМ, М-4), парамиксовирусы 1 и 2 типов, вирус инфекционного ларинготрахеита, вирус болезни Марек, вирус болезни Гамборо, *Mycoplasma gallisepticum*; 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; штаммы бактериальных возбудителей ОРЗ человека: *Haemophilus influenzae* тип В, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*; 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, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*. Штаммы предоставлены ГИСК им. Л.А.Тарасевича и ФГУ ВГНКИ. Для оценки специфичности тест-системы использовали материал от здоровых птиц: фекалии, трахеальные смывы, мазки из клоаки, гомогенаты внутренних органов – 30 образцов; корма для птиц – 10 образцов; мазки из носоглотки взрослых доноров – 50 образцов; мазки из носоглотки детей без симптомов ОРЗ – 30 образцов; аутопсийный материал трахеи, полученный из Детской клинической больницы им. Рукавова – 10 образцов.

Экстракцию РНК, реакцию обратной транскрипции, ПЦР и ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией проводили с использованием реактивов производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии. Методы клонирования ДНК были использованы для конструирования положительных и внутреннего контрольных образцов, представляющих собой бактериофаги ms2, содержащие фрагменты генома вируса гриппа А и последовательность гена *gag*, наличие которой позволяет определять концентрацию рекомбинантных препаратов с использованием количественного теста AMPLICOR HIV MONITOR (Roche). Фрагменты амплификации секвенировали с помощью набора ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v.1.1 (Applied Biosystems, USA), согласно инструкции изготовителя с использованием ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). ПЦР проводили на приборах «Терцик» (ДНК-технология). Для детекции флуоресценции после окончания ПЦР «по конечной точке» (ПЦР-ФКТ) использовали приборы «Джин»

(ДНК-технология) и Ala-multi 1/4 (Биосан-Интерлабсервис). ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-ФРВ) проводили на приборе Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Результаты исследования

С целью проведения диагностики гриппа птиц и обнаружения РНК вируса гриппа А в материале от птиц и кормах разработана тест-система «Грипп», позволяющая обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтипы Н5 и Н7 с использованием как электрофоретического способа детекции, так и с помощью гибридизационно-флуоресцентной детекции в форматах ФРВ и ФКТ. При оценке ее аналитических характеристик была показана 100%-ая специфичность и чувствительность в рамках панели, включавшей 12 штаммов вирусов гриппа А, а также образцы различных типов биологического материала и гетерологичные штаммы возбудителей заболеваний птиц, перечисленные в разделе «Материалы и методы». Предел детекции оценивали трехкратным тестированием разведенной вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с известной инфекционной активностью и рекомбинантных положительных контрольных образцов. Исследование показало, что тест-система выявляет и идентифицирует РНК штамма вируса ГП5-А крачка/Ю. Африка/61/Н5Н3 в ВСЖ с инфекционным титром $8,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ в разведении 10^{-9} , что составляет $0,1 \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и РНК штамма вируса ГП7-А /утка/вирус чумы птиц/Росток/34/Н7Н1 в ВСЖ с инфекционным титром $8,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ в разведении 10^{-9} , что составляет $0,1 \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Предел детекции тест-системы на рекомбинантных положительных контрольных образцах в формате электрофоретической детекции составил 5×10^3 геномных эквивалентов вируса в 1 мл (ГЭ/мл) тестируемого образца по определению РНК вируса гриппа А и идентификации субтипов Н5 или Н7 в типизирующем тесте и 1×10^3 ГЭ/мл в формате гибридизационно-флуоресцентной детекции (ФРВ и ФКТ).

С целью диагностики заболевания людей, вызванного вирусом гриппа А субтипа Н5Н1, и его идентификации в материале от больных и павших птиц разработана тест-система «АмплиСенс Influenza virus H5» в формате ПЦР-ФРВ/ФКТ, позволяющая идентифицировать субтип Н5Н1. Аналитическая специфичность и чувствительность тест-системы оценивались при работе со штаммами вируса гриппа А различных субтипов, с клиническим материалом, а также с гетерологичными штаммами возбудителей респираторных болезней человека, перечисленными в разделе «Материалы и методы». В результате тестирования не было зарегистрировано ложно-положительных, ложно-отрицательных либо сомнительных результатов. Перекрестных реакций при применении типизирующего теста для идентификации субтипа Н5Н1 также выявлено не было. Предел детекции оценивали трехкратным тестированием разведенной вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с известной инфекционной активностью и рекомбинантных положительных контрольных образцов. Исследование показало, что тест-система выявляет и идентифицирует РНК штамма вируса гриппа А/Гонконг/03/Н5Н1 в ВСЖ с инфекционным титром $8,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ в разведении 10^{-6} , что составляет $500 \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. При тестировании рекомбинантных положительных контрольных

