

4-бөлім
МИКРОБИОЛОГИЯ

Раздел 4
МИКРОБИОЛОГИЯ

Section 4
MICROBIOLOGY

Ақылбаева К.К.,
Шыныбекова Г.О.,
Тленчиева Т.М.,
Садиқалиева С.О.,
Султанқұлова К.Т.,
Сандыбаев Н.Т.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский

Лабораторная диагностика гриппа типов А и В методом ПЦР

Akylbayeva K.K.,
Shynybekova G.O.,
Tlenchiyeva T.M.,
Sultankulova K.T.,
Sandybaev N.T.

Research Institute of Biological Safety Problems, Kazakhstan, Zhambyl oblast, Gvardeiskiy vil.

Laboratory diagnosis of influenza types A and B by PCR

Ақылбаева К.К.,
Шыныбекова Г.О.,
Тленчиева Т.М.,
Султанқұлова К.Т.,
Сандыбаев Н.Т.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты, Қазақстан, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, к.т.п. Гвардейский

Тұмаудың А және В типтерін ПТР әдісімен зертханалық диагностика

В настоящей работе представлен разработанный нами метод для выявления РНК вируса гриппа типов А и В с использованием мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Подобраны специфичные праймеры – InfAM63 и InfAM258, характерные для вируса гриппа типа А и специфичные праймеры InfBM26 и InfBM293, характерные для вируса гриппа типа В. Специфичность полимеразной цепной реакции была протестирована на нескольких штаммах вируса гриппа типов А и В, полученных из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК. Высокая специфичность тест-системы обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для вируса гриппа типов А и В фрагмент РНК. Чувствительность разработанной полимеразной цепной реакции определена путем проведения реакции с различными разведениями вирусной РНК. Порог чувствительности вируса гриппа типов А и В составляет 1×10^2 копий РНК (0,1 пг) в пробе. Диагностика вируса гриппа типов А и В с использованием полимеразной цепной реакции позволяет точно и очень быстро (~ 5-6 часов) выявлять РНК вируса гриппа типов А и В из клинического материала. При этом возможно одновременное исследование РНК вируса гриппа на типы А и В.

Ключевые слова: вирус гриппа, ПЦР, специфические праймеры, амплификация, специфичность, чувствительность.

This paper presents the method we developed for detecting RNA of influenza A and B viruses using multi-primer polymerase chain reaction. This technique is based on simultaneous laboratory diagnostics of influenza A and B viruses using polymerase chain reaction and differs by high specificity and sensitivity, which allows to detect minimum amount of influenza virus RNA copies in a test sample. During development of the given method we have selected such specific primers as InfAM63 and InfAM258 for influenza A virus and InfBM26, InfBM293 for influenza B virus. Specificity of the polymerase chain reaction was tested on several strains of the influenza A and B viruses, obtained from the collection of microorganisms of the RIBSP. The polymerase chain reaction identifies in a material the unique DNA fragments specific to influenza A and B viruses. The sensitivity of the test is determined by polymerase chain reaction with various dilutions of viral RNA. The sensitivity threshold of the influenza A and B viruses on the basis of polymerase chain reaction is 1×10^2 RNA copies (0.1 pg) in a sample. Diagnostics using polymerase chain reaction allows accurately and quickly (~ 5-6 hours) to detect the RNA of the influenza A and B viruses in a clinical material. It is possible to study the RNA of the influenza A and B viruses simultaneously.

Key words: influenza virus, PCR, specific primers, amplification, specificity, and sensitivity.

