

УДК 578.832.1.083.2

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПАНДЕМІЧНОГО ШТАМУ ВІРУСУ ГРИПУ А (H1N1 2009) ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

С. В. Степанюк¹
М. І. Вудмаска¹
С. Л. Рибалко²
М. Я. Співак³

¹ПрАТ НВК «Діапроф-Мед», Київ
²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л. В. Громашевського НАМН України», Київ
³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Отримано 25.07.2012

Віруси грипу А посідають істотне місце в структурі захворюваності людей на гострі респіраторні вірусні інфекції, що становлять майже до 90% від усіх інших інфекційних хвороб. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, тільки на тяжкі форми грипу в світі щорічно хворіють 3–5 млн. людей, із них 45–60% — діти. Економічні збитки від сезонного епідемічного грипу сягають близько 85% економічних втрат від інфекційних хвороб загалом.

Досвід боротьби з грипом, накопичений за останні роки, показав, що для розроблення та проведення ефективних протиепідемічних заходів необхідно побудувати систему постійного моніторингу за циркуляцією вірусу грипу, що ґрунтується на використанні лабораторних методів точної і швидкої ідентифікації та характеристики циркулюючих штамів вірусу грипу А. Серед методів лабораторної діагностики грипу найбільш ефективним вважають метод полімеразної ланцюгової реакції. У роботі наведено дані з розроблення діагностичної тест-системи у форматі двостадійного мультиплексного RT-PCR-аналізу в режимі реального часу для виявлення та генотипування пандемічного вірусу грипу А (H1N12009). Результати лабораторно-експериментальних досліджень тест-системи DIA Influenza H1N1 показали, що вона є ефективною та специфічною для виявлення каліфорнійських штамів пандемічного вірусу грипу А (H1N12009) і може бути використана для діагностики захворювань, зумовлених цим штамом вірусу. Проведені клінічні випробування в ході державної реєстрації в МОЗ України показали чутливість та специфічність тест-системи DIA Influenza H1N1 на рівні 100%.

Ключові слова: пандемічний вірус грипу А(H1N1), полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, діагностична тест-система.

Грип є найпоширенішим інфекційним захворюванням. Під час щорічних епідемій грипу близько 5–15% населення страждають від інфекцій верхніх дихальних шляхів. Смертність констатують переважно в групах високого ризику (літніх, хронічно хворих людей). Хоча важко оцінити об'єми щорічних епідемій, однак, за даними експертів ВООЗ [1–3], у всьому світі реєструють близько 3–5 млн. тяжких випадків захворювання і від 250 000 до 500 000 — зі смертельним наслідком. Висока вірулентність вірусу та постійні мутації, що пов'язані з особливістю геному грипу, призводять до появи нових підтипів вірусу, проти яких у людей немає імунітету. Із цієї причини виникають епідемії та пандемії, що супроводжуються різким підвищенням захворюваності та високою смертністю [4, 5].

У період пандемій захворюваність і смертність від грипу А набувають катастрофічних масштабів. Наприклад, пандемія «іспанки» (1918–1919 рр.) спричинила захворювання близько 600 млн. та загибель 50–100 млн. людей (тобто 30% та 5% населення Земної кулі, відповідно). Пандемія «азійського грипу» (1957–1959 рр.) стала причиною загибелі понад 1 млн.; пандемія «гонконгського грипу» (1968–1970 рр.) — близько 1 млн.; велика епідемія «російського грипу» (1977–1978 рр.) — близько 300 тис. людей [6, 7]. Сучасна пандемія «свинячого грипу» (2009–2010 рр. A/California/07/09 (H1N1) swl) на кінець березня 2010 р., за даними ВООЗ, стала причиною понад 17 тис. летальних наслідків і є наймасштабнішою з погляду витрат і зусиль міжнародного співтовариства, спрямованих на проведення протиепідемічних заходів [8, 9].

