

## РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭПИДЕМИЧЕСКИХ И ПАНДЕМИЧЕСКОГО (A/H1N1SW2009) ВИРУСОВ ГРИППА

Миненко А.Н., Яцышина С.Б., Прадед М.Н., Шипулин Г.А.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Введение.** В апреле 2009 года, первоначально в Мексике, а затем в США, началась эпидемия, вызванная новым вариантом вируса гриппа A/H1N1 с гемагглютинином свиного происхождения (A/H1N1sw2009 или A/H1N1v или A/H1N1swl). Молниеносное распространение эпидемии на ряд других стран заставил ВОЗ объявить о начале пандемии (6 фаза пандемического процесса) и предпринять меры направленные на предотвращение распространения эпидемии. В частности был разработан алгоритм лабораторной диагностики при подозрении на пандемический грипп с использованием ПЦР. Данный алгоритм включает в себя: этап обнаружения РНК вируса гриппа А, и затем идентификацию наиболее эпидемически значимых на данный момент субтипов, в том числе нового варианта гриппа A/H1N1sw2009.

**Цели и задачи.** С целью оптимизации лабораторной диагностики гриппа в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора проведена разработка наборов реагентов для мониторинга эпидемических и пандемического вирусов гриппа методом ПЦР в формате гибридационно-флуоресцентной детекции в режиме реального времени и по конечной точке (по окончании ПЦР).

**Методы.** В работе использовались штаммы, выделенные от животных: штаммы вируса гриппа А субтипов H13N2, H9N2 (A/Индюк/Висконсин/1/66, A/Swine/Hong Kong/9/98), H8N4, H2N3, H2N9, H3N2, H3N8, H4N6, H11N6, H12N5, H13N2, H1N1, H6N2, H10N7, H5N3, H7N1 (A/FPV/Rostock/34), H5W1N1, H5N2, H5N3 (A/крачка/Ю.Африка/61-H5N3), H5N1 (A/Cygnus olor/Astrakhan/Ast05-5/05, A/grebe/Тува/Тув06-6/06, A/chicken/Moscow/2/07). Штаммы вируса гриппа А, выделенные от человека: 26 штаммов субтипа H1N1, 23 штамма субтипа H3N2 выделенных с 1977 по 2008 гг. в РФ, Украине и Республике Беларусь, A/Ленинград/549/80(H2N2), A/Киев/3304/84(H0N1), A/Гонконг/03(H5N1), A/Гонконг/1073/99(H9N2); изоляты A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1), предоставленные CDC; штаммы вируса гриппа В: В/Токио/53/2000, В/Moscow/18/07(Ямагата), В/Moscow/15/07(Виктория). Штаммы и клинические изоляты вирусных возбудителей ОРЗ человека: аденовирусы человека – 3, 5, 6, 7, 37, 40 типов,

респираторно-синцитиального вируса «Лонг», вирусов парагриппа 1-4 типов, риновирусов человека 13, 15, 16, 17, 21, 26, 29 типов, энтеровирусов человека: *Coxsackie* B1, B2, B3, B4, B5, B6; *Polio* 1, 11, 111, изоляты коронавируса человека OC43, E229, HKU1 и NL63. Штаммы и клинические изоляты бактериальных возбудителей ОРЗ человека: *Haemophilus influenzae* тип B, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*; клинические образцы содержащие *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae*.

Экстракцию РНК с последующей реакцией обратной транскрипции проводили с использованием наборов «Рибо-преп» и «Реверта-Л» (ФГУН ЦНИИЭ). Для амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени использовали приборы: Rotor Gene-3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor Gene Q (Qiagen, Германия), ДТ-96 («ДНК-технология», РФ), Smart Cyclus (Cepheid, США). Детекцию по конечной точке осуществляли на приборах ALA-1/4 («BioSan», Латвия) и «Джин» («ДНК-технология», РФ) после амплификации на - Gene Amp-2700 (Applied Biosystems, USA), Терцик (ДНК-Технология, РФ), Махугене Therm-1000 (Axygen, США).

**Результаты.** В ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора разработан ряд наборов реагентов для ПЦР в полной мере вписывающийся в разработанный ВОЗ алгоритм лабораторной диагностики при подозрении на пандемический грипп с использованием ПЦР. Это наборы – «АмплиСенс *Influenza virus A/B-FL*», для обнаружения РНК вирусов гриппа А и В; «АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*», для идентификации гемагглютинаина и нейраминидазы сезонных вариантов вируса гриппа H1N1 и H3N2; «АмплиСенс *Influenza virus A/H1-swine-FL*», для идентификации гемагглютинаина вируса гриппа А/H1N1v. Наборы реагентов могут быть использованы при тестировании разнообразного клинического материала от человека (мазки из респираторного тракта, мокрота и аспираты из трахеи, секционный материал) и культуральной жидкости полученной при вирусологических исследованиях.