образцов, содержащих либо фрагмент гена матрикс-протеина, либо фрагмент гена гемагглютинина пятого типа, либо фрагмент гена нейраминидазы первого типа, предел детекции РНК вируса гриппа А и идентификации субтипа Н5Н1 в типизирующем тесте составил 5×10^3 ГЭ/мл.

За период с 27 июля по 28 ноября 2005 г. на трех базах (ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор», ФГУ ВГНКИ и ФГУН ЦНИИЭ) проведена апробация вышеупомянутых тест-систем на материале от больных и павших птиц (кур, гусей, домашних и диких уток, индоуток, лебедей) в период эпизоотии гриппа птиц на территории Сибирского федерального округа, а также со вспышек в Тульской и Астраханской областях. Исследованию подвергались образцы селезенки, трахей, легких и мозга, фекалии и мазки из клоаки. В общей сложности с помощью обеих тест-систем «Грипп» и «АмплиСенс Influenza virus H5» было исследовано 163 образца из частных хозяйств Сибирского федерального округа и Тульской области и 1498 образцов из 155 птицефабрик Архангельской, Астраханской, Белгородской, Брянской, Владимирской, Вологодской, Ивановской, Калужской, Кировской, Костромской, Курской, Московской, Мурманской, Нижегородской, Омской, Оренбургской, Пензенской, Пермской, Ростовской, Рязанской, Самарской, Смоленской, Тамбовской, Тверской, Тульской, Шуйской, Ярославской областей, Ставропольского края, Санкт-Петербурга и республик Башкортостан, Кабардино-Балкария, Карелия, Коми, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Чувашия. 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 Н5Н1. Исследован патматериал от павших лебедей из Астраханской области (два объединенных образца), в которых также была обнаружена РНК вируса гриппа А и идентифицирован субтип Н5Н1. В семи из десяти исследованных образцов от семи птиц из Крыма был обнаружен вирус гриппа А и идентифицирован субтип Н5Н1. В одном случае при тестировании трех образцов органов (печень, легкие, мозг) живой курицы, контактировавшей с павшими, вирус был обнаружен только в образце легких, в другом случае в объединенном образце от павшей утки (печень, легкие, мозг) неоднократно наблюдалось ингибирование ПЦР. Таким образом, у шести из семи подвергшихся тестированию птиц была обнаружена РНК вируса гриппа А, а результаты тестирования проб от одной павшей утки не подлежат интерпретации из-за неоднократно повторяющегося ингибирования реакции (отсутствовал сигнал амплификации ВКО). Ни в одном из образцов, поступивших с птицефабрик от клинически здоровых домашних птиц (1498 образцов), не была обнаружена РНК вируса гриппа А. Ни один из этих образцов также не дал положительных результатов в тестах по идентификации субтипов Н5, Н7 или Н1 вируса гриппа А. Результаты электрофоретической детекции при использовании тест-системы «Грипп» во всех случаях совпадали с результатами гибридизационно-флуоресцентной детекции.

Обсуждение

Основными способами лабораторной диагностики гриппа птиц в нашей стране являются выделение вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим определением

гемагглютинирующей активности и идентификация субтипов в реакции торможения гемагглютинации с типоспецифическими сыворотками, а также определение индекса патогенности методом биопробы на цыплятах. Эти методы идентификации субтипов отличает большая продолжительность (до двух недель), относительно низкая чувствительность и специфичность (возможны как ложно-положительные, так и ложно-отрицательные результаты). Также проводится мониторинг антител против вируса гриппа А, однако в случае инфицирования высоко патогенным вирусом гриппа птиц серологическая диагностика практически невозможна, так как заболевание протекает молниеносно (24–48 ч), в то время как уровень антител достигает диагностического титра только спустя несколько дней после появления симптомов заболевания.

