

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИРУСА ГРИППА МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ПТИЦ МЕТОДОМ ПЦР

Краснова Т.В.^{1,2}, Подколзин А.Т.¹, Обухов И.Л.², Шипулин Г.А.¹

1 – ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ

*2 – ФГУ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов
Москва*

Введение.

В последние десятилетия эпизоотии гриппа птиц зарегистрированы и нанесли огромный ущерб в Австралии, Великобритании, США, Германии, Мексике, Пакистане, Ирландии, Италии. В 1997 г при эпизоотии в Гонконге отмечено 18 случаев заражения людей, из которых 6 закончились летальным исходом.

В 2003 г. вирусы гриппа птиц типа А впервые получили значительное распространение на западе Европы (Италия, Голландия, Бельгия, Германия). За время этих вспышек было уничтожено около 50 миллионов голов птиц. В этот же период грипп птиц зарегистрирован в странах Юго-Восточной Азии, где в течение нескольких месяцев было уничтожено более 100 миллионов птиц.

По данным Всемирной организации здравоохранения на 7 сентября 2004 года во Вьетнаме и Таиланде было выявлено и лабораторно подтверждено 39 случаев заболевания людей, из которых 28 человек погибло. Все случаи заражения произошли в результате инфицирования от домашней птицы.

Основным резервуаром вируса в природе являются различные виды птиц. Вирус передается воздушно-капельным путем, по контакту, через общие гнезда, тару, помет, мясо и яйцо, отходы инкубации и убойного цеха. На крупных птицефабриках инфекция, быстро распространяясь в птичниках, не охватывает все поголовье, поэтому клинически здоровая птица может быть латентным вирусоносителем. Клинические признаки болезни разнообразны, поражаются желудочно-кишечный тракт и респираторные органы. Признаки поражения зависят от штамма, вида и возраста птицы. Поэтому грипп отдельных видов птиц называли «классической чумой птиц», «заразным насморком» и т.п. Доказано, что эти заболевания имеют одного возбудителя (Avian Influenza Viruses) и называются гриппом птиц.

Вирусы гриппа относятся к семейству ортомиксовирусов, имеют сегментированный геном и в связи с особенностями строения нуклео- и матрикс протеинов подразделяются на типы А, В и С. Существующая классификация вирусов гриппа А основана на характеристике их антигенных свойств, определяемых поверхностными антигенными детерми-

нантами – гемагглютинином (H) и нейраминидазой (N). В соответствии с существующей номенклатурой ВОЗ (ВОЗ Меморандум, 1980) в название штамма наряду с его номером включаются сведения о первичном реципиенте, географической области и годе его первой изоляции. Типы гемагглютинина и нейраминидазы, указываются в скобках, например, A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1).

Специфическая профилактика и лечение при гриппе птиц не разработаны. Профилактика и меры борьбы проводятся в соответствии с действующей инструкцией по борьбе с гриппом птиц.

Современная ситуация с гриппом птиц, требует интенсификации научных исследований, направленных на эффективную профилактику, терапию и надежные средства диагностики. Одним из наиболее перспективных методов экспресс-диагностики является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволяет не только выявлять, но дифференцировать штаммы вируса гриппа типа А. Полученная информация о разновидности возбудителя болезни, позволит проводить эпизоотологический контроль и предотвратить распространение опасных штаммов гриппа типа А.

Целью нашей работы явилась разработка тест-системы для выявления и дифференциации вируса гриппа типа А на основе ПЦР.

Материалы и методы.

В работе использовали штаммы H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N3. Также использовался контаминированный различными штаммами вируса гриппа клинический и аутопсийный материал – фекалии, смывы с трахеи и глотки. Смывы с глотки и трахеи перед выделением РНК центрифугировали, полученный супернатант брали для выделения, из фекалий готовили 20 % суспензию на стерильном физиологическом растворе, затем ее декантировали и на досадок центрифугировали, полученный супернатант использовали для выделения. Выделение РНК проводили методом сорбции на силикагеле с предшествующим лизированием пробы в растворе, содержащим хаотропный агент – гуанидин тиоционат с использованием набора «Рибо-Сорб», производства ЦНИИЭ. В качестве внутреннего контроля качества выделения РНК использовали ВКО-РНК-НСV-рес, производства ЦНИИЭ.

