

На правах рукописи



Аканина Дарья Сергеевна

**РАЗРАБОТКА СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ ВЫСОКОВИРУЛЕНТНОГО
ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H5N1**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва - 2014

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гребенникова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Глухов Александр Иванович,
заведующий лабораторией молекулярных основ
онкогенеза НИЦ «Курчатовский Институт»

доктор биологических наук
Михайлович Владимир Михайлович,
ведущий научный сотрудник лаборатории
биологических микрочипов ФГБУ "Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта"
РАН

Ведущая организация:

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава РФ

Защита состоится «22» мая 2014 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» Российской академии медицинских наук по адресу: 105064, г. Москва, пер. Малый Казенный, д.5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук.

Автореферат разослан « » апреля 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Яковлева Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Вирус гриппа А подтипа H5N1 – высоко патогенный вирус «птичьего гриппа» – впервые инфицировал человека в 1997 году во время вспышки болезни среди домашних птиц в Гонконге (Claas et al., 1998; Shortridge et al., 1998). В 2003 и 2004 годах этот вирус распространился из Азии в Европу и Африку и циркулировал среди птиц во многих странах, что привело к сотням случаев заболевания людей, в том числе и со смертельным исходом (Guan et al., 2009). Вспышки болезни среди домашних птиц оказывают серьезное воздействие на экономику и международную торговлю в пораженных странах. Продолжающаяся циркуляция вирусов H5N1 среди домашних птиц, особенно там, где этот вирус является эндемическим, по-прежнему представляет угрозу для общественного здравоохранения (WHO, 2011), так как эти вирусы обладают не только способностью вызывать тяжелое заболевание у людей, но и преодолевать межвидовой барьер (Manz et al., 2013; Webster et al., 2007).

9 января 2014 года ВОЗ сообщила о подтвержденном случае заболевания гриппом, вызванным вирусом А/H5N1 в Канаде у человека, приехавшего из Пекина. Всего в мире с 1997 года зарегистрировано 649 случаев заболевания людей гриппом, вызванным вирусом H5N1, 385 из которых с летальным исходом. Таким образом, смертность от гриппа, вызванная вирусом H5N1, составляет почти 60% (WHO, 2014). В нашей стране пока не зарегистрировано ни одного случая заболевания человека гриппом, вызванным вирусом H5N1. Первая вспышка «птичьего гриппа» среди домашней птицы в России произошла в июле 2005 года в Новосибирской области (Львов и др., 2005) и была связана с миграцией водоплавающих птиц из стран Азии на территорию нашей страны.

Все вышесказанное указывает на необходимость быстрой идентификации и типирования вирусов гриппа А не только для облегчения наблюдения за пандемическим потенциалом вируса «птичьего гриппа», но и для улучшения контроля и лечения инфицированных пациентов (Sakurai et al., 2012). В последние годы методы молекулярной диагностики, рекомендованные ВОЗ, играют

ключевую роль в выявлении и типировании вирусов гриппа (Alexander, 2008, Thanh et al., 2010). Совокупность чувствительных и специфичных современных отечественных тест-систем для качественного и количественного выявления генома вируса гриппа H5N1 на основе ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также методов выявления антител к данному вирусу может существенно облегчить экологический мониторинг с целью предупреждения возможной пандемии.

Цель и задачи исследования

Целью исследования была разработка и усовершенствование методов лабораторного выявления вируса гриппа А подтипа H5N1 и антител к нему.

Задачи исследования:

1. Разработать и оптимизировать молекулярно-генетический метод обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 и дифференциации его от других подтипов вируса гриппа А и других вирусов на основе ПЦР, проверить чувствительность и специфичность и на основании этих данных создать «Тест-систему для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР» и нормативную документацию к ней (СТО и Инструкцию по применению);

2. Разработать и оптимизировать молекулярно-генетический метод обнаружения и количественного определения вируса гриппа А подтипа H5N1 и дифференциации его от других подтипов вируса гриппа А и других вирусов на основе ПЦР в реальном времени, проверить его чувствительность и специфичность;

3. Разработать генно-инженерные положительные контроли на основе плазмиды pGEM-T Easy, содержащие клонированные участки генома вируса гриппа А подтипа H5N1;

4. Показать возможность использования метода количественного определения содержания РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 для контроля на стадиях получения рекомбинантных вирусов гриппа методом обратной генетики.

5. Показать возможность использования разработанных тест-систем для обнаружения и дифференциации высоковирулентного вируса гриппа А подтипа H5N1 в биологических образцах от птиц, собранных в различных регионах РФ;

6. Получить рекомбинатный белок NS1 на основе вектора pET32b+ с последующей химической трансформацией штамма *E. Coli* BL21trxB(DE3)pLysS, накоплением и выделением методом металло-хелатной аффинной хроматографией с использованием Ni-NTA агарозы.

7. Разработать методику обнаружения антител к рекомбинантному неструктурному белку NS1 вируса гриппа А подтипа H5N1 на основе непрямого ИФА.

Научная новизна работы

Созданы отечественные тест-системы на основе ПЦР и ПЦР-РВ для диагностики вируса гриппа А подтипа H5N1 с учетом генотипов вируса, циркулирующих на территории Российской Федерации. Достигнута высокая эффективность применения молекулярно-генетических методик мониторинга вируса гриппа А подтипа H5N1 среди диких и домашних птиц в различных районах РФ. Разработанные тест-системы являются универсальными и позволяют детектировать все известные на сегодняшний день генотипы вируса гриппа А подтипа H5N1.

Получен Российский патент № 2361924 «Способ обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1».

Разработки могут быть использованы в лабораториях Научно-исследовательских институтов в целях изучения эволюции вируса гриппа А подтипа H5N1 для предупреждения возможной пандемии.

Впервые показана возможность использования метода количественного определения содержания РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени для контроля получения рекомбинантного вируса гриппа H5N1 методом обратной генетики.

Показана возможность применения непрямого ИФА для обнаружения антител к неструктурному белку NS1 вируса гриппа А подтипа H5N1 для

дифференциации инфицированных и вакцинированных инактивированной вакциной птиц.

Практическая значимость

Для «Тест-системы для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР» разработаны СТО 42418073-0001-2007 и Инструкция по применению от 21. 05. 2009 №1-4.7/02562, которые утверждены в Министерстве Сельского хозяйства РФ. Данная тест-система сертифицирована во Всероссийском Государственном Центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), сертификат соответствия № РОСС RU.ФВ01.H26634.

Разработанные тест-система и методики на основе ПЦР и ПЦР в реальном времени использованы при проведении Международной интеркалибрации WHO External Quality Assessment Programm (EQAP) по молекулярной диагностике гриппа в 2007-2011 г.г. Получен международный сертификат от 31. 10. 2011 г.

Сконструированные генно-инженерные положительные контроли, содержащие фрагменты генома вируса гриппа А подтипа H5N1, могут быть использованы в лабораторных и коммерческих тест-системах для качественного и количественного контроля определения генома высококовирулентного вируса гриппа А подтипа H5N1 в научных и клинических лабораториях.

Разработанные методики и «Тест-система для диагностики вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР» используются в региональных ветеринарных лабораториях, в диагностических лабораториях Роспотребнадзора и Минсельхоза РФ для проведения мониторинга вируса гриппа А подтипа H5N1. Тест-системы могут также быть использованы для проведения научно-практических занятий в Университетах и Институтах Минздрава РФ.