Вірус «свинячого грипу» H1N1 було виявлено наприкінці березня 2009 р. в Мексиці, США і Канаді, де було зареєстровано перші випадки захворювання з летальним наслідком. У квітні того самого року ВООЗ оголосила пандемію свинячого грипу, поступово піднімаючи рівень загрози, оскільки вірусна інфекція поширювалась країнами і континентами блискавично [1]. Інфекція нового штаму грипу спричинила вкрай тяжку форму первинної вірусної пневмонії, яка швидко прогресувала і часто призводила до летального результату, чим відрізнялася від клінічної картини захворювання в період спалахів епідемій сезонним грипом [2].

Спостерігаючи за швидким розвитком епідемічного процесу грипу A(H1N1)2009 та беручи до уваги можливі масові захворювання людей в Україні саме на Каліфорнійський штаму вірусу (A/California/07/09 (H1N1)), у квітні 2009 року нами були розпочато дослідження, метою яких є створення діагностичної тест-системи для виявлення та генотипування вірусу грипу A(H1N1)2009 — Каліфорнійський варіант на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-Time RT-PCR).

Матеріали і методи

Клінічні зразки носоглоткових змивів хворих на гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) людей. У дослідженнях використовували клінічні зразки в кількості 10 (носоглоткові змиви), отримані від хворих на ГРВІ з Головного військового клінічного госпіталю МО України. Ці зразки попередньо було протестовано за допомогою тест-системи Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), виробництва компанії Seegene Inc (Південна Корея) та рекомендованого ВООЗ протоколу TaqMan Influenza A (H1N1) Assay Sets [1].

Культуральні зразки вірусів грипу А. У роботі було використано алантоїсні культури сезонних штамів вірусу грипу: A/FM1/47 (H1N1); A/Panama/2007/99 (H3N2); B/Hong Kong/330/01. Культури штамів одержали з WHO Collaborating Center for Influenza, CDC (США).

Виділення РНК вірусів. Виділення та очищення вірусної РНК проводили із застосуванням таких наборів реактивів: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Німеччина), Viral RNA Isolation Kit, NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel GmbH, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Для моніторингу крос-контамінації під час виділення РНК використовували негативні контролю (проби стерильної води, не контаміновані ДНК, РНК). Для підви-

щення ефективності етапу виділення РНК в кожен пробу клінічного зразка додавали внутрішній контрольний зразок (ІС).

Виготовлення позитивних контролів тест-системи. Для конструювання позитивних контрольних зразків, що входили до складу тест-системи, застосовували технологію отримання плазмід, що містять рекомбінантні фрагменти кДНК вірусу грипу А. Усі процедури виконували відповідно до протоколів, що описані в посібнику «Molecular cloning: a laboratory manual» [10].

Точність синтезу вставок генів вірусу грипу, вбудованих у плазмід, перевіряли за допомогою автоматичного секвенатора 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) та набору реагентів BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Дизайн праймерів і ДНК-зондів. У роботі використовували висококонсервативні ділянки досліджуваних нами генів вірусу грипу пандемічних штамів A(H1N1)2009, доступних у базі даних NCBI [11]. Дизайн праймерів і ДНК-зондів (варіант TaqMan probe) здійснювали за допомогою програми Primer Express V.2 (Applied Biosystems). ДНК-зонди містили такі флуоресцентні та нефлуоресцентні барвники: FAM, VIC, BHQ1, BHQ2. Було також використано 3–4 варіанти пар праймерів та зондів до кожного гена вірусу грипу і внутрішнього контролю ІС.

Аналіз Real-Time RT-PCR. Порівнювали такі набори реактивів: AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Ambion, США), TaqMan One Step RT PCR Master Mix (Applied Biosystems, США), qPCRmix-HS, Revertasa-Mint (Євроген, Росія), RevertAid™ H Minus Ferst Standard cDNA Synthesis Kit (Fermentas Inc., Литва). Концентрацію кожного праймера і ДНК-зонду підбирали в різних комбінаціях, компоненти кожного набору — згідно з інструкцією виробника. В реакцію включали 5 µL очищеного препарату РНК вірусу. Реакцію Real-Time RT-PCR проводили з використанням обладнання та програмного забезпечення ABI PRIZM 7000 (Applied Biosystems, США). Підбір оптимальних умов кожної стадії температурного режиму реакції Real-Time RT-PCR здійснювали експериментальним шляхом.