Бұл мақалада біздің көмегімізбен жобаланған мультипраймерлі полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) пайдалана отырып, құс тұмауы вирусының А және В типтерінің РНК-сын анықтауға арналған әдіс көрсетілген. Осы әдіс зерттелетін сынамадағы тұмау вирусының РНК көшірмелер санының ең аз мөлшерін анықтауға мүмкіндік беруге және жоғары телімділігі мен сезімталдығымен ерекшеленуге, тұмау вирусының А және В типтерін ПТР әдісімен бір уақытта зертханалық диагностикалауға негізделген. Сынамада ПТР негізіндегі тұмау вирусының А және В типтерінің сезімталдығы РНК-ның 1×10^2 көшірмесін құрайды. Құс тұмауы вирусының А және В типтерін сәйкестендіруге арналған полимеразды тізбекті реакция әдісін әзірлеу кезінде құс тұмауы вирусының А типіне – InfAM63 и InfAM258 және құс тұмауы вирусының В типіне – InfBM26 и InfBM293 тән телімді праймерлер таңдалды. ПТР әдісті пайдалана отырып тұмау вирусының А және В типтерін диагностикалау клиникалық материалдан алынған тұмау вирусының А және В типтерінің РНК-сын нақты және өте жылдам (~ 5-6 сағат) анықтауға мүмкіндік береді. Осылай бола тұра құс тұмауы вирусының А және В типтерінің РНК-сы бір мезгілде зерттелуі мүмкін.

Түйін сөздер: тұмау вирусы, ПТР, телімді праймерлер, амплификация, телімділік, сезімталдық.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА ТИПОВ А И Б МЕТОДОМ ПЦР

Введение

За последнее десятилетие широкое распространение получили молекулярные методы диагностики гриппа типов А и Б. Наиболее известные и эффективные методы – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Их принцип основан на многократном умножении участка генома инфекционного агента с последующей его идентификацией. Время анализа для выявления инфекционного агента в материалах такими методами снижается до одного дня, их чувствительность не уступает традиционным методам [1].

На основании структурных различий нуклеопротеида выделяют 3 типа вируса гриппа: А, Б и С. Вследствие особенностей генома вирусу гриппа А свойственна чрезвычайно высокая изменчивость. Это позволяет им вызывать сезонные эпидемии среди людей, вспышки с высоким процентом смертности среди животных и птиц, и является реальной угрозой возникновения пандемий [2].

Известно, что природным резервуаром вируса гриппа типа А являются водоплавающие птицы, сохраняющие все 15 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы вируса гриппа А. У диких водоплавающих птиц вирусы гриппа реплицируются преимущественно в клетках, выстилающих слизистую оболочку кишечника, без проявления признаков заболевания. При этом вирус выделяется в больших количествах с экскрементами. У людей пандемии гриппа вызывали подтипы H1N1, H2N2, H3N2 [3,4].

В настоящее время происхождение подтипов H2N2, H3N2 ассоциируется с генетической реассортацией между вирусами человека и птиц, а пандемический подтип H1N1, **вероятно возник** вследствие реассортации между вирусами гриппа человека и свиньи [5]. Считается, что промежуточным хозяином являются свиньи, так как эти животные могут служить хозяином как птичьей, так и человеческой инфекции [6]. Молекулярно-биологические исследования показали, что свиньи имеют рецепторы и для птичьего вируса гриппа, и для вируса гриппа человека. Особенно четко прослежена роль этих животных в межвидовой

трансмиссии вируса гриппа А, подтипа H1N1. Таким образом, пандемический штамм может возникнуть в результате генетической реассортации между вирусами гриппа человека и птиц в организме свиньи [7].

Для вируса гриппа Б характерно наличие только одного типа гемагглютинина и нейраминидазы. Этот вирус также способен изменять свою антигенную структуру, продуцируя новые штаммы. Однако он более устойчив. По этой причине вирусы гриппа типа Б не вызывают пандемии и обычно являются причиной локальных вспышек [8]. Болезнь при инфицировании вирусом гриппа Б, как правило, протекает в более лёгкой форме, поражая чаще всего людей молодого возраста. Характерной особенностью вируса гриппа Б является то, что он циркулирует только в человеческой среде.

Существуют много публикаций [9,10,11], посвященных разработке тестов для обнаружения вируса гриппа на основе ПЦР. Однако вариабельность генома вируса гриппа вызывает серьезные проблемы при диагностике и иногда является причиной появления ложно отрица-

тельных результатов. В этой связи, важной задачей явилось создание более чувствительного теста, позволяющие выявлять не только вирус гриппа типа А, но также и тип Б. В связи с чем, цель нашего исследования состояла в разработке быстрого и чувствительного метода на основе мультипраймерной ПЦР для скрининга клинических образцов на наличие вируса гриппа типов А и Б.