Методика обнаружения антител к рекомбинантному неструктурному белку вируса гриппа NS1на основе непрямого ИФА может быть использована

для дифференциального выявления вакцинированных инактивированной вакциной и инфицированных птиц.

Основные положения, выносимые на защиту

Создана и предложена в практику здравоохранения тест-система для обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 («птичий грипп») и дифференциации его от других подтипов вируса гриппа А и других вирусов на основе ПЦР.

Разработан молекулярно-генетический метод обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 и дифференциации его от других подтипов вируса гриппа А и других вирусов на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Выработана методика количественного определения содержания РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР-РВ, которая может быть использована для контроля накопления рекомбинантного вируса гриппа А/H5N1, полученного методом обратной генетики.

Синтезирован рекомбинантный белок NS1 на основе вектора pET32b+ с последующей химической трансформацией штамма *E. Coli* BL21trxB(DE3)pLysS, очищенный металло-хелатной аффинной хроматографией с использованием Ni-NTA агарозы для использования его в качестве специфического компонента в ИФА.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной научной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных» (Ульяновск, 2006); итоговой конференции СНО медицинского факультета РУДН «Клинические и теоретические аспекты современной медицины (Москва, 2007); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007» (Москва, 2007); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Ю.М. Кубицкого «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и

химико-токсикологических экспертных исследований» (Москва, 2007); научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2012), на совместном заседании кафедры фармхимии медицинского факультета РУДН и отдела прикладной вирусологии ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского» МЗ РФ (Москва 2013)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, входящих в перечень периодических изданий, рекомендуемых ВАК, 1 патент РФ.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 160 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 148 источников, в том числе 112 иностранных, 4 приложений. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 11 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В качестве исследуемого материала были использованы эталонные штаммы вируса гриппа А, любезно предоставленные руководителем лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ, академиком РАМН, проф. Н.В. Кавериным (табл.1) и штаммы вируса гриппа В, любезно предоставленные руководителем лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ, доктором биологических наук Е.И. Бурцевой (табл.1).

Таблица 1. Характеристика штаммов вируса гриппа А и В, использованных в данной работе

№	Тип вируса	Название штамма
1	А(Н3N2)	А/Москва/54/89
2		А/Сичуань/2/87
3		А/СССР/382/86
4		А/Владимир/137/03
5		А/Владимир/34/05
6		А/Томск/26/04
7		А/Москва/11/03
8		А/Филиппины/2/82
9	А(Н1N1)	А/СССР/90/77
10		А/Пекин/262/95
11		А/Новая Каледония/20/99
12		А/Хабаровск/51/05
13		А/Ставрополь/56/05
14	В	В/Виктория/2/87
15		В/Москва/1/04
16	А(Н1N1)	А/WSN/33
17	А(Н2N3)	А/Шилохвость/Приморье/695/76
18	А(Н2N9)	А/Черноголовый Хохотун/NJ/75/85
19	А(Н3N8)	А/Утка/Украина/1/63
20	А(Н4N6)	А/Утка/ЧССР/56
21	А(Н5N2)	А/Mallard/Pensylvania/10218/84
22	А(Н7N1)	А/FPV/Росток
23	А(Н9N2)	А/Swine/Hong Kong/9/98
24	А(Н10N7)	А/Цыпленок/Германия/49
25	А(Н13N2)	А/Кит/Мэйн/328/84
26	А(Н5N1)	А/Grebe/Novosibirsk/29/05
27	А(Н5N1)	А/курица/Покров/09

Полевые образцы от птиц были собраны в Новосибирской, Астраханской, Ростовской областях; республиках Калмыкия, Бурятия, Тыва; Приморском и Краснодарском крае с середины 2005 по 2008 гг. Образцы представляли собой клоакальные и трахеальные смывы и 10%-ные суспензии внутренних органов (мозг, печень, селезенка), суспендированные в растворе гуанидинтиоцианата и замороженные в жидком азоте.

Сыворотки для исследования: референтные сыворотки от кур, инфицированных вирусом А/Н5N1 (LPAI), были предоставлены др. Д. Л. Суарэсом (USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS), South East Poultry Research Laboratory, Атэнс, Джорджия, США), а также сыворотки были получены после вакцинации кур инактивированной эмульгированной вакциной против гриппа птиц типа А подтипа Н5 «Флупротект Н5» производства ФГУП «Ставропольская Биофабрика» (серия 040306).

Нуклеотидные последовательности генов гемагглютинаина и нейраминидазы были получены из банков данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и ISD (Influenza Sequence Database, www.flu.lanl.gov). Для подбора олигонуклеотидов (праймеров) использовали программы PrimerQuest (IDT), Lasergene (версия 6.0), BioEdit (версия 7.00) и Amplify (версия 1.06 Univers. of Wisconsin, Genetics, Madison).

ПЦР проводили в объёме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 10ммоль Tris-HCl (pH 9.0), 50 ммоль KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5ммоль MgCl₂, 10пмоль каждого праймера, 0.25ммоль каждого dNTP, 1.25ед. Taq-полимеразы и 5 мкл выделенной ДНК. Результаты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле. Программа ПЦР: 1 цикл: 50⁰C-40 мин., 95⁰C-1 мин.; 30 циклов: 95⁰C-20 сек., 57⁰C-20сек., 72⁰C-20 сек.; 1 цикл: 72⁰C-5 мин.

ПЦР-РВ проводили в объёме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 10ммоль Tris-HCl (pH 9.0), 50 ммоль KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5ммоль MgCl₂, 10пмоль каждого праймера, 5пмоль зонда, 0.25ммоль каждого dNTP, 1.25ед. Taq-полимеразы и 5 мкл матрицы ДНК. Постановку ПЦР в реальном времени и учёт результатов проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТ-96 (НПО «ДНК-Технология», Россия). Программа ПЦР-РВ: 1 цикл: 50⁰C-40 мин., 95⁰C-3 мин.; 40 циклов: 95⁰C-20 сек., 57⁰C-20 сек., 72⁰C-60 сек.

Конструирование рекомбинантных плазмид Матрицей для синтеза специфических фрагментов был референтный штамм вируса гриппа А подтипа H5N1 A/Grebe/Novosibirsk/29/05. Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов («Fermentas», Литва) согласно методике производителя. Для получения рекомбинантных плазмид использовали плазмидный вектор pGEM T-Easy («Promega», США). Для выделения плазмидной ДНК использовали набор фирмы «Promega», (США). Массовую концентрацию раствора рекомбинантной плазмиды определяли на спектрофотометре при длине волны $\lambda=260$ нм. Молекулярную концентрацию n (молекул/мкл) рассчитывали из массовой по формуле: $n = (C \times NA) / (Xn. o. \times MI n. o.)$, где n (молекул/мкл) – молекулярная

концентрация плазмиды; C (г/мкл) – массовая концентрация плазмиды в растворе; N_A = число Авогадро; X п. о. = число пар нуклеотидных оснований (п. о.) в составе плазмиды; M_1 п. о. = 660 (г/моль) – средняя молярная масса 1 п.о.