ВОЗ для диагностики гриппа птиц рекомендует проводить вирусологическое исследование с верификацией выделенных культур методами иммунофлуоресценции с моноклональными антителами к вирусу гриппа А определенного субтипа. В частности, для идентификации субтипа H5 рекомендованы тест-система WHO Inf-Reagent kit [2], а также метод ПЦР с амплификацией специфических участков гена гемагглютинина типа 5 и нейраминидазы типа 1 с последующим секвенированием фрагментов амплификации. На сегодняшний момент в мире не существует ни одной зарегистрированной диагностической ПЦР тест-системы для идентификации субтипов вируса гриппа А.

В ФГУН ЦНИИЭ совместно с ФГУ ВГНКИ разработан ряд ПЦР тест-систем с различными вариантами детекции продуктов ПЦР для обнаружения РНК вируса гриппа А с последующей идентификацией наиболее значимых на данный момент субтипов. Наиболее опасным для домашней птицы является вирус гриппа А, имеющий пятый или седьмой тип гемагглютинина, но в то же время заболевание может вызывать вирус гриппа А других субтипов. В связи с этим целесообразно проводить первоначальный скрининг тестируемого материала для выявления всех субтипов вируса гриппа А с последующим подтверждением и одновременной идентификацией субтипов H5 или H7 в типизирующем тесте. Эти моменты были учтены нами при разработке тест-системы «Грипп», в которой сначала проводится скрининг по консервативной области, кодирующей матрикс-протеин, а затем проводится подтверждение и одновременное типирование по субтипспецифичным локусам гена гемагглютинина. Использование различных вариантов комплектации тест-системы позволяет осуществлять детекцию фрагментов ПЦР как методом электрофореза, так и путем измерения уровня флуоресценции, возрастающего во время реакции при гибридизации фрагментов ПЦР с олигонуклеотидными зондами, конъюгированными с флуоресцентными красителями. Предложенная структура зондов позволяет проводить детекцию как во время ПЦР (ПЦР-ФРВ), так и по окончании реакции (ПЦР-ФКТ). Тест-система «Грипп» в процессе комиссионных испытаний показала хорошие аналитические характеристики, что позволило рекомендовать ее к регистрации в Российской Федерации на расширенном заседании научно-проблемных методических комиссий по контролю и стандартизации биологических лекарственных средств для животных, применяемых при бактериальных, грибковых и вирусных болезнях от 14 октября 2003 г. (ТУ 9388-116-00494189-03).

В связи с тем, что в текущей эпизоотии были зарегистрированы случаи инфицирования людей вирусом гриппа А субтипа H5N1, для диагностики заболевания людей ФГУН ЦНИИЭ разработал тест-систему «АмплиСенс Influenza virus H5» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая позволяет выявлять РНК вируса гриппа А по консервативной области, кодирующей матрикс-протеин, с последующим подтверждением и идентификацией субтипа H5N1 в мультиплексной реакции по специфичным локусам генов гемагглютинина типа 5 и нейраминидазы типа 1. Детекция проводится путем измерения флуоресцентного сигнала как в формате ПЦР-ФРВ, так и в формате ПЦР-ФКТ. Данная тест-система успешно прошла государственные испытания в ГИСК им. Л.А.Тарасевича, показав высокую специфичность и чувствительность анализа, после чего была рекомендована к регистрации и использованию в системе санэпиднадзора. В процессе испытаний на клиническом материале также было показано, что для диагностики в случае подозрения на высоко патогенный грипп птиц могут быть использованы как образцы внутренних органов (легкие, мозг, печень, селезенка), так и фекалии и мазки из клоаки. Вирус гриппа был обнаружен нами во всех перечисленных типах патматериала павших от гриппа птиц. У контактировавших с павшими, но еще живых птиц вирус может быть обнаружен только в фекалиях и образцах легких. В случае инфицирования менее патогенными штаммами вируса, когда заболевание у птиц протекает в форме энтеритов, наиболее подходящим для диагностики материалом будут фекалии и мазки из клоаки. Для скрининга диких инфицированных птиц, по-видимому, целесообразно использовать только фекалии.