Материалы и методы исследований

В данном исследовании используемые 9 штаммов гриппа типа А, 4 штамма гриппа типа Б, 3 штамма гриппа типа С, в качестве возбудителей, вызывающие респираторные заболевания *Adenovirus; Enterovirus; Coronovirus; Herpesvirus; Escherichia coli*. были взяты из коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) КН МОН РК.

Список штаммов из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК использованных в работе, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Вирусы из коллекции микроорганизмов НИИПББ, использованные в работе

№	Штамм	Характеристика штамма	Год выделения
Грипп типа А			
1	A/Astana/818/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
2	A/Astana/830/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
3	A/Gvardeyskiy/07/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
4	A/Taraz/01/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
5	A/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)	вирулентный	2007
6	A/лошадь 1/Киргизия/74(H7N7)	вирулентный	1993
7	A/утка/Павлодар/05/1 (H5N1)	вирулентный	2005
8	A/домашний гусь/Павлодар/05(H5N1)	вирулентный	2005
9	A/крачка/Южная Африка/61(H3N5)	вирулентный	1988
Грипп типа Б			
10	B/Санкт-Петербург/30/09, линия B(V)	линия Victoria	2008
11	B/Самара/97/08, линия B(Y)	линия Yamagata	2009
12	B/Brisbane 60/2008, линия B(V)	вирулентный	2008
13	B/Санкт-Петербург/30/09, линия B(V)	линия Victoria	2008
Грипп типа С			
14	C/Ленинград/232/9/83	вирулентный	2012
15	C/Улан-Уде/34/86	вирулентный	2012
16	C/Taylor/1233/47	вирулентный	2012
<i>Adenovirus</i> (Инфекционный гепатит собак (ИГС))			
17	Гевак (ИГС)	вакцинный	1994

№	Штамм	Характеристика штамма	Год выделения
<i>Enterovirus</i> (Везикулярная болезнь свиней (ВЭС))			
18	Италия 3/73-113 (ВЭС)	вирулентный	1997
<i>Coronavirus</i> (Инфекционный бронхит птиц (ИБП))			
19	Коннектикут (ИБП)	вирулентный	1987
20	Чапаевский (ИБП)	вирулентный	1989
<i>Herpesvirus</i> (ИЛТ, ИРТ)			
21	Майкудукский (ИЛТ)	вирулентный	2002
22	Актюбек (ИРТ)	вирулентный	2001
<i>Escherichia coli</i>			
23	E. coli K-18		1994

Подбор и синтез специфических праймеров.

Для всех полноразмерных кодирующих последовательностей нуклеотидов вируса гриппа типов А и Б проведено множественное выравнивание с использованием программного обеспечения «Mega 6.0» по алгоритму «Clustal W». Нуклеотидные последовательности выравнивались методом «прогрессивного множественного выравнивания». Анализ специфичности подобранных олигонуклеотидных праймеров проведен с использованием программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), где можно сравнить имеющуюся последовательность с последовательностями из базы данных на сервере NCBI BLAST-анализа (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Синтез праймеров осуществлён на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems (США).

Выделение РНК вируса гриппа типов А и Б проведено бесфенольным методом с использованием лизирующих и промывочных растворов [12].

Синтез кДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили после получения РНК. Реакционная смесь для синтеза кДНК вируса гриппа состояла: буфер для синтеза кДНК, 5×буфер – 6 мкл; 10 mM dNTP mix – 0,6 мкл; MgSO₄ – 2,4 мкл; праймер для кДНК Uni12 – 1,0 мкл; фермент MMLV ревертаза (Invitrogen, США) – 0,6 мкл; деионизированная стерильная вода – 15,4 мкл; РНК – 4 мкл, с концентрацией 85 пмоль. Подготовленную смесь обратной транскрипции инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем при температуре 42 °С и инкубировали в течение 60 мин. Далее инкубировали при 94 °С 2 мин. Синтезируемая кДНК хранилась при минус 20 °С продолжительное время. Амплификацию

проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 2720, Applied Biosystems (США).

Постановка ПЦР с синтезированной кДНК.