Получение рекомбинантного белка NS1. Продукт ПЦР встраивали в вектор pET32b+ (“Novagen”, США) и использовали для химической трансформации штамма *E. Coli* BL21trxB(DE3)pLysS. Рекомбинантный белок очищали из биомассы клеток *E. coli* с использованием NI-NTA агарозы (Qiagen, США) в нативных и денатурирующих условиях. Наличие белка NS1 в каждой фракции определяли методом непрямого ИФА с МКА против гистидина. Степень чистоты полученных препаратов проверяли методом SDS-электрофореза в 12% полиакриламидном геле. Концентрацию белка в растворах определяли с использованием коммерческого набора “Micro BCA Protein Assay Kit” фирмы “PIERCE” (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка тест-системы для обнаружения и дифференциации РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР

Основой для разработки молекулярно-генетического метода обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 стал поиск консервативных участков вирусного генома, специфичных вирусу гриппа А подтипа H5N1. Для этого использовали множественное выравнивание более 10000 нуклеотидных последовательностей генов гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) из базы данных NCBI.

При выборе мест посадки праймеров учитывались следующие требования: специфичность праймеров для всех последовательностей вирусов подтипа H5N1, отсутствие перекрестной гибридизации с последовательностями генома вирусов других подтипов и родственных вирусов, отсутствие формирования дуплексов праймеров (табл. 2).

В результате совмещенной реакции обратной транскрипции и амплификации (ОТ-ПЦР) синтезируется фрагмент гена HA размером 184 пары нуклеотидов (п.н) и фрагмент гена NA размером 213 п.н.

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

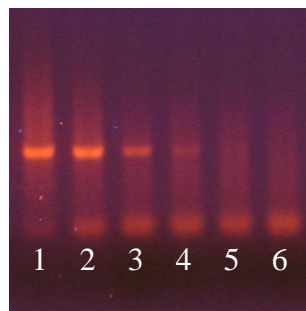
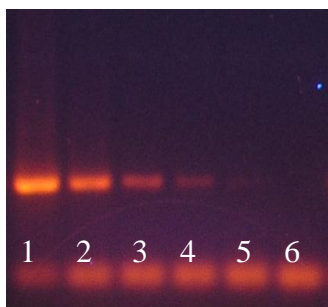
Название праймера	Последовательность олигонуклеотидов (5' - 3')	Позиция в геноме
Для обнаружения РНК гена NA вируса гриппа А подтипа H5N1		
F-N1	CAGAACATTAATGAGTTGTCCT	484-506
R-N1	TCTCAGTATGTTGTTCCCTCCAA	675-697
Для обнаружения РНК гена HA вируса гриппа А подтипа H5N1		
F-H5	ACAAGGTCCGACTACAGCTT	1442-1462
R-H5	ATTGATTCCAATTTTACTCCAC	1605-1627

Эффективность и специфичность тест-системы проверена на референтных штаммах вируса гриппа (табл. 1).

Результаты исследования эпидемических штаммов вируса гриппа, выделенных от людей, показали, что с помощью разработанной тест-системы можно выявить геном вируса гриппа А подтипа N1. Специфичность тест-системы также была проверена с эпидемическими и эталонными штаммами вируса гриппа А, выделенными от животных, в том числе и от птиц. Показано наличие РНК вируса гриппа А подтипа H5 в эталонных штаммах A/Mallard/Pensylvania/10218/84 и A/Grebe/Novosibirsk/29/05, а также РНК вируса гриппа А подтипа N1 в эталонных штаммах A/WSN/33, A/FPV/Росток и A/Grebe/Novosibirsk/29/05. При обнаружении РНК вируса гриппа А подтипа N1 положительные результаты были получены с эпидемическими штаммами A/СССР/90/77 (H1N1) и A/WSN/33 (H1N1), хранившимися в замороженном состоянии длительное время (несколько лет при -70°C). Показано, что нет перекрестных реакций с вирусами других семейств (*Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Birna Viridae*).

Для определения аналитической чувствительности разработанного метода использовали образец вируса A/Grebe/Novosibirsk/29/05 с начальным титром 10^5 ЭИД₅₀/мл. Готовили серию последовательных десятикратных разведений образца вируса (рис. 1).

Предел обнаружения РНК вируса гриппа подтипа H5 составляет 10^2 ЭИД₅₀/мл, а подтипа N1 – 10^3 ЭИД₅₀/мл, соответственно.



А

Б

Рисунок - 1. Детекция РНК вируса гриппа А подтипа Н5 (А) и N1 (Б).

1. Исходный Вирус гриппа А/Н5N1 (10^5 ЭИД₅₀/мл). 2-6 - разведения вируса гриппа А/Н5N1 от 10^4 ЭИД₅₀/мл до 1 ЭИД₅₀/мл.

При проведении диагностики с помощью ПЦР тест-систем важным условием является наличие «положительного» и «отрицательного» контролей (Kwok S., 1989). «Отрицательный» контроль подразумевает отсутствие матрицы для наработки специфичного фрагмента кДНК и служит для проверки аккуратности выполнения анализа и отсутствия контаминации, а «положительный» контроль – для правильной интерпретации результатов ПЦР. В качестве положительного контроля обычно используется референтный штамм вируса. Наличие высоковирулентного вируса А/Н5N1 в качестве контроля недопустимо, поэтому был сконструирован генно-инженерный «положительный» контроль - искусственный вектор (плаزمид), с клонированным участком гена, имеющим места посадки специфических праймеров. Фрагмент гена НА вируса гриппа А подтипа Н5N1 размером 184 п.н. и фрагмент гена NA вируса гриппа А подтипа Н5N1 размером 213 п.н. вируса А/Grebe/Novosibirsk/29/05 клонировали в плазмиду рGEM-T Easy и получили 2 рекомбинантные плазмиды рGEM-H5 и рGEM-N1 соответственно. После трансформации компетентных клеток *E.coli* провели скрининг клонов методом ПЦР с последующим секвенированием полученных ПЦР-продуктов. Массовую концентрацию плазмид определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda=260$ нм. Среднее значение концентраций рассчитывали по результатам 6-ти измерений (табл. 3). Плазмиды в десятикратных разведениях использовались в качестве матрицы при постановке ОТ-ПЦР.

Таблица 3. Массовые и молекулярные концентрации рекомбинантных плазмид

Исследуемый образец	Массовая концентрация, мкг/мкл	Средняя массовая концентрация, мкг/мкл	Молекулярная концентрация, молекул/мкл
плазида рGEM-H5	0,205 0,200 0,195 0,198 0,203 0,201	0,2±0,005	5,7 × 10 ⁷
плазида рGEM-N1	0,207 0,203 0,202 0,205 0,208 0,204	0,205±0,003	5,8 × 10 ⁷

На основе представленных данных разработана «Тест-система для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР». Проведены испытания разработанной тест-системы, совместно с Всероссийским государственным Центром качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ») и разработан пакет разрешительных документов: СТО 42418073-0001-20076262199 и Инструкция по применению тест-системы, утвержденные в Министерстве сельского хозяйства РФ. Данная тест-система запатентована и имеет сертификат соответствия № РОСС RU.ФВ01.Н26634.

