

**В.Г. Спиридонов, Л.М. Іщенко, Д.Л. Мартиненко,
С.Д. Мельничук, М.Д. Мельничук**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна*

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПАНДЕМІЧНОГО ШТАМУ ВІРУСУ ГРИПУ А/Н1N1 МЕТОДОМ ПЛР В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Розроблено та практично апробовано методику ідентифікації пандемічного штаму вірусу грипу А/Н1N1 методом одностадійної РТ-ПЛР. Адаптували рекомендований ВООЗ протокол для проведення диференціальної діагностики вірусу грипу А/Н1N1 в умовах сучасних ПЛР-лабораторій України. Знижено вартість дослідження за рахунок відпрацювання методики виділення вірусної РНК та використання загальноживаних ферментних систем для ПЛР аналізу. Показано ефективність даної методики в порівнянні із одностадійною РТ-ПЛР рекомендованою ВООЗ з використанням комерційних ПЛР наборів.

К л ю ч о в і с л о в а: пандемічний «каліфорнійський» грип А/Н1N1, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.

Спалах на грип у 2009 році, відомий як «каліфорнійський грип», викликаний РНК вірусом з родини *Orthomyxoviridae*, субтипу А/Н1N1, що володіє найбільшою генетичною спорідненістю із вірусом грипу, який циркулює серед свиней. Як правило, грип свиней не передається людям, так як є видоспецифічним для свиней. Проте у випадках, коли свині інфіковані декількома вірусами грипу одночасно, в результаті таких генетичних змін як дрейф та сортування генів можуть з'явитися нові субтипи вірусів патогенні і для людини [1].

З моменту ідентифікації пандемічного штаму вірусу грипу А/Н1N1 в квітні 2009 року, було з'ясовано, що вірус містить унікальну комбінацію генетичних сегментів з Північно-Американської та Свразійської лінії свиней, який продовжив циркуляцію серед людей [2]. Однак на сьогодні достеменно невідомо чи може новий вірус адаптуватись до людської популяції [3].

За даними регіональних бюро ВООЗ, загальна кількість лабораторно підтверджених випадків захворювань людей, спричинених вірусом А(Н1N1), в світі складає понад 442234, у т.ч. 6051 летальних випадків. У Російській Федерації зареєстровано 3122 лабораторно підтверджених випадків, у т.ч. 14 летальних. Із 21 країни Європейського регіону ВООЗ, що надають інформацію за показником інтенсивності епідемічного процесу по грипу та ГРВІ, Бельгія та Ізраїль повідомили про середню інтенсивність процесу передачі респіраторних інфекцій, в інших 18 країнах відмічається низька інтенсивність. Вірус пандемічного грипу А(Н1N1) є домінуючим у всіх країнах. В Україні зареєстровано 32 лабораторно підтверджених випадків захворювання на грип А (Н1N1)-Каліфорнія 04/2009 [4].

Лабораторне підтвердження пандемічного штаму грипу А/Н1N1 на початку спалаху захворювання серед населення має надзвичайно важливе значення для моніторингу та перешкоджання поширення вірусу, а також для прийняття рішення щодо лікування антивірусними препаратами. Одним із найбільш достовірних методів виявлення пандемічного грипу А/Н1N1 є реверс-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція (РТ-ПЛР), яка здійснюється в спеціалізованих ПЛР лабораторіях. Тому, в центрі грипу ВООЗ (Centre for influenza at centers for disease control Atlanta, USA) був розроблений протокол для виявлення та ідентифікації пандемічного грипу А/Н1N1 методом РТ-ПЛР в реальному часі [5]. Однак цей протокол винятково прив'язаний до використання дорогих наборів для виділення РНК та реагентів для проведення РТ-ПЛР, що унеможливує масове його застосування в роботі діагностичних лабораторій України.

Метою нашої роботи була адаптація рекомендованого ВООЗ протоколу для проведення диференціальної діагностики вірусу грипу А/Н1N1 в умовах сучасних ПЛР-лабораторій України та розробка власної високоефективної діагностичної системи ПЛР у реальному часі.

© В.Г. Спиридонов, Л.М. Іщенко, Д.Л. Мартиненко, С.Д. Мельничук, М.Д. Мельничук, 2010

Матеріали і методи. Дослідження проводили у відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів та природокористування України.