Следует подчеркнуть, что при оценке аналитических характеристик ПЦР-методики, рекомендованной ВОЗ для выявления изолятов, имеющих пятый тип гемагглютинина, были выявлены низкая аналитическая чувствительность и специфичность данного теста. В частности, при тестировании рекомбинантного положительного контрольного образца аналитическая чувствительность составила всего 1×10^5 ГЭ/мл, что ниже показателей наших тестов в 20–100 раз. В одном случае при тестировании образцов легких павших от гриппа кур был обнаружен фрагмент ПЦР ожидаемого размера, который, как показало секвенирование, содержал в своем составе рекомендованную ВОЗ последовательность праймеров, фланкирующую неизвестную для GenBank последовательность (вероятно, из генома кур).

Специфичность результатов ПЦР, полученных при апробации разработанных тест-систем на материале от птиц в период эпизоотии, была подтверждена дополнительными методами исследований. Проведено секвенирование фрагментов ПЦР, полученных с помощью тест-систем из образцов Новосибирской, Тульской и Астраханской областей. Секвенирование показало, что амплифицированные фрагменты принадлежат вирусу гриппа А субтипа H5N1. Десять из положительных в ПЦР объединенных проб из частных хозяйств Омской области и два образца от диких лебедей из Астраханской области параллельно были исследованы с помощью изоляции вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим анализом методами

РГА и РТГА с использованием панели типоспецифических антисывороток. Проведенные исследования также показали наличие в этих образцах вируса гриппа А серогруппы Н5. Результаты секвенирования были использованы нами для детального филогенетического анализа. Были проанализированы практически полноразмерные сегменты генома вируса, кодирующие гемагглютинин и нейраминидазу, изолятов из Новосибирской, Тульской и Астраханской областей. Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в Gen Bank под номерами DQ212791, DQ212792, DQ279300, DQ279301, DQ320136, DQ320137. Секвенирование показало, что циркулирующий в данной эпизоотии вирус наиболее близок вирусу гриппа А Н5N1, выделенному от диких водоплавающих птиц, павших при эпизоотии в мае–августе 2005 г. в Китайской провинции Qinghaihu, на озере Цинхай, которое является местом скопления мигрирующих птиц из Южной Азии, Новой Зеландии, Австралии и Сибири [3]. Гомология секвенированных нами изолятов A/goose/Novosibirsk/4/2005 (H5N1), A/chicken/Tula/10/2005 (H5N1) и A/swan/Astrakhan/1/2005 (H5N1) и изолятов от диких водоплавающих птиц с озера Цинхай (например, A/Bar-headed goose/Qinghai/12/05(H5N1)) по гену гемагглютинина составила от 99,2 до 99,5% и по гену нейраминидазы – от 99,5 до 99,7%. Следует отметить, что циркулирующий в данной эпизоотии вирус содержит несколько характерных маркеров: последовательность сайта протеолиза гемагглютинина, кодирующую 6 основных аминокислот (PQGERRRKKR/GL), которая ассоциирована с высоким индексом патогенности для домашних птиц [4], делеция в гене нейраминидазы (20 аминокислот в позиции 49–68), что является маркером адаптации вируса к организму птиц, а также видо-специфичный для птиц участок связывания гемагглютинина с сиаловыми рецепторами.

Выводы

1. Разработаны и рекомендованы к регистрации в РФ ПЦР-тест-системы, позволяющие выявлять РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтипы Н5 или Н7 и субтип Н5N1 в материале от животных, людей и в кормах, причем для диагностики можно использовать материал как от павших, так и от живых птиц.
2. Разработанная методика обладает более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с рекомендованной ВОЗ методикой для идентификации субтипа Н5N1 вируса гриппа А методом ПЦР.
3. Испытания на полевом материале показали 100% диагностическую чувствительность и специфичность разработанных тест-систем.
4. Вирус гриппа птиц, вызвавший эпизоотию в России в августе–ноябре, имеет генетические маркеры высокой патогенности для птиц и наибольшую гомологию с изолятами, выделенными от павших диких водоплавающих птиц в мае–августе 2005 г. на озере Цинхай в Китае.

Литература

1. Buisch W.W., Hyde J.L., Mebus Ch.A. Foreign animal diseases «The gray book». Pat Campbell & Associates and Carter Printing Company, Richmond, Virginia, 1998. http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book/
2. Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. Science 2001; 293: 1840–2.
3. WHO Manual on Animal influenza of diagnosis and surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS, 2002. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CS_R_NCS_2002_5/en/
4. Liu J., Xiao H., Lei F., et al. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds. Science 2005; 309: 1206.