2. Разработка тест-системы для обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) подобраны олигонуклеотидные праймеры на основе сравнительного анализа геномов различных штаммов вируса гриппа А подтипа H5N1. При выборе оптимальных праймеров обращали внимание на то, чтобы их температуры плавления различались не более чем на 2⁰С, а T_m зонда была на 10⁰С выше T_m праймеров. Для системы детекции были использованы излучатель флуоресцентного сигнала FAM и гаситель BHQ1.

В результате реакции обратной транскрипции и амплификации синтезировали отрезок генома гена NA размером 198 п.н. и гена HA размером 173 п.н.

Таблица 4. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР-РВ

Название праймера	Последовательность олигонуклеотидов (5' - 3')	Позиция в геноме
Для обнаружения РНК вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР-РВ		
H-F	CACCATCGGAGAATGTCCCAAA	982-1004
H-R	TACCCATACCAACCGTCTACCA	1134-1155
H-Probe	FAM-AGGACTGTTTGGAGCCATAGCAGGTT-BHQ1	1084-1110
Для обнаружения РНК вируса гриппа А подтипа N1 методом ПЦР-РВ		
N-F	GGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC	538-560
N-R	GCAAGAGCCATTTACACATGCAC	711-735
N-Probe	FAM-TTGCCATGATGGCACCAGTTGGTT-BHQ1	569-592

Эффективность и специфичность тест-системы была проверена на вирусах, полученных из коллекции ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ (табл. 1). Результаты исследования различных штаммов вируса гриппа показали возможность определения РНК вируса гриппа А подтипа N1 и H5 (рис. 2) и дифференциации её от РНК других типов и подтипов вируса гриппа.

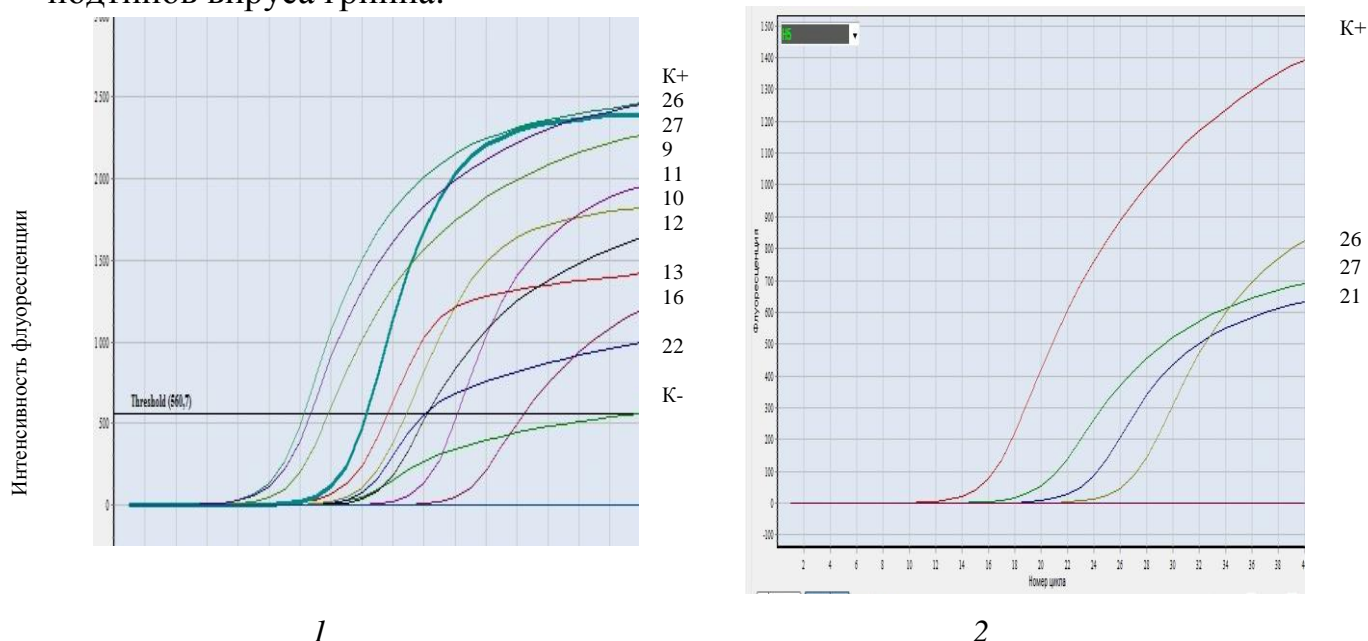


Рисунок 2. Результаты обнаружения РНК вируса гриппа А подтипа N1 (1) и H5 (2) методом ПЦР-РВ.

Кривые 9, 10, 11, 12, 13, 16, 22, 26 и 27, на рисунке 2(1), соответствуют образцам, содержащим вирусы гриппа А подтипа N1.

Кривые 21, 26 и 27, на рисунке 2(2), соответствуют образцам, содержащим вирусы гриппа А подтипа H5.

Специфичность тест-системы проверена на эпидемических штаммах вируса гриппа А, выделенных от млекопитающих и от птиц. Показано наличие

РНК вируса гриппа А подтипа Н5 в эталонных штаммах А/Mallard/Pensylvania/10218/84, А/кураца/Покров/09 и А/Grebe/Novosibirsk/29/05 (табл. 1, рис. 2.2), а также РНК вируса гриппа А подтипа N1 в эталонных штаммах А/WSN/33, А/FPV/Росток и А/Grebe/Novosibirsk/29/05 (табл. 1, рис. 2.1). Вирусы других семейств (*Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Birna Viridae*) не детектируются данной тест-системой. Таким образом, можно говорить о 100% специфичности тест-системы.

Для определения аналитической чувствительности разработанной тест-системы использован образец вируса А/Grebe/Novosibirsk/29/05 с начальным титром 10^5 ЭИД₅₀/мл, последовательные разведения использовали в ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса гриппа А подтипа N1 и Н5.

Установлено, что предел обнаружения РНК вируса гриппа подтипа Н5 составляет 10^2 ЭИД₅₀/мл, а подтипа N1 – 10 ЭИД₅₀/мл, соответственно.

Для создания положительного контроля к разработанной тест-системе использовались специфические праймеры (табл. 4), для синтеза специфических фрагментов использовали референтный штамм вируса гриппа А подтипа Н5N1 А/Grebe/Novosibirsk/29/05. Фрагменты генов НА и NA вируса гриппа А подтипа Н5N1 клонировали в плазмиды рGEM-T Easy. Получены две плазмиды рGEM-Н5-RT и рGEM-N1-RT. После трансформации компетентных клеток *E.coli* проводили скрининг клонов методом ПЦР, с последующим секвенированием полученных вставок. Массовую концентрацию плазмид определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda=260$ нм. Среднее значение концентраций рассчитывали по результатам 6-ти измерений (табл. 5). Концентрация выделенных рекомбинантных плазмид рGEM-Н5-RT и рGEM-N1-RT оказалась равна 0,192 мкг/мкл и 0,215 мкг/мкл соответственно. Данная концентрация соответствует количеству ДНК для плазмиды рGEM-Н5-RT ($5,5 \times 10^7$ молекул/мкл) и для плазмиды рGEM-N1-RT ($6,1 \times 10^7$ молекул/мкл).