Матеріалом дослідження слугували такі зразки: інактивована культура клітин MDCK заражених пандемічним штамом вірусу грипу А/Н1N1 із титром вірусу не менше 10^4 – 10^5 ЦПД₅₀/0,1 мл (зразок №1), інактивовані зразки алантоїсної рідини курячих ембріонів заражених вірусом пандемічного грипу Н1N1 (зразок №2) та вірусом пташиного грипу Н5N1 (зразок №3), мазки із слизової оболонки носової порожнини співробітників відділу (зразки №4-6), а також, зразки патологічного матеріалу від людей з підозрою на пандемічний грип Н1N1 (зразки №7-10). Ми також зробили 2 зразки штучно позитивні, мазки слизової оболонки носової порожнини співробітників відділу інокулювали в зразок №1 (зразок №11), та в зразок №2 (зразок №12).

РНК із біологічного матеріалу виділяли паралельно двома методами: методом сорбції на SiO₂, згідно методики [6] та із використанням комерційного набору QIAamp®Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Одностадійну реакцію реверс-транскрипції та ампліфікації проводили на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems). Як мішень для ампліфікації РНК вірусу пандемічного грипу Н1N1 використовували сегмент 4 (ген гемаглютиніну Н1). Для контролю якості виділення РНК з клінічних зразків та проведення реакції реверс-транскрипції використовували внутрішній контроль (ВК), мішень РНК людини, що кодує рибозим РНКазу Р. Умови одностадійної РТ-ПЛР представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Умови РТ-ПЛР для виявлення та ідентифікації пандемічного грипу Н1N1

Етап	Назва етапу	Температура	Час
1	Реверс-транскрипція	37°C*	30 хв
2	Інактивація РТ та активація Таq-полімерази	95°C	10 хв
3	Ампліфікація (45 циклів)	95°C	15 с
		55°C**	1 хв

* при використанні комерційного набору «OneStep RT-PCR kit» (Qiagen), температура проведення реакції реверс-транскрипції підвищувалась до 50°C;

** сигнал флуоресценції аналізували по каналам FAM (мішень Н1) та R6G (мішень ВК).

Ампліфікацію проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, що містила: 50,0 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 50,0 мМ КСІ, 3,0 мМ MgCl₂, 10,0 мМ ДТТ, 0,4 мМ кожного з дНТФ, по 5 пМ пари олігонуклеотидних праймерів як для детекції гену Н1 вірусу грипу, так і для детекції внутрішнього контролю, флуоресцентні зонди вносили по 2,5 пМ, 10 од. М-MLV реверс-транскриптази та 1 од. Таq ДНК-полімерази, зразки виділеної РНК вносили по 5 мкл. Для отримання якісних і достовірних даних використовували серію контролів: негативний, позитивний контроль та контроль без матриці (NTC).

Для детекції гену Н1, зонд мічений барвником 5'-FAM, зонд для детекції ВК, мічений барвником 5'-R6G, обидві зонди мічені гасником флуоресценції 3'-BHQ1. Олігонуклеотидні праймери та флуоресцентні зонди були синтезовані на замовлення компанією «Сінтол» (Москва, Росія).

Для порівняльної оцінки ефективності реакції ампліфікації запропонованої методики проводили паралельні дослідження за допомогою комерційного набору «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen), згідно інструкції виробника.

Аналіз результатів та статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3.

Результати та їх обговорення. Одним із важливих моментів оптимізації роботи методики було приділено етапу виділення РНК. Нами було запропоновано альтернативний комерційному набору «QIAamp®Viral RNA Mini Kit», простий спосіб виділення РНК методом сорбції на SiO₂ (Sigma). Характеристика кривих ампліфікації наведена на рис.1 та в табл. 2. Дослідження кожного зразка проводили в трьох повторах.