Проведена наработка фрагментов кДНК генов типов А и Б вируса гриппа с помощью набора Taq полимеразы фирмы «Силекс» (Россия). Для постановки ПЦР использована мультипраймерная система, т.е. смесь специфических праймеров гриппа А – InfAM68F – 5'-GTTC-CGTCAGGCCCTCAA-3' и InfAM253R – 5'-ACGCTGCAGTCCTCGCTCAC-3', вируса гриппа Б – InfBM26F – 5'-TGTCGCT-GTTTGGGAGACACA-3' и InfBM293R – 5'-GCTGTTGTTCCCATTCCTGA-3'.

Размеры амплифицируемых участков кДНК для вируса гриппа типов А и Б составляют 185 п.н. и 267 п.н., соответственно.

Общая реакционная смесь на одну реакцию состоит из следующих компонентов: x10 ПЦР буфер – 5 мкл; 10 mM dNTP mix – 1 мкл; Taq ДНК полимеразы (5 ед.) – 0,8 мкл; кДНК – 5 мкл, концентрация – 85 пмоль; по 1 мкл каждого праймера с концентрацией 20 пмоль; деионизированная стерильная вода – 34,2 мкл.

Температурно-временной режим амплификации проведен согласно программе: 1) 94°С – 2 мин.; 2) 35 циклов 94°С – 30 с., 55°С – 30 с., 72°С – 1 мин., пост-амплификация 72°С – 7 мин. В качестве положительного контроля использованы плазмидные ДНК, содержащие фрагменты генов М вируса гриппа типов А и Б, а в качестве отрицательного контроля использована деионизированная вода. Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 2720, Applied Biosystems (США).

Анализ продуктов ПЦР. Анализ продуктов проведён в 2 % агарозном геле, содержащем 1

мкл/мл бромистого этидия в ТВЕ буфере. Использован аппарат для анализа нуклеиновых кислот G-100, Pharmacia (Швеция).

Результаты

В настоящее время уже имеются публикации [13,14], посвященные разработке праймеров для обнаружения вируса гриппа на основе метода полимеразной цепной реакции. В связи с этим для нас важной задачей явилось создание чувствительного теста, позволяющий выявлять все вирусы гриппа, относящиеся к типам А и Б.

Для конструирования специфичных праймеров проведено сравнение нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса гриппа типов А и Б. При подборе праймеров учтены все возможные критерии, влияющие на дальнейшую амплификацию.

В качестве мишени для подбора праймеров на вирус гриппа типов А и Б выбрана область М гена, который является высококонсервативным участком генома. На эту область были подобраны две пары специфических праймеров, для вируса гриппа А – InfAM68F и InfAM253R, для вируса гриппа Б – InfBM26 и InfBM293, амплифицирующие участок длиной 185 и 267 п.н., соответственно.

Для определения специфичности ПЦР использованы вирусы гриппа: А/Gvardeyskiy/07/2009 (H1N1); А/Astana/818/2009 (H1N1); А/Astana/830/2009 (H1N1); А/Taraz/01/2009 (H1N1); А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8); А/лошадь 1/Киргизия/74(H7N7); А/утка/Павлодар/05/1 (H5N1); А/домашний гусь/Павлодар/05(H5N1); А/крачка/Южная Африка/61(H3N5); В/Санкт-Петербург/30 /09, линия В(V); В/Самара/97/08, линия В(Y); В/Brisbane 60/2008, линия В(V); С/Ленинград/232/9/83; С/Улан-Уде/34/86; С/Taylor/1233/47. Также использованы возбудители, вызывающие респираторные заболевания: инфекционный гепатит собак; везикулярная болезнь свиней; инфекционный бронхит птиц; инфекционный ларинготрахеит птиц; E. coli. В качестве отрицательного контроля при определении специфичности ПЦР применена деионизированная вода. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Размер полученных фрагментов при гриппе А соответствовал расчетному значению 185 п.н., а при гриппе Б 267 п.н. (рис. 1).

При определении специфичности метода для диагностики вирусов гриппа типов А и Б методом ПЦР было установлено, что во всех пробах, со-

держащих кДНК вируса гриппа А (пробы № 1-9) нарабатывались специфические продукты реакции – фрагменты ДНК размером 185 п.н., а в пробах, содержащих кДНК вируса гриппа Б (пробы № 10-12) нарабатывались специфические продукты реакции – фрагменты ДНК размером 267 п.н.