Таблица 5. Массовые и молекулярные концентрации рекомбинантных плазмид

Исследуемый образец	Массовая концентрация, мкг/мкл	Средняя массовая концентрация, мкг/мкл	Молекулярная концентрация, молекул/мкл
плазмида рGEM-H5-RT	0,188 0,196 0,194 0,191 0,191 0,193	0,192±0,004	5,5 × 10 ⁷
плазмида рGEM-N1-RT	0,207 0,22 0,217 0,218 0,208 0,220	0,215±0,008	6,1 × 10 ⁷

3. Разработка теста для количественного определения вируса гриппа А подтипа H5N1

Для проведения количественного анализа строили калибровочный график зависимости значений порогового цикла Ct от десятичного логарифма концентрации ДНК. По значению порогового цикла, с помощью компьютерной программы, проводили расчёт концентрации РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 в положительных пробах от птиц.

В качестве стандартных растворов использовали разведения полученной ранее рекомбинантной плазмиды рGEM-H5-RT с концентрацией 5,5×10⁷ молекул/мкл. Для того, чтобы учесть потери при выделении, данные плазмиды добавляли в культуру клеток МДСК. Объем культуры клеток и анализируемого биологического образца был стандартизирован и составлял 200 мкл. Затем проводили ОТ-ПЦР в одной пробирке. При этом дополнительные исследования показали, что в данной постановке реакция обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице исходной РНК) не вносит изменения в исходное количество РНК.

На рисунке 3 представлено определение концентраций РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 в анализируемых биологических образцах. Концентрации молекул РНК в исследуемых пробах составили (молекул/мкл): проба 1 - 2,4×10⁶, проба 2 – 5,0×10⁶, проба 3 - 4,6×10⁵, проба 4 – 5,0×10⁴, проба 5 – 5,2×10³, проба 6 – 1,6×10³, проба 7 – 1,3×10², соответственно.

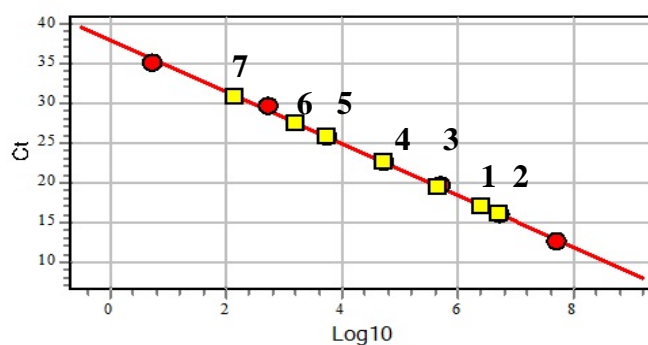


Рисунок - 3. Определение количества вируса гриппа А подтипа H5N1 (молекул/мкл) в пробах.

- - калибровочные растворы,
- - исследуемые образцы.

4. Использование количественного теста для определения накопления рекомбинантного вируса гриппа А/ H5N1, полученного методом обратной генетики

Одним из самых современных подходов молекулярной вирусологии является метод обратной генетики, который можно определить как методический прием, посвященный воссозданию функционального генетического материала. Инфекционная копия вируса позволяет вносить изменения, как в генетический материал, так и в факторы, влияющие на его функции. Создание такой копии позволяет проводить как фундаментальные научные исследования, так и конструировать различные вакцинные препараты, обладающие заданными свойствами. В лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского» МЗ РФ методом обратной генетики на основе вируса гриппа А рR8 (H1N1) был получен рекомбинантный вирус гриппа А подтипа H5N1. У одной из 8 плазмид инфекционного клона ген гемагглютинина H1 был заменен на ген гемагглютинина вируса гриппа А/Курган/05/2005 (H5N1). После трансфекции клеток 293Т/MDCK 8-ю плазмидами инфекционного клона и пассирования в культуре клеток MDCK, а затем в куриных эмбрионах (КЭ) получен рекомбинантный вирус А/H5N1.

На рисунке 4 представлены результаты тестирования рекомбинантного вируса гриппа А/H5N1 на различных стадиях: в культуре клеток MDCK и в аллантоисной жидкости после первого и второго пассажей на куриных эмбрионах.

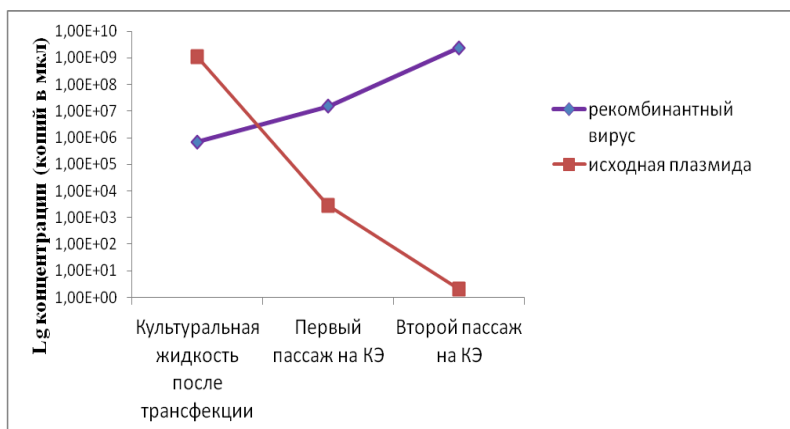


Рисунок 4. Накопление рекомбинантного вируса H5N1 в процессе пассирования и детекция плазмиды инфекционного клона rHW 2000, со вставкой гена гемагглютинина вируса гриппа A/Курган/05/2005 (H5N1).

Разработанная количественная тест-система позволяет следить за накоплением вирусных частиц и, наряду с вирусологическими характеристиками, проводить молекулярный анализ рекомбинантного вируса.

5. Участие в международной интеркалибрации WHO External Quality Assessment Programm (EQAP)

Разработанные тест-системы были использованы для тестирования 9-й панели, в ходе международной интеркалибрации WHO External Quality Assessment Programm (EQAP) по молекулярной диагностике гриппа, проходившей в марте 2011. В таблице 6 представлены результаты молекулярного анализа, полученные в ходе лабораторного экзамена.

По результатам анализа получен Международный сертификат WHO об успешном прохождении теста и соответствии лаборатории международным стандартам по молекулярному анализу вируса гриппа.

Таблица 6. Результаты анализа образцов, полученных от ВОЗ.