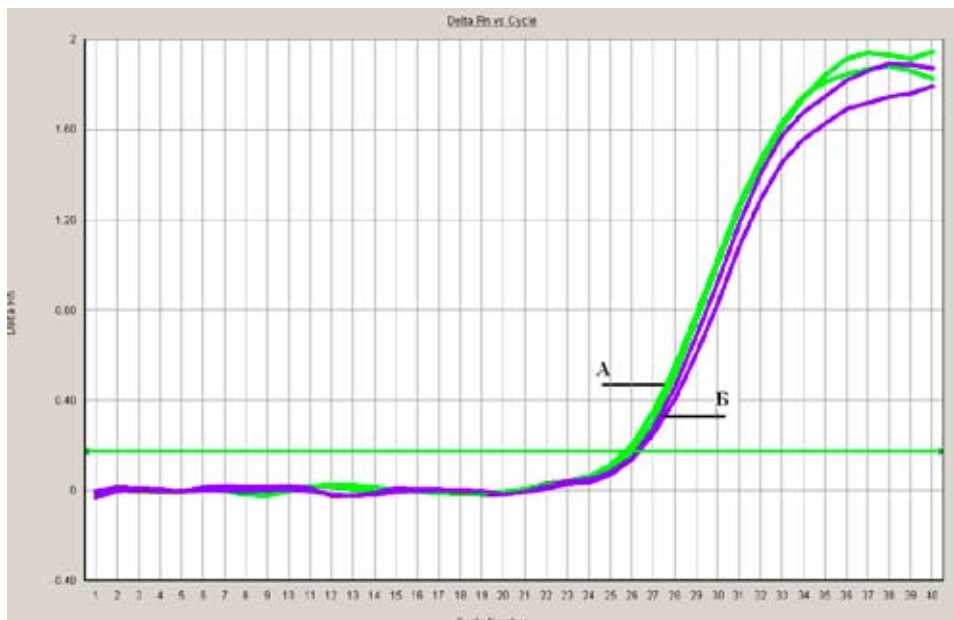


Рис. 1. Приклад ампліфікації внутрішнього контролю.

А. Запропонована методика. Б. Виділення за допомогою «QIAamp®Viral RNA Mini Kit».

Таблиця 2

Значення ампліфікації ВК при ампліфікації РНК виділеної різними методами, детекція по каналу R6G

Досліджені зразки №	Запропонована методика			«QIAamp®Viral RNA Mini Kit»		
	Ct	ΔRn	SD	Ct	ΔRn	SD
4	26,8	1,78	0,22	26,5	1,85	0,28
5	24,5	1,20	0,15	25,0	1,25	0,22
6	25,4	1,00	0,24	25,5	0,95	0,15

Як видно з наведених в табл. 2 даних, такі кількісні та якісні показники ампліфікації як Ct та ΔRn, коливались в межах 24,5-26,8 та 0,95-1,85, відповідно. Показник відтворюваності SD коливався від 0,15 до 0,28. Ці дані свідчать, що запропонований метод виділення РНК не поступається за кількістю, якістю та ефективністю ампліфікації від РНК виділеної із використанням комерційного набору «QIAamp®Viral RNA Mini Kit».

Для вивчення ефективності ампліфікації запропонованої нами методики ідентифікації пандемічного штаму вірусу грипу *A/H1N1* в одностадійній РТ-ПЛР ми провели порівняння із комерційним набором «OneStep RT-PCR Kit», (Qiagen) при цьому ми досліджували зразки різного походження, отримані результати дослідження наведені в табл. 3. Дослідження кожного зразка також проводили не менш ніж в трьох повторах.

Результати порівняльних досліджень ідентифікації пандемічного штаму вірусу грипу
A/H1N1 різними методами

Досліджені зразки №	Запропонована методика			QIAGEN® OneStep RT-PCR		
	Детектори FAM/R6G			Детектори FAM/R6G		
	Ct	Δ Rn	SD	Ct	Δ Rn	SD
1	27,0/-	0,72/-	0,3/-	27,0/-	1,13/-	0,25/-
2	24,5/-	0,65/-	0,15/-	24,3/-	1,25/-	0,21/-
3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	-26,8	-1,78	-0,22	-26,5	-1,85	-0,28
5	-24,5	-1,20	-0,15	-25,0	-1,25	-0,22
6	-25,4	-1,00	-0,24	-25,5	-0,95	-0,15
7	-24,5	-1,20	-0,15	-25,0	-1,25	-0,22
8	-25,4	-1,00	-0,24	-25,5	-0,95	-0,15
9	-23,5	-1,20	-0,13	-25,3	-1,20	-0,25
10	-24,3	-1,00	-0,18	-24,2	-1,15	-0,12
11	27,4/26,5	0,76/1,7	0,3/0,25	27,0/26,5	1,15/1,7	0,25/0,15
12	24,8/24,4	0,68/1,2	0,15/0,2	24,5/25,5	1,25/1,3	0,21/0,2

З таблиці 3 видно, що при використанні запропонованої методики позитивні та умовно позитивні зразки № 1, 2, 11, 12 за Ct (24,5-27,0) не поступаються даним, одержаним із використанням комерційного набору Ct (24,3-27,0). Але слід відмітити, що ефективність ампліфікації гену Н1 вірусу грипу дещо нижча при використанні запропонованої методики (Δ Rn 0,65-0,72) порівняно з комерційним набором (Δ Rn >1,0). Це може свідчити про пригнічення активності ферменту реверс-транскриптази іншим ферментом Таq полімеразаю. Не секрет, що в комерційній тест-системі використовується модифікована, так звана, «hot start» ДНК полімераза, активність якої заблокована антитілами. Така модифікована полімераза активується при нагріванні реакційної суміші до 95°C протягом 10-15 хв. Цим можна пояснити зниження ефективності ампліфікації гену Н1 вірусу грипу приблизно на 30%. Однак, слід зауважити, що така модифікована «hot start» ДНК полімераза в 4-5 рази дорожче ніж свій не модифікований аналог.