С помощью данных наборов реагентов возможно проводить детекцию как в режиме реального времени, так и по конечной точке (по окончании ПЦР), с использованием разнообразной приборной базы лабораторий.

Для оценки аналитических характеристик наборов использовались штаммы вируса гриппа А, выделенные от животных и человека, штаммы вируса гриппа В, клинические образцы, штаммы и клинические изоляты вирусных и бактериальных возбудителей ОРЗ человека. Для оценки специфичности использовались мазки из носоглотки и ротоглотки от взрослых и детей без симптомов ОРЗ. Эффективность

работы набора реагентов для идентификации гемагглютинина H1 свиного происхождения оценивалась с использованием изолятов *A/California/04/2009(H1N1)* и *A/California/07/2009(H1N1)*, представленных CDC [1].

В тестах по оценке специфичности разработанных наборов в реакциях по идентификации вирусов или для определения субтипов ложноположительные и сомнительные результаты не отмечались. При тестировании с набором «АмплиСенс *Influenza virus A/H1-swine-FL*» изолятов эпидемического гриппа субтипа H1 с высокой вирусной нагрузкой (порядка  $10^8$  гз/мл) ложноположительные и сомнительные результаты также отсутствовали.

Следует отметить, что результаты, получаемые с помощью набора реагентов «АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*», можно считать валидными только в случае получения положительных результатов по обоим мишеням - гемагглютину и нейраминидазе. При этом набор реагентов «АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*» идентифицирует штаммы подобные *A/California/04/2009(H1N1)* по гемагглютину тип 1 как положительный и по нейраминидазе тип 1 как отрицательный.

С целью определения чувствительности наборов были созданы рекомбинантные контрольные образцы, которые представляют собой бактериофаги ms2, содержащие фрагменты генома вирусов гриппа и специфическую последовательность для определения концентрации препаратов. Таким способом были сконструированы рекомбинантные препараты, содержащие детектируемые участки генома вирусов гриппа (кодирующие белок M1 вируса гриппа А и протеин NS гриппа В) и образец, содержащий синтезированный с помощью методов генной инженерии специфический детектируемый участок последовательности гена гемагглютинина изолята *Influenza virus A* аналогичную *A/California/04/2009(H1N1)* (что было подтверждено секвенированием ДНК). С помощью данных препаратов была определена чувствительность наборов реагентов, которая составила  $10^3$ – $5 \cdot 10^3$  копий/мл тестируемого образца в зависимости от способа экстракции РНК. При этом аналитическая чувствительность наборов «АмплиСенс» на порядок выше заявленной фирмой FOCUS Diagnostics (США) чувствительности для своих тестов и тестов CDC [2].

Аналитическая чувствительность наборов оценивалась также тестированием вирусосодержащей жидкости с известной инфекционной активностью. Результаты исследований показали, что разработанные наборы реагентов позволяют обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтип сезонного гриппа H1N1 по гемагглютину и нейраминидазе в суспензии с инфекционной активностью  $0,03 \text{ IgT-}$

CID50/мл, идентифицировать субтип H3N2 в суспензии с инфекционной активностью 0,02lgTCID50/мл и обнаруживать РНК вируса гриппа В в суспензии с инфекционной активностью 1lgTCID50/мл [1].

С момента начала эпидемии гриппа А/Н1N1sw2009 в референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора проводились работы по первичному исследованию случаев подозрения на инфицирование вирусом А/Н1N1v и по подтверждению положительных результатов первичного исследования, полученных в ФГУЗ ЦГиЭ. За период с 28 апреля 2009 года по апрель 2010 года в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора протестирован материал от 874 пациентов (из них от 284 пациентов посмертный материал), включая полученный из 52-х субъектов РФ. Более чем в 95% случаев в исследуемом материале подтверждено наличие вируса А/Н1N1v, что свидетельствует о воспроизводимой работе наборов реагентов.

**Выводы.** Таким образом, разработаны и хорошо зарекомендовали себя на практике наборы реагентов для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с высокими аналитическими характеристиками для обнаружения и типирования вирусов гриппа, использование которых позволит совершенствовать диагностику и эпидемиологический надзор за гриппом.

#### **Литература.**

1. Яцышина С.Б., Миненко А.Н., Прадед М.Н., Волошина П.В., Трушакова С.В., Браславская С.И., Бурцева Е.И., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Покровский В.И. Диагностика гриппа: новый вариант H1N1 в России. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, №6, с. 56-62.
2. FOCUS Diagnostics «Influenza A H1N1 (2009) Real Time RT-PCR»[http://www.questdiagnostics.com/2009H1N1/files/focus\\_h1n1.pdf](http://www.questdiagnostics.com/2009H1N1/files/focus_h1n1.pdf)

## **НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН**

**Омариева Э.Я., Милихина А.В.**

*Управление Роспотребнадзора по Республике Дагестан, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан», г. Махачкала, Россия*

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) остаются одной из самых актуальных проблем здравоохранения в мире