

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)  
ФГУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»  
(ФГУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя Федеральной  
службы по ветеринарному и  
фитосанитарному надзору

Н.А. Власов

" 21 " мая 2009 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ВИРУСА ГРИППА СВИНЕЙ ТИПА А МЕТОДОМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Владимир – 2009

## 1. Введение

Вирус гриппа является возбудителем острых респираторных заболеваний у человека и животных. Он принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*. Существует три типа вируса гриппа: А, В, С. Вирус типов В и С обычно обнаруживают у людей. Грипп типа А поражает широкий круг хозяев: птиц, людей, свиней, лошадей, морских млекопитающих. Вирус гриппа типа А делят на подтипы на основании антигенных свойств его поверхностных гликопротеинов - гемагглютинина (Н1-15) и нейраминидазы (N1-9).

Грипп свиней распространен в большинстве стран мира с развитым свиноводством. Хотя смертность от него минимальна, заболеваемость может достигать до 100%. В настоящее время среди свиней наиболее распространены три подтипа вируса гриппа А: Н1N1, Н3N2 и Н1N2. Подтип Н1N1 считают классическим свиным гриппом, известным с 1918 года. С 1979г у свиней выделяют антигенно отличающийся вариант Н1N1 птичьего происхождения. Вирус подтипа Н1N1 является наиболее распространенным, антитела к нему обнаруживают у 25% свиней по всему миру. Подтип Н3N2 был впервые выявлен у свиней в 1970г, он считается результатом межвидового перехода вируса гриппа от человека к свиньям. Подтип Н1N2 выделяют от свиней с 1994г, этот подтип является результатом реассортации вирусов гриппа свиней, человека и птиц.

В связи с тем, что свиньи восприимчивы к вирусам гриппа А птиц и человека, они считаются промежуточным хозяином, в котором происходит реассортация генов между свиньями, человеческими и птичьими вирусами. Реассортация может приводить к возникновению новых антигенных вариантов вируса гриппа, потенциально способных вызывать эпидемии среди людей. Это обстоятельство определяет значимость гриппа свиней не только для ветеринарии, но и для здравоохранения людей.

В этих условиях разработка методов быстрой и высокоспецифичной диагностики гриппа свиней является крайне актуальной задачей.

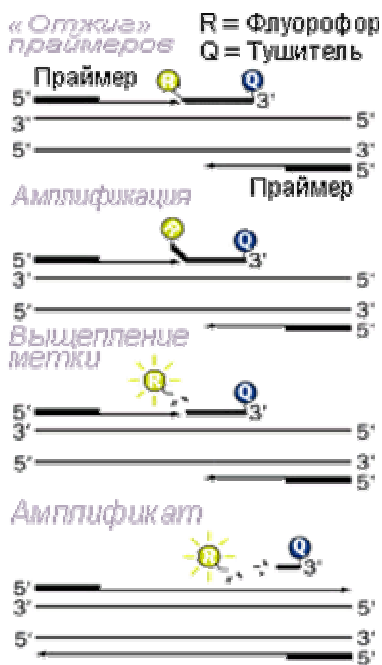
Предлагаемый метод обнаружения вируса гриппа свиней основан на полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ сочетает в себе достоинства классической ПЦР (высокую чувствительность, специфичность, быстроту получения результатов) и одновременно обладает рядом преимуществ. Регистрация результатов реакции в режиме реального времени позволяет отказаться от электрофореза продуктов ПЦР, что сокращает продолжительность анализа и

уменьшает вероятность ложноположительных результатов из-за контаминации исследуемых проб продуктами амплификации.

Методика основана на амплификации высококонсервативного фрагмента гена, кодирующего матриксный протеин М1 вируса гриппа свиней, и позволяет выявлять вирус гриппа А всех подтипов.

## 2. Сущность метода.

Выявление вируса гриппа свиней проводится методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), в которой используются вирусспецифичные праймеры и TaqMan зонд. Метод ПЦР-РВ позволяет проводить детекцию продуктов амплификации в процессе реакции и вести мониторинг кинетики накопления ампликонов. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонд, меченый на 5` - конце флюоресцентным красителем, а на 3` - конце - фосфатной группой и гасителем флюоресценции. Зонд комплементарен внутреннему участку амплифицируемой области генома. Гаситель поглощает испускаемое флюоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3` - положении блокирует полимеразу. На этапе отжига зонд связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридного с зондом, начинает расщеплять последний за счёт 5` - экзонуклеазной активности. В результате флюоресцентная метка отделяется от тушителя, и её свечение может быть детектировано. Таким образом, увеличение флюоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного ПЦР - продукта.



Поскольку геном вируса гриппа свиней представляет собой РНК, проведению собственно ПЦР-РВ предшествует этап обратной транскрипции.

## 3. Область применения.

Методика предназначена для использования в научно-исследовательских и диагностических учреждениях ветеринарного профиля.