Специфічність запропонованої методики підтверджується відсутністю ампліфікації РНК, виділеної з зразка №3 (пташиний грип H5N1). Зразки №7-10 патологічного матеріалу від людей з підозрою на пандемічний грип H1N1 виявилися негативні, хоча грип типу А був в них виявлений (дані не наведені).

На рис. 2 показано приклад ампліфікації умовно позитивного зразка №12 в двох незалежних експериментах.

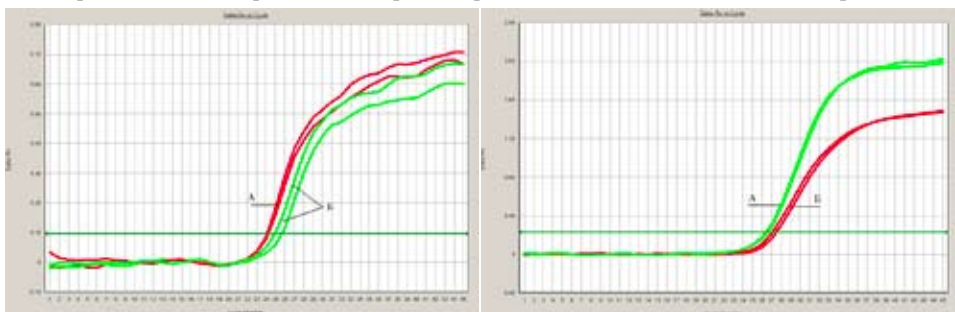


Рис. 2. Приклад ампліфікації умовно позитивного зразка №12 (А – детектор FAM, Б – детектор R6G). Ліворуч – запропонована методика, праворуч – комерційна методика «OneStep RT-PCR».

На підставі отриманих даних можна зробити висновок, що запропонована методика ідентифікації пандемічного штаму вірусу грипу *A/H1N1* методом одностадійної РТ-ПЦР в реальному часі є придатною та високоефективною для дослідження патологічного матеріалу від людей. При цьому значно знижена вартість проведення дослідження, що робить можливим проведення масової діагностики та моніторингу при дотриманні умов, рекомендованих ВООЗ.

***В.Г. Спиридонов, Л.М. Ищенко, Д.Л. Мартыненко,
С.Д. Мельничук, М.Д. Мельничук***

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАНДЕМИЧНОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА A/H1N1 МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Резюме

Разработано и практически апробировано методику идентификации пандемического штамма вируса гриппа *A/H1N1* методом одностадийной РТ-ПЦР. Адаптировали рекомендованный ВООЗ протокол для проведения дифференциальной диагностики вируса гриппа *A/H1N1* в условиях современных ПЦР-лабораторий Украины. Снижена стоимость исследования за счет отработки методики выделения вирусной РНК и использования общепринятых ферментных систем для ПЦР анализа. Показана эффективность данной методики в сравнении с одностадийной РТ-ПЦР, рекомендованной ВООЗ при использовании коммерческих ПЦР наборов.

Ключевые слова: пандемический «калифорнийский» грипп *A/H1N1*, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

***V.G. Spyrydonov, L.M. Ishchenko, D.L. Martynenko, S.D. Melnychuk,
M.D. Melnychuk***

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products, Kyiv

IDENTIFICATION OF A PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A/H1N1 BY REAL-TIME PCR

S u m m a r y

The WHO approved protocol of pandemic influenza virus *A/H1N1* identification by the method of one-step RT-PCR was adopted. The cost of research was decreased due to adoption of RNA purification method and utilizing of the common enzyme systems for RT-PCR.

Key words: pandemic influenza virus *A/H1N1*, polymerase chain reaction in real time.

The authors address: *Spyrydonov V.G.* National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products, 15, Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine.

1. Букринская А.Г. //Вирусология.-Москва.-1986.-335 с.
2. Fraser C., Donnelly C.A., Cauchemez S., Hanage W.P., et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings //Science. –2009. –**324**. –P. 1557-61.
3. Poon L.L., Chan K.H., Smith G.J., Leung C.S., Guan Y., Yuen K.Y., Peiris J.S. Molecular detection of a novel human influenza (H1N1) of pandemic potential by conventional and real-time quantitative RT-PCR assays // Clin Chem. – 2009. –**55**. –P. 1555-8.
4. <http://www.moz.gov.ua/ua/main/icsm/ah1n1>.
5. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en>.
6. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. –1990. –**28**. –P. 495-503