Образец	Штамм	Субтип	Генотип	Копии/мкл
2011-01	A/Barn Swallow/Hong Kong/D10-1161/2010	A/H5N1	2.3.2.	7.972 x 10 ²
2011-02	-	-	-	-
2011-03	-	-	-	-
2011-04	A/California/4/2009-like	A/H1N1pdm	-	6.892 x 10 ²
2011-05	A/California/4/2009-like	A/H1N1pdm	-	8.110 x 10 ²
2011-06	A/Turkey/12/06	A/H5N1	2.2	4.123 x 10 ²
2011-07	A/Barn Swallow/Hong Kong/D10-1161/2010	A/H5N1	2.3.2.	8.323 x 10 ²
2011-08	B/Brisbane/60/2008-like (Victoria lineage)	-	-	7.623 x 10 ¹
2011-09	A/Perth/16/2009-like	A/H3N2	-	1.346 x 10 ³

2011-10	A/Turkey/12/06	A/H5N1	2.2	1.358×10^3
2011-11	A/ Brisbane/59/2007-like	A/H1N1	-	3.237×10^2
2011-12	A/Perth/16/2009-like	A/H3N2	-	1.041×10^2

6. Использование разработанных тест-систем для выявления вируса гриппа А подтипа H5N1

Разработанные тест-системы были применены для анализа 648 полевых проб от диких и домашних птиц, отобранных во время эпизоотий 2005-2008 г.г. (см. материалы и методы) (рис.5). Проведенное исследование показало, что разработанные тест-системы являются универсальными и позволяют выявлять высоковирулентный вирус гриппа А подтипа H5N1, Цинхай-Сибирского генотипа H5J 2.2 четырех генетических подгрупп (Цинхайской, Западносибирской, Тувинско-Сибирской и Ирано-Северокавказской), а также Уссурийского генотипа H5J 2.3.2 двух генетических подгрупп (Дальневосточно-Южнокитайской и Западномонгольской).

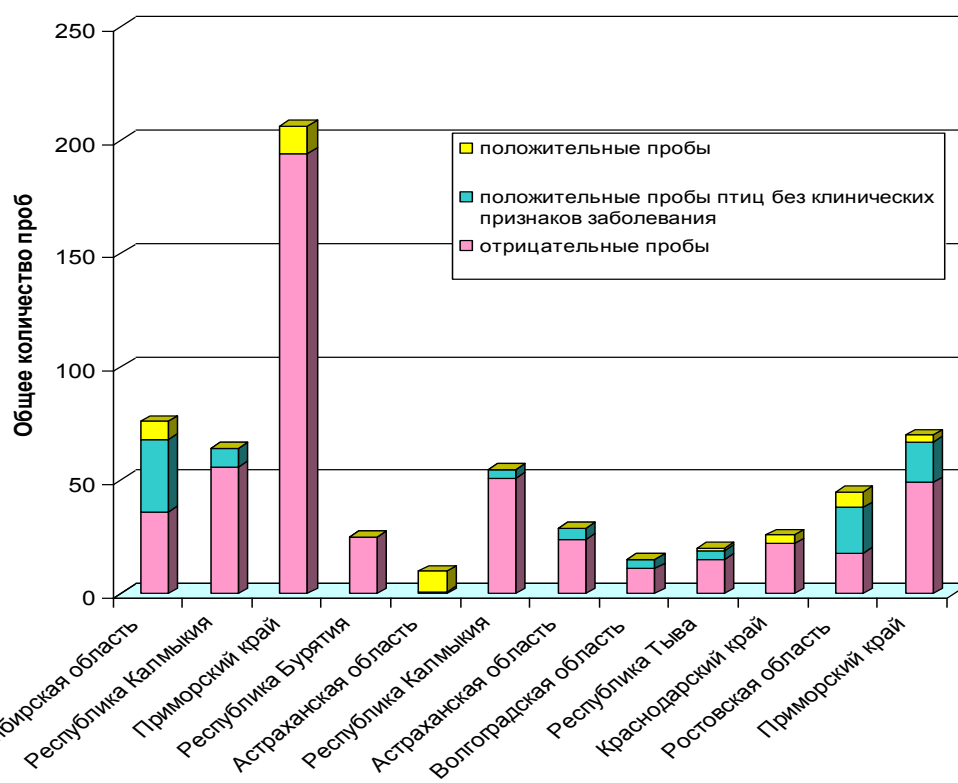


Рисунок 5. Результаты исследования полевых образцов от птиц, отобранных во время эпизоотии 2005-2008 г.г.

Выявление вирусов молекулярными методами было подтверждено классическими методами идентификации вирусов в лаборатории экологии

вирусов ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского» МЗ РФ (руководитель д.б.н. М. Ю. Щелканов). Установлено, что данные тест-системы применимы не только для диагностики вируса гриппа А подтипа H5N1 у погибших и больных птиц, но и у птиц без клинических признаков заболевания (рис.5).

7. Разработка теста на основе непрямого ИФА для обнаружения антител к неструктурному белку вируса гриппа NS1.

В геноме вируса гриппа А присутствует ген неструктурного белка NS1 (S.J.Flint, 2000.). Этот белок не упаковывается в вирионы, таким образом, у инактивированного вируса этого белка практически нет. Существует гипотеза, что по уровню антител к неструктурному белку NS1, возможно различить живые и инактивированные вирусы (Turney T.M., 2005).

Для наработки фрагмента гена NS1 вируса гриппа были разработаны специфические праймеры NS-F 5'-CACCATGGTAATGGATTCCAACACTG-3' и NS-R 5'-TTGGATCCACTTTTGGCTCAATTGTTC-3'. С помощью разработанных праймеров на матрице штамма вируса гриппа A/chicken/Kurgan/3/2005 был получен ПЦР фрагмент с генома вируса гриппа гена NS1.

Полученный участок был клонирован в экспрессионный вектор pET32^{b+} (рисунок 6).

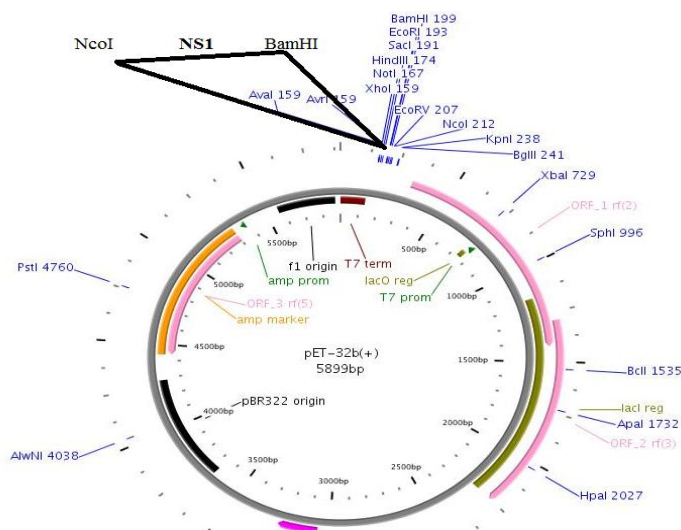


Рисунок 6. Схема получения рекомбинантной плазмиды pET32b⁺, несущей ген NS1 вируса гриппа

Полученная конструкция была трансформирована в экспрессионные клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS, и проведен синтез белка.

В экспрессионной плазмиде есть фрагмент, кодирующий 6 молекул гистицинов, которые транслируются на С-конец рекомбинантного белка NS1, что позволяет очистить его методом металло-хелатной аффинной хроматографии. Наличие продукта подтверждали методом ИФА с моноклональными антителами (МКА) против гистицина (рисунок 7).

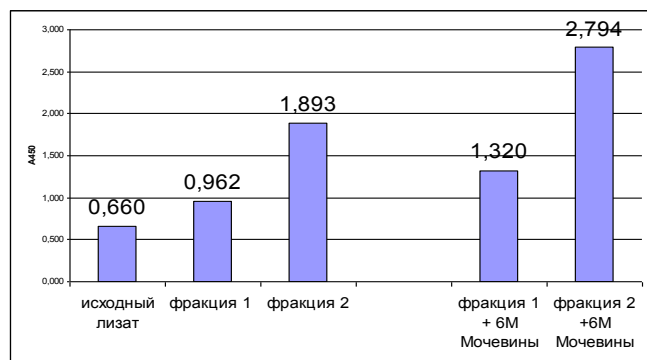


Рисунок 7. Результаты анализа элюатов, полученных при очистке белка rNS1 очистке его в нативных(А) и денатурирующих(Б) условиях методом ИФА.