Визначення параметрів специфічності та чутливості діагностичної тест-системи. Специфічність мультиплексної реакції Real-Time RT-PCR оцінювали за перехресною реакцією з РНК, виділеною з культуральних зразків, що містять інші підтипи вірусу грипу, а також неінфіковану культуральну рідину. Крім того, використовували клінічні зразки здорових людей. Межу чутливості тесту визначали, застосовуючи внутрішньовиробничі панелі ПП-101 ВПП-01, до

складу яких входили зразки біологічного матеріалу з різною концентрацією рекомбінантних плазмід, що містили синтетичні вставки генів вірусу грипу (М-ген, Н1 та N1).

Результати та обговорення

Молекулярно-генетичний аналіз штампів вірусу грипу А (H1N12009). Для розроблення ефективної методики діагностики пандемічного штаму вірусу грипу А(H1N1) 2009 нами було досліджено нуклеотидні послідовності близько 20 штампів вірусу, що потрапили до бази даних GeneBank NCBI з березня до травня 2009 р. [11]. Теоретичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів вірусу грипу А(H1N1)2009, особливо тих, які було виділено від людей, померлих від високопатогенної грипоподібної інфекції у Мексиці, США та Канаді в квітні 2009 р., показав спорідненість майже на 95% цих вірусів зі штамом А/California/07/09 (H1N1), що був обраний нами як модель для дослідження і згодом кваліфікований ВООЗ, як Каліфорнійський штамп з пандемічним потенціалом.

Окрім того, у літературі з'явилися результати досліджень інших авторів, що виявили істотні відмінності нуклеотидних послідовностей генів вірусу каліфорнійських штампів від сезонних штампів грипу А (H1N1), які циркулювали серед населення до 2009 р. Вчені у США і в Євразії об'єктивно показали, що це — новий варіант вірусу грипу А (H1N1) — потрібний реасортант, який поєднує сегменти РНК, похідні від штампів грипу людини, свиней і птахів [12–16]. Відтак стало зрозуміло, що діагностика пандемічних штампів потребує розроблення таких діагностичних тестів, за допомогою яких можна було б ефективно диференціювати пандемічні від сезонних штампів вірусу грипу.

Використовуючи власні напрацювання 2006 р. під час розроблення тест-системи Real-Time RT-PCR DfA-Influenza H5N1, яка призначена для діагностики пташиного грипу А (H5N1) [17], як діагностичні маркери інфекції пандемічного грипу А(H1N1)2009 ми відібрали лише три гени вірусу грипу: М-ген, ген гемаглютиніну (H1) та нейрамінідази (N1). Вирівнювання генетичних послідовностей зазначених генів вірусу, що були доступні в базі даних GeneBank NCBI, дало змогу визначити консервативні ділянки, які було використано для створення синтетичних позитивних контролів та підбору діагностичних праймерів і зондів.

Створення позитивних контрольних зразків. Синтетичні фрагменти генів гемаглютиніну (H1), нейрамінідази (N1) та М-гена вірусу грипу А фланкували сайтами

рестрикції EcoRI. Точність синтезу нуклеотидних послідовностей, вбудованих у плазміди, підтверджували секвенуванням. За результатами секвенування було відібрано лише по три варіанти, які перевіряли за допомогою реакції Real-Time RT-PCR.

Використання внутрішнього контрольного зразка (IC-internal control). З метою зменшення появи можливих хибнонегативних реакцій та підвищення специфічності реакції виділення РНК з клінічного матеріалу було використано внутрішній контрольний зразок (IC) на основі фага MS2, який додавали до клінічного зразка на стадії його лізису.