#### **4. Оборудование и реактивы.**

##### *Оборудование:*

1. ДНК амплификатор для ПЦР в режиме реального времени (модель **Bio-Rad iQ5** или аналоги);
2. Вакуумный насос;
3. Устройство для фильтрации **Vacuum Manifold** ;
4. Микроцентрифуга для пробирок;
5. Микроцентрифуга для плашек на **96** лунок;
6. ПЦР - бокс;
7. Набор автоматических пипеток;
8. Холодильник на **+4°C** и на **-20°C**;
9. Полипропиленовые плашки **96** лунок на **200** мкл;
10. Одноразовые наконечники к автоматическим пипеточным дозаторам;
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объёма с аэрозольным барьером;
12. Полипропиленовые пробирки на **0,5** и **1,5** мл.

##### *Ферменты и реактивы:*

1. AMV обратная транскриптаза (**10** ед./мкл);
2. Tag ДНК-полимераза (**5** ед./мкл);
3. Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ). Водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов с концентрацией **10** мМ каждого;
4. 5- кратный реакционный буфер для обратной транскрипции;
5. 10-кратный реакционный буфер для ПЦР;
6. Смесь праймеров для обнаружения вируса гриппа свиней (праймеры M1, M2 в концентрации **10** пМ/мкл каждого);
7. TaqMan зонд (M\* в концентрации **5** пМ/мкл);
8. Контрольная РНК: водный раствор РНК вируса гриппа свиней в концентрации **0,01** мкг/мкл;
9. 6М гуанидинтиоцианат;
10. 96% этиловый спирт.

## 5. Этапы работы.

### 5.1. Выделение РНК.

5.1.1. Из образцов исследуемого биологического материала (носовые смывы, экссудат трахеи, 10% суспензия легочной ткани и бронхов, вирусодержащие культуры клеток) отбирают 0,1 мл в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл, смешивают с 0,2 мл 6М раствора гуанидин-тиоцианата (ГТЦ) и инкубируют при комнатной температуре 3-5 мин. Добавляют 0,3 мл этилового спирта, перемешивают и наносят на миниколонки со стекловолокнистыми фильтрами GF/F. С помощью вакуумного насоса и устройства для фильтрации Vacuum Manifold смесь фильтруют. Далее фильтры промывают 3 мл 80% этанола и центрифугируют в течение 1 мин. при 13000 g для удаления остатков этанола. Переносят миниколонку в новую пробирку, добавляют 50 мкл воды и через 3-5 минут центрифугируют 30 сек при 10000-13000 g.

Полученный раствор РНК сразу используют в реакции обратной транскрипции или хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Кроме описанной выше методики также могут быть использованы отечественные или импортные коммерческие наборы для выделения РНК фирм Биоком, Qiagen и других производителей.

### 5.2. Постановка ОТ-ПЦР в режиме реального времени

1. В пробирку вносят следующие компоненты в указанном порядке из расчёта на одну пробирку:

деионизированная вода	16 мкл
смесь праймеров	1 мкл
TaqMan зонд	1 мкл
10x буфер для ПЦР	3 мкл
дНТФ 10мМ	1 мкл
25 мМ р-р $\text{MgCl}_2$	3 мкл
Taq ДНК-полимераза	1 Ед (0,2 мкл)
AMV обратная транскриптаза	2,5 Ед (0,25 мкл)

2. Смесь раскапывают в лунки планшета, следя за тем, чтобы не допустить образования пузырьков воздуха в смеси.

3. В заданные лунки вносят аликвоты РНК (по 5 мкл) и заклеивают планшет оптической плёнкой.

4. Центрифугируют планшет (стрип) чтобы собрать со стенок все капли.

5. Устанавливают планшет (стрип) в амплификаторе, отмечают в программе расположение и характеристику проб, выбирают рабочий (R6G) краситель.

6. Проводят ОТ-ПЦР при следующих параметрах:

42 °С - 15 мин.

95 °С - 3 мин.

95 °С - 15 сек

60 °С - 50 сек

40-50 циклов

В каждой серии анализов ставят два контрольных образца: положительный контроль (с РНК вируса гриппа свиней), и отрицательный контроль (с деионизованной водой). Смеси для контрольных образцов готовят по той же прописи, что и для исследуемых образцов.

### 5.3. Учет результатов амплификации

Учёт результатов в реакции происходит на каждом цикле. Прибор определяет уровень флуоресценции и строит кинетическую кривую в координатах: уровень флуоресценции - цикл амплификации. В случае присутствия в исследуемой пробе специфической матрицы, кинетическая кривая имеет экспоненциальную зависимость. Программа определяет пороговый цикл реакции ( $C_t$  -threshold cycle), на котором достигается пороговая флуоресценция.

При стандартных условиях проведения исследований и при условии равной эффективности реакции, значение  $C_t$  прямо пропорционально логарифму количества субстрата, что позволяет проводить сравнение количества субстрата.

### 6. Аннотация экспериментальных данных

Описанная методика разработана и используется в лаборатории диагностики особо опасных инфекций ФГУ «ВНИИЗЖ».

Методические рекомендации разработаны ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» на основании утверждённых Учёным советом и директором ФГУ «ВНИИЗЖ» «Методических указаний по обнаружению вируса гриппа свиней типа А методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени».

Настоящие методические указания вступают в действие с момента подписания.