А Б

Из рисунка 7 видно, что белок более эффективно выделяется в денатурирующих условиях, т.е. в буфере, содержащем 50 мМ имидазола и 6М мочевины. Это было подтверждено анализом рекомбинантного белка NS1 в методами электрофореза в 12% полиакриламидном геле и иммуноблоттинга с мечеными пероксидазой хрена МКА против полигистициновых групп и референтной положительной куриной сывороткой.

Проведение непрямого ИФА с рекомбинантным белком NS1.

Рекомбинантный белок NS1 был использован для сенсibilизации планшетов в ИФА при определении антител к данному белку в сыворотках крови птиц. Предварительное шахматное титрование с референтными сыворотками показало, что оптимальная концентрация белка NS1 составляет 1 мкг/мл, а сыворотки следует разводить в 100 раз.

Были проверены 5 сывороток от кур, привитых «Флупротект Н5» инактивированной эмульгированной вакциной против гриппа птиц типа А подтипа Н5 производства ФГУП «Ставропольская Биофабрика» (серия 040306) и 3 референтные сыворотки от кур, инфицированных вирусом Н5N1 (LPAI), предоставленные Др. Д. Л. Суарэсом (USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS), South East Poultry Research Laboratory, Атэнс, Джорджия, США).

Как показали результаты эксперимента (рис. 8), уровень антител в референтных сыворотках от кур, инфицированных инактивированным вирусом H5N1, значительно превышает таковой в сыворотках вакцинированных кур.

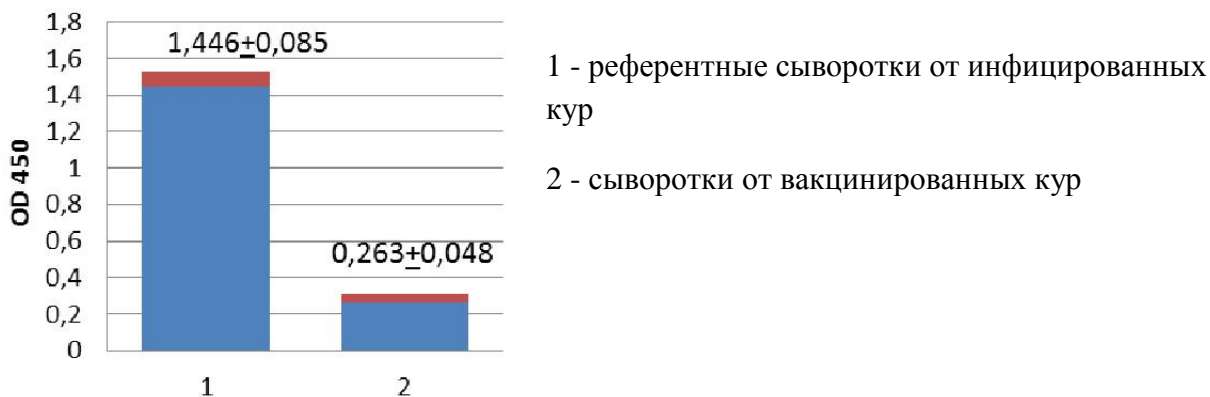


Рисунок 8. Результаты иммуноферментного анализа сывороток кур на наличие антител к белку NS1.

Полученные результаты указывают на возможность применения разработанного метода для дифференциальной диагностики инфицированных птиц и привитых инактивированными вакцинами.

ВЫВОДЫ

1. Разработана «Тест-система для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР» с аналитической чувствительностью $10^2 - 10^3$ ЭИД₅₀/мл, специфичностью 100%, которая позволяет проводить дифференциальный анализ возбудителя в культурах, зараженных вирусом и в образцах биологического материала.
2. Разработан и оптимизирован молекулярно-генетический метод качественного и количественного обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1 и дифференциации его от других подтипов вируса гриппа А и других вирусов на основе ПЦР в реальном времени с аналитической чувствительностью $10 - 10^2$ ЭИД₅₀/мл, специфичностью 100%, который позволяет выявлять патоген в культурах, зараженных вирусом и в образцах биологического материала.
3. Показана возможность использования генно-инженерных положительных контролей на основе плазмиды pGEM-T Easy и клонированных фрагментов генома вируса гриппа подтипа H5N1 для качественного и количественного

контроля определения генома высоковирулентного вируса гриппа А подтипа H5N1.

4. Показано, что метод количественного определения содержания РНК вируса гриппа А подтипа H5N1 методом ПЦР в реальном времени может быть использован для контроля накопления рекомбинантного вируса гриппа H5N1, полученного методом обратной генетики.

5. Показано, что разработанные тест-система и методики на основе ПЦР, ПЦР в реальном времени могут быть использованы при эпидемиологическом обследовании территорий с целью изучения циркуляции вируса гриппа А подтипа H5N1 среди диких и домашних птиц в различных районах РФ. Показана возможность определения вируса гриппа А подтипа H5N1 не только у погибших и больных птиц, но также и у птиц без клинических признаков заболевания.

6. Показано, что рекомбинантный белок NS1 на основе вектора pET32b+ с последующей химической трансформацией штамма *E. Coli* BL21trxB(DE3)pLysS, очищенный металло-хелатной аффинной хроматографией, может быть использован как специфический компонент в непрямом ИФА для выявления антител к белку вируса гриппа NS1.

7. Показан различный уровень антител к белку NS1 у инфицированных и вакцинированных инактивированной вакциной птиц. Это позволит разработать тест-систему для дифференциального выявления вакцинированных инактивированной вакциной и инфицированных птиц на основе выявления антител к белку вируса гриппа NS1 методом непрямого ИФА.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании данных исследований разработаны и предложены для практического использования:

1. Тест-система для обнаружения и дифференциации вируса гриппа А подтипа H5N1 методом полимеразной цепной реакции. Стандарт организации (СТО) 42418073-0001-2007

2. Инструкция по применению тест-системы, утверждена в Министерстве Сельского хозяйства РФ от. 21. 05. 2009 №1-4.7/02562 .