За результатами досліджень J. Dreier et al. [18], найбільшою проблемою аналізу Real-Time RT-PCR є присутність у клінічних зразках інгібіторів, що призводять до появи хибнонегативних результатів. Тому додавання до клінічного зразка екзогенної, неінфекційної РНК як внутрішнього контролю (IC-internal control) допомагає стандартизувати весь процес реакції Real-Time RT-PCR. Авторами запропоновано додавати фаг MS2 до зразків клінічного матеріалу для моніторингу ефективності виділення РНК, зворотної транскрипції та реакції ампліфікації для виявлення РНК вірусів людини.

Використана нами РНК фага MS2 проходила всі етапи виділення одночасно з РНК вірусу грипу і далі зразок очищеної РНК вірусу грипу, що містив одночасно і РНК фага, застосовували для реакції Real-Time RT-PCR на 1-й стадії аналізу: виявлення РНК вірусу грипу та РНК IC-internal control. За результатами ампліфікації IC-контролю оцінювали ефективність процесу виділення РНК із клінічного зразка та самої реакції Real-Time RT-PCR. Нами було підібрано оптимальну кількість внутрішнього контрольного зразка — 5 мкл (суспензії фага MS2 в концентрації не менше 10^{11} клітин на 1 мл) на 150 мкл клінічного зразка, яка дає змогу оцінити процес виділення вірусної РНК і ступінь її деградації. Водночас така гранична доза внутрішнього контролю не перешкоджає ампліфікації вірусної РНК в концентрації нижче 1 000 копій/мл.

Відбір методики виділення РНК з клінічних зразків. На основі попередніх досліджень під час розроблення тест-системи Real-Time RT-PCR для діагностики пташиного грипу ми відібрали методику виділення РНК вірусів за процедурою з використанням міні spin-колонок. Технологія міні spin-колонок передбачає адсорбцію РНК вірусу на кремнієвій мембрані з подальшим процесом очищення РНК від клітинних решток. Серед комерційних наборів, відібраних для дослідження (перелічені в розділі «Матеріали і методи»),

найкращі результати було отримано у разі застосування набору NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel GmbH, Німеччина). Ця методика виділення була однаково ефективною як у моно-, так і в мультиплексному варіанті, тобто одночасне виділення й очищення РНК вірусу грипу та РНК внутрішнього контролю з таких клінічних зразків, як слиз, носоглоткові змиви, мокротиння.

Підбір оптимальних умов реакції Real-Time RT-PCR. З метою зменшення часу для проведення реакції виявлення вірусу грипу А та генотипування Каліфорнійського штаму за генами Н1 та N1 ми використали методику зворотної транскрипції РНК та ампліфікації в одній пробірці. На сьогодні є комерційні набори реагентів різних виробників для вирішення поставленого завдання. За показниками точності реакції транскрипції та ампліфікації такі набори не поступаються методикам тестування в різних пробірках. Перевага однопробіркового варіанта полягає в скороченні часу тестування зразка та мінімізації впливу людського фактора на кінцевий результат. У процесі роботи ми встановили, що з перелічених в розділі «Матеріали і методи» реакційних сумішей різних виробників найкращі результати ампліфікації для розроблених нами пар праймерів та ДНК-зондів як на 1-й, так і на 2-й стадії ідентифікації вірусу грипу було отримано у разі використання комерційного набору одночасної зворотної транскрипції та ампліфікації AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Ambion, США).

Після серії експериментальних випробувань було підібрано оптимальні температурні режими роботи для праймерів та ДНК-зондів на кожній стадії ідентифікації вірусу грипу. Температурний режим роботи приладу ABI PRIZM 7000 для 1-ї стадії діагностики – скринінг для виявлення вірусу грипу А: зворотна транскрипція — 45 хв за 45 °С, інактивація ензимів зворотної транскрипції — 10 хв, 95 °С; 1 цикл, ампліфікація — 40 циклів: денатурація — 0,15 хв за 95 °С, відпал праймерів — 0,30 хв, 57 °С, подовження ланцюга ДНК — 0,30 хв за 72 °С.