Отрицательные результаты были получены при использовании вирусов гриппа типа С, штаммов С/Ленинград/232/9/83; С/Улан-Уде/34/86; С/Taylor/1233/47. Также отрицательные результаты были получены при использовании возбудителей, вызывающие респираторные заболевания. В качестве возбудителей, вызывающие респираторные заболевания использованы: инфекционный гепатит собак; везикулярная болезнь свиней; инфекционный бронхит птиц; инфекционный ларинготрахеит птиц; E. coli. Отсутствие каких-либо продуктов амплификации наблюдается и с деионизированной водой (ОК – отрицательный контроль).

При определении чувствительности ПЦР метода использованы отработанные оптимальные температурно-временные условия реакции и были взяты 10-кратные разведения РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг (1×10^8 копий РНК) до 0,01 пг (1×10 копий РНК). Полученные результаты представлены на рисунке 2 и 3.

При оценке чувствительности метода при тестировании 10-кратных разведении РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг (1×10^8 копий РНК) до 0,01 пг (1×10 копий РНК) порог чувствительности составил 0,1 пг или 1×10^2 копий РНК вируса гриппа типов А и Б.

Обсуждение

ПЦР тест-системы являются наиболее совершенными диагностическими средствами молекулярной биологии, молекулярной генетики и клинической лабораторной диагностики, позволяющими выявлять в тканях и биологических жидкостях организма единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний. В настоящее время значительно возросли требования, предъявляемые к диагностическим препаратам. Применяемые диагностические ПЦР тест-системы должны обладать помимо быстроты ответа, высокой чувствительностью, гарантировать обнаружение вируса в материалах с малым его содержанием, а также обеспечивать дифференциацию близкородственных вирусов.

Результаты целого ряда исследований [9-11], свидетельствуют о применении ПЦР диагностики при идентификации гриппа.



*М – Маркер; 50 bp BioLabs; о.к. – Отрицательный контроль; (Вирусы гриппа типа А – 1-9)
 1- штамм A/Gvardeyskiy/07/2009(H1N1); 2 – штамм A/Astana/818/2009(H1N1); 3- штамм A/
 Astana/830/2009(H1N1); 4 – штамм A/Taraz/01/2009(H1N1); 5 – штамм A/лошадь/Отар/764/07(H3N8);
 6 – штамм A/лошадь/Киргизия/74(H7N7); 7 – штамм A/утка/Павлодар/05/1(H5N1); 8 – штамм A/ до-
 машиний гусь/ Павлодар/05(H5N1); 9 – штамм A/крячка/Южная Африка/61(H3N5);
 (Вирусы гриппа типа В – 10-12) 10 – штамм В/Санкт-Петербург/03/09, линия В(V); 11 – штамм В/
 Самара/97/08, линия В(Y); 12 – штамм В/ Brisbane 60/2008, линия В(V);
 13 – штамм “Гевак”(ИГС); 14 – штамм “Италия”(ВЭС); 15 – штамм “Коннектикут”(ИБП); 16 –
 штамм “Майкудукский”(ИЛТ); 17 – штамм 3/Белорусский; 18 – штамм “Италия”(ВЭС); 19 – штамм
 “Чапаявский”(ИБП); 20 – E. coli K-18; 21 – штамм “Актюбек” (ИРТ); (Вирусы гриппа типа С – 22-24)
 22 – штамм С/ Ленинград/232/9/83; 23 – штамм С/Улан-Уде/34/86; 24 – штамм С/Taylor/1233/47;
 п.к. – положительный контроль – смесь кДНК вирусов гриппа типов А и В (А + В).*

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа В InfBM26F – InfBM293R



М ОК 1 2 3 4 5 6 7 8 М

*М – Маркер 50 bp BioLabs; Использовали РНК вируса A/Astana/818/2009(H1N1) в следующих концентраци-
 ях: 1 – 100 нг (1x10⁸ копий РНК); 2 – 10 нг (1x10⁷ копий РНК); 3 – 1 нг (1x10⁶ копий РНК); 4 – 100 пг (1x10⁵
 копий РНК); 5 – 10 пг (1x10⁴ копий РНК); 6 – 1 нг (1x10³ копий РНК); 7 – 0,1 нг (1x10² копий РНК); 8 – 0,01
 пг(1x10 копий РНК).*

Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа В InfBM26F – InfBM293R



М – Маркер 50 bp BioLabs; Использовали РНК вируса Б/Brisbane 60/2008, линия В(В) в следующих концентрациях: 1 – 100 нг (1x10⁸ копий РНК); 2 – 10 нг (1x10⁷ копий РНК); 3 – 1 нг (1x10⁶ копий РНК); 4 – 100 нг (1x10⁵ копий РНК); 5 – 10 нг (1x10⁴ копий РНК); 6 – 1 нг (1x10³ копий РНК); 7 – 0,1 нг (1x10² копий РНК); 8 – 0,01 нг (1x10 копий РНК).

Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа Б InfBM26F – InfBM293R

На сегодняшний день необходимость мониторинга вируса гриппа у человека, животных и птиц чрезвычайно велика. Вирусологические методы обнаружения вируса гриппа (пассирование на куриных эмбрионах или на культуре клеток с последующей идентификацией в реакции гемагглютинации или реакции торможения гемагглютинации) надежны и чувствительны, однако они довольно трудоемки и на их выполнение требуется от 1 до 2 недель.

В настоящей работе представлена разработанная методика для одновременной лабораторной диагностики вируса гриппа типов А и Б методом ПЦР. Для оценки результативности и достоверности теста была определена специфичность и чувствительность ПЦР для выявления РНК вируса гриппа. При сравнении нуклеотидных последовательностей генома вируса гриппа были выбраны группы праймеров специфичных для двух типов, которые могут выявлять РНК вируса гриппа типов А и Б одновременно.

Специфичность ПЦР была протестирована на нескольких штаммах вируса гриппа типов А и Б, полученных из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК. Высокая специфичность ПЦР тест-системы обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для вируса гриппа типов А и Б фрагменты ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов в отличие от иммунологических ме-

тодов анализа, где могут быть ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

Чувствительность разработанной ПЦР определена путем проведения ПЦР с различными разведениями вирусной РНК. На проведение ПЦР брали 10-ти кратные разведения РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг до 0,01 пг. При этом, порог чувствительности тест-системы для диагностики гриппа типов А и Б на основе ПЦР набора составляет 1x10² копий РНК вирусов в пробе.

Разработанный метод для лабораторной диагностики вируса гриппа типов А и Б на основе ПЦР является специфичным и высокочувствительным, обеспечивает высокий уровень диагностических исследований и может быть использована для проведения мониторинга гриппа.

Выводы

В результате проведенных исследований по разработке метода для идентификации вируса гриппа типов А и Б методом ПЦР можно сделать следующие выводы:

- подобрана пара специфичных праймеров – **InfAM63 и InfAM258, амплифицирующие участок** длиной 185 п. н., характерная только для вируса гриппа типа А;
- подобрана пара специфичных праймеров – **InfBM26 и InfBM293, амплифицирующие участок** длиной 267 п. н., характерная только для вируса гриппа типа Б;
- разработанный метод на основе ПЦР яв-

ляется высокочувствительным и специфичным при диагностике вируса гриппа типов А и Б.

- данный метод постановки ПЦР при выявлении вируса гриппа типов А и Б позволяет проводить диагностику вируса при содержании в исследуемом материале 1×10^2 копий геномной вирусной РНК.

Таким образом, разработанный метод позволяет с довольно высокой степенью точ-

ности в короткие сроки выявлять РНК вируса гриппа типов А и Б в пробе, с использованием специфических праймеров и диагностировать данную инфекцию за 3,5-4 часа. При этом возможно одновременное исследование большого количества проб. Полученные данные являются основой разработки тест-системы методом ПЦР для идентификации вируса гриппа типов А и Б.