Реакцию обратной транскрипции проводили при температуре 37° С в течение 30 мин. с неспецифическими праймерами, использовали набор «Реверта-Л», производства ЦНИИЭ.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл на амплификаторах Терцик («ДНК-технология») и GeneAmp-2700 (Applied Biosystems) по стандартным методикам с использованием специфических праймеров.

Образуемые амплифицированные фрагменты идентифицировали с помощью горизонтального электрофореза в 1,7 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Результаты.

На основе литературных данных, а также базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) были выбраны специфические праймеры, позволявшие амплифицировать фрагменты ДНК всех штаммов вируса гриппа А по участку гена кодирующего матрикс протеин (365 п.н.) и участкам гена гемагглютинина 5 и 7 типов вируса гриппа птиц. Для детекции штаммов содержащих 5 тип гемагглютинина использовались модифицированные праймеры, рекомендованные ВОЗ. Экспериментально были подобраны условия проведения ПЦР с данными праймерами (программы амплификации, концентрация праймеров и ионов магния).

Специфичность праймеров была проверена на штаммах вируса гриппа и других вирусных и бактериальных агентах, а также на панели клинического и аутопсийного материала – фекалиях птиц и смывах с трахеи. Во всех случаях метод ПЦР показал 100 % специфичность.

В период с 28.04.03 по 05.06.03 в соответствии с приказом № 28 Департамента ветеринарии МСХ РФ были проведены комиссионные испытания тест-системы «ГРИПП» для выявления вирусов гриппа А методом ПЦР. Зашифрованная стандартизованная панель состояла из 34 образцов и содержала изоляты различных штаммов гриппа и штаммы других бактерий и вирусов, алантоисную жидкость куриных эмбрионов, зараженных ВГП-А с разной вирусной активностью, корма, сырье, сырые продукты мясного происхождения контаминированные и неконтаминированные вирусом гриппа. Апробация разработанной ПЦР-тест-системы для выявления вируса гриппа млекопитающих и птиц методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) показала 100%-ную специфичность и высокую чувствительность в рамках предложенной панели при тестировании алантоисной жидкости куриных эмбрионов в разведении 10^{-9} , зараженных ВГП-А (H5N3, 1961г.) с вирусной активностью 10^8 в разведении 10^{-4} .

В период с 02.08.04 по 06.08.04 проведены дополнительные комиссионные испытания тест-системы по дифференциации вируса гриппа типа А содержащего 5 и 7 тип гемагглютинина методом ПЦР. Зашифрованная стандартизованная панель состояла из 18 образцов и содержала изоляты различных штаммов. Апробация разработанной ПЦР-тест-системы для выявления и дифференциации вируса гриппа типа А методом ПЦР показала 100%-ную специфичность и высокую чувствительность в рамках предложенной панели. Тест-система выявляла ГП5-А/Кракка/Ю.Африка/61/H5N3 с инфекционным титром $8,0 \lg$ ЕИД $50/\text{см}^3$ в разведении 10^{-9} и ГП7-А/Утка/вирус чумы птиц/Росток/34/ H7N1 с инфекционным титром $8,0 \lg$ ЕИД $50/\text{см}^3$ в разведении 10^{-9} .

Для исключения ложноотрицательных результатов связанных с ошибкой исследователя при выделении РНК и постановке ПЦР проводится работа по введению в состав тест-системы внутренних контрольных образцов.

Выводы.

Разработана тест-система «ГРИПП» для выявления и дифференциации вируса гриппа методом ПЦР, позволяющая проводить экспресс-диагностику болезни и дифференциацию вирусов гриппа А, содержащих 5 и 7 тип гемагглютинина. Тест-система успешно прошла комиссионные испытания и рекомендована МСХ РФ к широким производственным испытаниям на территории РФ.

Литература.

1. ProMED-mail (Program for Monitoring Emerging Diseases, is a program of the ISID). <http://www.promedmail.org>
2. Update on Avian Influenza in Animal in Asia. <http://www.oie.int>
3. Disease Outbreak News. <http://www.who.int/>
4. Boom R., Sol C., Salimans M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. – J Clin Microbiol. 1990. 28: 495-503
5. WHO Manual on Animal influenza of diagnosis and surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5