На 2-й стадії діагностики – генотипування вірусу грипу А(Н1N1)2009 – Каліфорнійський варіант: зворотна транскрипція — 45 хв за 45 °С, інактивація ензимів зворотної транскрипції — 10 хв, 95 °С; 1 цикл, ампліфікація — 40 циклів: денатурація — 0,15 хв, 95 °С, відпал праймерів — 0,30 хв за 57 °С, подовження ланцюга ДНК — 0,30 хв за 72 °С.

Методики Real-Time RT-PCR. З метою мінімізації часу для діагностики пандемічного грипу А(Н1N1)2009 Каліфорнійський штаб ми розробили методику двостадійного мультиплексного аналізу Real-Time RT-PCR

(варіант TaqMan probe). У процесі створення діагностичної тест-системи було відібрано 8 пар праймерів і ДНК-зондів.

У розробленій нами тест-системі DIA Influenza H1N1, яка призначена для виявлення РНК вірусу грипу А на 1-й стадії діагностики клінічних зразків — скринінгу для виявлення вірусу грипу А — використовували праймери і TaqMan-зонд, кон'югований з двома барвниками — FAM (флуорофор) і BHQ1 (гасник флуоресценції), які ініціюють ампліфікацію ділянки гена М2 вірусу грипу А, що кодує матричний протеїн. Реакцію виявлення гена М2 проводять одночасно з детекцією ІС-контролю в мультиплексному форматі за допомогою праймерів та TaqMan-зонда, який реєстрували каналом JOE. Схему розробленого формату аналізу Real-Time RT-PCR зображено на рисунку.

На 2-й стадії діагностики – генотипування пандемічного вірусу грипу А(Н1N1)2009 — застосовували праймери і TaqMan-зонди для ідентифікації гемаглютинину Н1 та нейрамінідази N1. Реакцію генотипування Real-Time RT-PCR проводили в мультиплексному форматі з детекцією каналами FAM — Н1 і JOE — N1. Розроблені праймери та зонди є унікальними, виявляють лише генетичні послідовності каліфорнійських штабів і не мають гомології з іншими субтипами вірусу грипу А.

Оцінка аналітичних характеристик тест-системи. Діагностичну чутливість та специфічність, а також межу детекції тест-системи оцінювали спочатку за допомогою розроблених нами виробничих панелей, потім під час роботи зі штамами вірусу грипу А різних субтипів, на клінічному матеріалі, що містив і не містив вірус грипу (див. розділ «Матеріали і методи»).



Схема діагностики пандемічного вірусу грипу А(Н1N1), Каліфорнійський штаб за допомогою тест-системи DIA Influenza H1N1

За результатами досліджень внутрішньо-виробничої панелі ПП-101 ВПП-01 аналітична чутливість (межа детекції) тест-системи DIA Influenza H1N1 становила 1 000 копій/мл.

Для визначення діагностичної чутливості тест-системи DIA Influenza H1N1 використовували зразки клінічного матеріалу (носоглоткові змиви, мокротиння хворих на грип та зразки референтних препаратів хоріоналантоїсної рідини курячих ембріонів, що містили штами вірусів грипу). Дослідження зазначених зразків проводили паралельно за допомогою двох методик: тест-системи DIA Influenza H1N1 та комерційного набору праймерів і зондів, рекомендованого ВООЗ та CDC-протоколу — TaqMan Influenza A (H1N1) Assay (від 15 липня 2009 р.).

Дослідивши 10 клінічних зразків, які було отримано з військового госпіталю з позитивними результатами, підтвердженими на тест-системі Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Seegene Inc. (Корея), виявили 8 позитивних (№ 754, 258, 57/4, 32, 39, 44, 46, 47). Результати порівняльних досліджень клінічних зразків подано в таблиці.

Три зразки — №57/2, 57/3, 57/4 — було взято від одного хворого з певним інтервалом часу. Два перших зразки ідентифіковано за обома методиками як негативні. У першій

пробі цього пацієнта (зразок №57/2) за допомогою протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay не було виявлено жодного маркера вірусу грипу пандемічного штаму. У зразку № 57/3 виявили лише маркер гемаглютиніну H1 swine, що не може слугувати доказом наявності у хворого вірусної інфекції грипу пандемічного штаму згідно з рекомендаціями ВООЗ (результати подано в таблиці). Відповідну кореляцію результатів тестування цих зразків спостерігали, досліджуючи їх у тест-системі DIA Influenza H1N1. Єдиною відмінністю виявився позитивний результат у зразка № 57/3 за геном нейрамінідази (N1), але його також не можна трактувати як позитивний відповідно до інструкції тест-системи.