Литература

- 1 Quilivan M., Cullinane A., Nelly M., et al. Comparison of Sensitivities of Virus Isolation, Antigen Detection and Nucleic Acid Amplification for Detection of Equine Influenza Virus // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 42, No. 2. – P. 759-763.
- 2 Kamps B. S., Hoffmann C., Preiser W. Influenza Report 2006 / B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser W. – Flying Publisher, 2006.
- 3 Wright S.M., Kawaoka Y., Sharp G.B., e.a. Interspecies transmission and reassortment of influenza Aviruses in pigs and turkeys in United States // *Arm J Epidemiol.* – 1992. – Vol. 136. – P. 448-97.
- 4 Blinov V.M., Kiselev O.I. An analyses of the potential areas of recombination in the hemmagglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man // *Vopr. Virusol.* – 1993. – Vol.38, No 6. – P. 263-268.
- 5 Kida H., Ito T., Yasuda J., e.a. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs // *J Gen Virol.* – 1994. – Vol.74. – P.2183-2188.
- 6 Webster R.G. The importance of animal influenza for human disease // *J. Vac.* – 2002. – Vol. 20, No. 2. – P.16-20.
- 7 Hiromoto Y., Yamazaki Y., Fukushima T., e.a. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus // *J Gen Virol.* – 2000. – Vol.81. – P. 1293-1303.
- 8 Flandorfer A., Garcia-Sastre A., Basler C. and Palese P. Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin // *J. Virol.* – 2003. – Vol.77. – P. 9116-9123.
- 9 Fouchier R. A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene // *J Clin Microbiol.* – 2000. – Vol.38. – P. 4096-4101.
- 10 Boom R., Sol C., Salimans M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 495-503.
- 11 WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrnscs20025rev.pdf>)
- 12 Патент «Способ бесфенольного выделения нативной РНК высокопатогенного вируса гриппа птиц из вирусосодержащего материала для постановки полимеразной цепной реакции», № 60599 от 29.01.2007 Султанкулова К.Т., Сандыбаев Н.Т., Зайцев В.Л., Жолдыбаева Е.В., Строчков В.М., Мамадалиев С.М.
- 13 Spackman E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR // *J. Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1161. – P. 105-108.
- 14 Bin Zhou, Matthew E. Donnelly., Derek T. Scholes, Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses // *J. Virol.* – 2009 Oct. – Vol. 83(19). – P. 10309-10313.

References

- 1 Quilivan M, Cullinane A, Nelly M, et al. (2000) Comparison of Sensitivities of Virus Isolation, Antigen Detection and Nucleic Acid Amplification for Detection of Equine Influenza Virus. *Clin Microbiol*, 42(2):759-763.
- 2 Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W (2006) Influenza Report 2006 (Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W), Flying Publisher
- 3 Wright SM, Kawaoka Y, Sharp GB, e.a. (1992) Interspecies transmission and reassortment of influenza Aviruses in pigs and turkeys in United States. *Arm J Epidemiol*, 136:448-97.
- 4 Blinov VM, Kiselev OI (1993) An analyses of the potential areas of recombination in the hemmagglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man. *Vopr Virusol*, 38(6):263-268.
- 5 Kida H, Ito T, Yasuda J, e.a. (1994) Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol*, 74:2183-2188.
- 6 Webster RG (2002) The importance of animal influenza for human disease. *J. Vac*, 20(2):16-20.
- 7 Hiromoto Y, Yamazaki Y, Fukushima T, e.a. (2000) Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. *J Gen Virol*. 81:1293-1303.
- 8 Flandorfer A, Garcia-Sastre A, Basler CF and Palese P (2003) Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin. *J. Virol*, 77:9116-9123.
- 9 Fouchier RA et al. (2000) Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol*, 38:4096-4101.

- 10 Boom R, Sol C, Salimans M (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin Microbiol*, 28:495-503.
- 11 WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>)
- 12 Patent «A method for the phenol-free isolation of native RNA of a highly pathogenic avian influenza virus from a virus-containing material for polymerase chain reaction» № 60599 from 29.01.2007 Sultankulova KT, Sandybayev NT, Zaitsev VL, Zholdybaeva EV, Stochkov VM, Mamadaliev SM (In Russian)
- 13 Spackman E (2014) Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *J. Methods Mol Biol*, 1161:105-108.
- 14 Bin Z, Matthew ED, Derek TS (2009) Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol*, 83(19):10309-10313.