Два перших зразки було взято в період низького вірусного навантаження. Оскільки у тест-системі Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic) вони також мали сумнівний результат, їх ідентифікували як негативні в обох тест-системах. А третій зразок — №57/4 — був чітко ідентифікований обома тест-системами як позитивний за всіма діагностичними маркерами інфекції. Отже, можна стверджувати, що діагностична чутливість розробленої нами тест-системи DIA Influenza H1N1 досягла 100% під час

Результати тестування клінічних зразків за тест-системою DIA Influenza H1N1 (Діапроф-Мед, Україна) та рекомендованим ВООЗ і CDC-протоколом TaqMan Influenza A (H1N1) Assay

№ п/п	№ зразка	Тест-система Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Seegene Inc., Корея	Протокол ВООЗ та CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay				Тест-система DIA Influenza H1N1 (pandemic), Діапроф-Мед (Україна)			
			Грип А загальна (Ct)	Грип А swine H1 (Ct)	H1 swine (Ct)	RNaseP (внутр. контроль) (Ct)	ІС (внутр. контроль) (Ct)	Грип А загальний (Ct)	H1-2009 (pandem) (Ct)	N1-2009 (pandem) (Ct)
1	754	+	⁺ (34,51)	⁺ (31,31)	⁺ (31,26)	⁺ (24,11)	⁺ (19,29)	⁺ (28,37)	⁺ (27,40)	⁺ (30,02)
2	258	+	⁺ (32,33)	⁺ (34,51)	⁺ (30,60)	⁺ (24,00)	⁺ (20,59)	⁺ (32,09)	⁺ (33,86)	⁺ (33,90)
3	57/2	±	-	-	-	⁺ (23,48)	⁺ (21,23)	⁺ (38,27)	-	-
4	57/3	±	-	-	⁺ (38,55)	⁺ (24,93)	⁺ (20,36)	⁺ (36,13)	-	⁺ (33,41)
5	57/4	+	⁺ (32,56)	⁺ (33,73)	⁺ (32,18)	⁺ (23,13)	⁺ (22,56)	⁺ (35,27)	⁺ (25,33)	⁺ (24,60)
6	32	+	⁺ (30,12)	⁺ (29,59)	⁺ (32,44)	⁺ (20,67)	⁺ (20,39)	⁺ (25,39)	⁺ (26,69)	⁺ (25,66)
7	39	+	⁺ (34,89)	⁺ (31,17)	⁺ (28,77)	⁺ (24,36)	⁺ (18,69)	⁺ (27,27)	⁺ (26,33)	⁺ (24,48)
8	44	+	⁺ (38,14)	⁺ (37,81)	⁺ (34,21)	⁺ (24,33)	⁺ (15,18)	⁺ (13,29)	⁺ (20,98)	⁺ (23,51)
9	46	+	⁺ (38,16)	⁺ (36,77)	⁺ (33,12)	⁺ (23,15)	⁺ (15,66)	⁺ (18,19)	⁺ (23,58)	⁺ (26,54)
10	47	+	⁺ (33,38)	⁺ (37,11)	⁺ (36,17)	⁺ (25,12)	⁺ (17,53)	⁺ (25,00)	⁺ (24,89)	⁺ (25,84)

Примітка: + — позитивний результат або наявність сигналу в досліджуваному зразку;
± — невизначений результат або слабо позитивний сигнал в досліджуваному зразку;
- негативний результат або відсутність сигналу в досліджуваному зразку.

дослідження клінічних зразків, взятих від хворих на грип, що підтверджено в двох альтернативних діагностичних тестах: Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Корея, та протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay.

Дослідження двох референтних зразків хоріоналантоїсної рідини, що містили штами сезонного грипу А/ФМ1/47 (H1N1) і А/Panama/2007/99 (H3N2) за допомогою розробленої нами тест-системи DIA Influenza H1N1 показали лише позитивний результат на 1-й стадії скринінгу за М-геном, що свідчить про присутність у зразку вірусу грипу А. Водночас, за генами Н1 та N1 у цих зразках було отримано негативні результати, що вказує на відсутність Каліфорнійського штаму пандемічного вірусу грипу А(H1N1)2009.

Специфічність тесту оцінювали, досліджуючи референтний препарат вірус грипу В (В/HongKong/330/01) і неінфіковану хоріоналантоїсну рідину курячих ембріонів. Перехресних реакцій не спостерігали, що свідчить про 100%-ну специфічність тест-системи стосовно представника гетерологічної групи патогенів.

Таким чином, на підставі проведених нами досліджень було розроблено вітчизняну тест-систему DIA Influenza H1N1, яка дає змогу виявляти клінічні зразки, що містять РНК тільки пандемічного вірусу грипу А (Каліфорнійський штаб) з наступною ідентифікацією генів гемаглютинину Н1 і нейрамінідази N1 одночасно в одній пробірці у форматі двостадійного мультиплексного аналізу Real-Time RT-PCR.

Аналітична чутливість тест-системи DIA Influenza H1N1 становить 1 000 копій/мл.

Діагностична чутливість тест-системи DIA Influenza H1N1 — 100% під час дослідження клінічних зразків, взятих від хворих на грип, що підтверджено двома альтернативними діагностичними тестами: Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Корея, та протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay.

Специфічність тест-системи DIA Influenza H1N1 становила 100% стосовно гетерологічної групи патогенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/mediacentre>.
2. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu>.
3. <http://www.influenza.spb.ru>.
4. Еропкин М. Ю., Грудинин М. П., Коновалова Н. И. и др. Антигенные и генетические особенности современных вирусов гриппа в России // Материалы I Всерос. ежегодного конгресса по инфекц. болезням. — М., 30 марта–01 апреля, 2009. — С. 67.
5. Киселев О. И., Маринич И. Г., Соминина А. А. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. — СПб.: 2003. — С. 244.
6. Гендон Ю. З. Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? // Вопр. вирусол. — 1998. — № 1. — С. 43–46.
7. Супотницкий М. В. Пандемия «Испанки» 1918–1920 гг. в контексте других гриппозных пандемий и «птичьего гриппа» // 2006.
8. Lvov D. K., Shchelkanov M. Yu., Prilipov A. G. et al. Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005–2008) // Avian Dis. — 2010. — V. 54. — P. 483–495.
9. Львов Д. К. и др. Грипп остается непредсказуемой инфекцией // Вопр. вирусол. — 1998. — № 3. — С. 141–144.
10. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. — V. 1 / J. Sambrook, D. W. Russell. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
11. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
12. Glesen W. P. Emergine infections pandemic influenza // Epidemiol. Rev. — 1996. — V. 18, N 1. — P. 64–76.
13. Taubenberger J. K., Reid A. H., Lourens R. M. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes // Wafure. — 2005. — V. 437. — P. 889–893.
14. Belshe R. B. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918. — Virus // New. Engl. J. Med. — 2005. — V. 353, N 21. — P. 2209–2211.
15. Dawood F. S., Jain S., Finelli L. et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // New Engl. J. Med. — 2009. — V. 361. — P. 1–10.
16. Zimmer S. M., Burke D. S. Historical perspective — emergence of influenza A(H1N1) viruses // Ibid. — 2009. — V. 361 — P. 279–285.
17. Степанюк С. В., Найдёнов В. Г., Вудмаска М. И. и др. Разработка диагностического теста для выявления вируса гриппа А (H5N1) с применением метода мультиплексного Real-Time RT-PCR // Біол. системи. — 2010. — № 4. — С. 35.
18. Dreier J., Stormer M., Knut K. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Ntanscription-PCR Assays // J. Clin. Microbiol. — 2005. — V. 43, N9. — P. 4551–4557.

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАНДЕМИЧЕСКОГО
ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А (H1N1 2009)
С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

*С. В. Степанюк¹, М. И. Вудмаска¹,
С. Л. Рыбалко², Н. Я. Спивак³*

¹ПрАТ НПК «Диапроф-Мед», Киев

²Институт эпидемиологии и инфекционных
болезней им. Л. В. Громашевского
АМН Украины, Киев

³Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Вирусы гриппа А занимают существенное место в структуре заболеваемости людей острыми респираторными вирусными инфекциями, которые составляют почти 90% от всех других инфекционных болезней. По данным Всемирной организации здравоохранения, только тяжелыми формами гриппа в мире ежегодно заболевают 3–5 млн. человек, из них 45–60% — дети. Экономический ущерб от сезонного эпидемического гриппа достигает около 85% экономических потерь от инфекционных болезней в целом.

Опыт борьбы с гриппом, накопленный за последние годы, показал, что для разработки и проведения эффективных противоэпидемических мероприятий необходимо построение системы постоянного мониторинга за циркуляцией вируса гриппа, базирующейся на использовании лабораторных методов точной и быстрой идентификации и характеристики циркулирующих штаммов вируса гриппа А. Среди методов лабораторной диагностики гриппа наиболее эффективным считается метод полимеразной цепной реакции. В работе представлены данные по разработке диагностической тест-системы в формате двухстадийного мультиплексного RT-PCR-анализа в режиме реального времени для выявления и генотипирования пандемического вируса гриппа А (H1N12009). Результаты лабораторно-экспериментальных исследований тест-системы DIA Influenza H1N1 показали, что она является эффективной и специфичной для выявления калифорнийских штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N12009) и может быть использована для диагностики заболеваний, обусловленных этим штаммом вируса. Проведенные клинические испытания в ходе государственной регистрации в Минздраве Украины показали чувствительность и специфичность тест-системы DIA Influenza H1N1 на уровне 100%.

Ключевые слова: пандемический вирус гриппа А (H1N1), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, диагностическая тест-система.

**DEVELOPMENT OF TEST KIT
FOR DETECTION OF PANDEMIC STRAIN
INFLUENZA VIRUS A (H1N1 2009)
BY REAL TIME POLYMERASE CHAIN
REACTION**

*S. V. Stepaniuk¹, M. I. Vudmaska¹,
S. L. Rybalko², M. Y. Spivak³*

¹PJSC SPC «DIAPROPH-MED», Kyiv

²Institute of Epidemiology and Infectious
diseases of Academy of Medical Sciences
of Ukraine, Kyiv

³Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Influenza viruses A play an important role in the structure of the incidence of people with acute respiratory viral infection, which make up 90% from all other infectious diseases. According to the World Health Organization, only severe flu worldwide suffer annually 3.5 million, of which 45–60% are children. An economic loss from seasonal flu epidemic is in average about 85% of economic losses from infectious diseases in general.

The experience of fighting the flu, accumulated over the years, has shown that to develop and deliver effective preventive measures necessary to build a system of permanent monitoring for influenza virus circulation, based on use of laboratory methods for accurate and rapid identification and characterization of circulating strains of influenza virus A. Among the methods of laboratory diagnosis of influenza, the most effective is a method of polymerase chain reaction. Data on the development of diagnostic test kits in the format of two-stage multiplex RT-PCR-analysis for detection and genotyping of pandemic influenza virus A (H1N12009) are given. The results of laboratory and experimental research of «DIA Influenza H1N1» test system showed that it is effective and specific for detection of California pandemic influenza virus A (H1N12009) strains and can be used to diagnose disease caused by this strain of virus. Clinical trial of the course of the State registration by Ministry of Health of Ukraine have shown sensitivity and specificity of «DIA Influenza H1N1» test systems up to 100%.

Key words: pandemic influenza virus A (H1N1), polymerase chain reaction in real time, diagnostic test system.