3. Сертификат соответствия № РОСС RU.ФВ01.Н26634, выдан во Всероссийском Государственном Центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Хомик Д.С.** Мониторинг полевых образцов методом ПЦР на наличие вируса гриппа А подтипа Н5 / **Хомик Д.С.**, Киреев Д.Е. // Материалы конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины». – 2006. – С.93-94.
2. Трушакова С.В. Определение вирусов гриппа А в разных образцах с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) / Трушакова С.В., **Хомик Д.С.**, Иванова В.Т., Гребенникова Т.В., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. // Материалы международной научной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных». – 2006. – С.256-260.
3. **Аканина Д.С.** Усовершенствование тест-системы для диагностики вируса гриппа А подтипа Н5N1 методом ПЦР / **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Плетенёва Т.В. // Сборник трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007». – 2007. – С. 195-196.
4. Львов Д.К. Расшифровка эпизоотической вспышки, вызванной высококовирулентным вирусом гриппа А/Н5N1 цинхай- сибирского генотипа, на птицеферме «Лебяжье-чепигинский» (Брюховецкий район Краснодарского края) в августе-сентябре 2007 г. / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Фролов А.В., Федякина И.Т., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Альховский С.В., Галкина И.В., Иголкин А.В., **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Киреев Д.Е., Варкетин А.В., Морозова Т.Н., Самохвалов Е.И., Литвин К.Е., Виткова О.Н., Щербакова Л.О., Ирза В.Н., Дрыгин В.В., Калмыков М.В., Фонтанецкий А.С., Забережный А.Д., Шевкопляс В.Н., Митенко Е.А., Щербина И.А., Алипер Т.И., Громашевский В.Л., Власов Н.А., Непоклонов Е.А. // Сборник трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007». – 2007. – С. 204-208.
5. Львов Д.К. Причины и следствия проникновения высококовирулентного вируса гриппа А на территорию северной Евразии: новые данные об эволюции вируса / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Альховский С.В., Галкина И.В., **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Киреев Д.Е., Самохвалов Е.И., Забережный А.Д., Алипер Т.И., Власов Н.А., Непоклонов Е.А., Громашевский В.Л. // Сборник трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007». – 2007. – С. 209-210.
6. Львов Д.К. Молекулярно-генетические особенности высококовирулентного варианта вируса гриппа А/Н5N1, вызвавшего локальную эпизоотическую вспышку в подмосковье в феврале 2007 г. / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., **Аканина Д.С.**, Громашевский В.Л., Гребенникова Т.В., Федякина И.Т., Галкина И.В., Альховский С.В., Усачева О.В., Киреев Д.Е., Самохвалов Е.И., Виткова О.Н., Щербакова Л.О., Забережный А.Д., Калмыков М.В., Алипер Т.И., Власов Н.А., Непоклонов Е.А. // Сборник трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2007». – 2007. – С. 211-214.
7. Киреев Д.Е. Разработка тест-систем для выявления и типирования вируса гриппа А на основе полимеразной цепной реакции / Киреев Д.Е., **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. // **Вопросы вирусологии.** – 2007. – Т.52, №4. – С. 17-22

8. Щелканов М.Ю. Комплексный эколого-вирусологический мониторинг на территории Приморского края в 2003-2006 гг. / Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Львов Д.Н., Киреев Д.Е., Гурьев Е.Л., **Аканина Д.С.**, Галкина И.В., Аристова В.А., Москвина Т.М., Чумаков В.М., Баранов Н.И., Гореликов В.Н., Усачев Е.В., Альховский С.В., Ляпина О.В., Поглазов А.Б., Шляпникова О.В., Бурухина Е.Г., Борисова О.Н., Федякина И.Т., Бурцева Е.И., Морозова Т.Н., Гренкова Е.П., Гребенникова Т.В., Прилипов А.Г., Самохвалов Е.И., Забережный А.Д., Коломеец С.А., Мирошников В.А., Оропай П.Л., Гапонов В.В., Семенов В.И., Суслов И.О., Волков В.А., Ямникова С.С., Алипер Т.И., Дунаев В.Г., Громашевский В.Л., Маслов Д.В., Новиков Ф.Т., Власов Н.А., Дерябин П.Г., Непоклонов Е.А., Злобин В.И., Львов Д.К. // **Вопросы вирусологии.** – 2007. – Т.52, №5. – С.37-48.
9. Львов Д.К. Молекулярно-генетическая характеристика штамма A/chicken/Moscow/2/2007 (H5N1) из очага эпизоотии высокопатогенного гриппа А среди сельскохозяйственных птиц в Подмоскowie (февраль 2007 г.) / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., **Аканина Д.С.**, Галкина И.В., Гребенникова Т.В., Федякина И.Т., Альховский С.В., Усачева О.В., Киреев Д.Е., Славский А.А., Стариков Н.С., Петренко М.С., Михайлова В.В., Усачев Е.В., Садыкова Г.К., Морозова Т.Н., Самохвалов Е.И., Юдин А.Н., Виткова О.Н., Щербакова Л.О., Забережный А.Д., Калмыков М.В., Громашевский В.Л., Алипер Т.И., Яковлев С.С., Власов Н.А., Непоклонов Е.А., Suarez D. // **Вопросы вирусологии.** - 2007. – Т.52, №6. – С.40-47.
10. **Аканина Д.С.** Рекомбинантный неструктурный белок NS1 вируса гриппа А для дифференциальной диагностики / **Аканина Д.С.**, Богданова В.С., Гребенникова Т.В., Плетенева Т.В. и др. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Ю.М. Кубицкого «Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований». – 2007. - С. 186-189.
11. Гребенникова Т. В., **Аканина Д. С.**, Киреев Д. Е. Львов Д. К., Забережный А. Д., Алипер Т. И. Способ обнаружения вируса гриппа А подтипа H5N1/ Патент № 2361924 от 23. 11. 2007
12. Львов Д.К. Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/H5N1 генотипа 2.2 (Цинхай-сибирский), на пути осенних миграций в северо-восточной части бассейна Азовского моря (краснодарский край) / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Фролов А.В., Федякина И.Т., Бурцева Е.И., Шляпникова О.В., Поглазов А.Б., Альховский С.В., Галкина И.В., Иголкин А.В., **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Киреев Д.Е., Варкентин А.В., Славский А.А., Морозова Т.Н., Самохвалов Е.И., Литвин К.Е., Виткова О.Н., Щербакова Л.О., Ирза В.Н., Дрыгин В.В., Калмыков М.В., Фонтанецкий А.С., Забережный А.Д., Шевкопляс В.Н., Митенко Е.А., Щербина И.А., Алипер Т.И., Громашевский В.Л., Власов Н.А., Непоклонов Е.А., Suarez D. // **Вопросы вирусологии.** – 2008. – Т.53, №2. – С.14-19.
13. Яшкулов К.Б. Изоляция вирусов гриппа А (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae, Avulavirus) на острове Малый Жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря / Яшкулов К.Б., Щелканов М.Ю., Львов С.С., Джамбинов С.Д., Галкина И.В., Федякина И.Т., Бушкиева Б.Ц., Морозова Т.Н., Киреев Д.Е., **Аканина Д.С.**, Литвин К.Е., Усачев Е.В., Прилипов А.Г., Гребенникова Т.В., Громашевский В.Л., Ямникова С.С., Забережный А.Д., Львов Д.К. // **Вопросы вирусологии.** – 2008. – Т.53, №3. – С. 34-38.
14. Львов Д.К. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге европейской части России в декабре 2007 г. / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Галкина И.В., Киреев Д.Е., Фролов А.В., **Аканина Д.С.**, Усачева О.В., Шляпникова О.В., Поглазов А.Б., Морозова Т.Н., Прошина Е.С., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Яковлев С.С., Щербакова Л.О., Шаповалов А.В., Жалин М.В., Руденко В.П., Пичуев А.Е., Литвин К.Н., Варкентин А.В., Стешенко В.В., Харитонов С.П., Прошина Е.С., Самохвалов Е.И., Альховский С.В., Алипер Т.И., МАРтыновченко В.В., Лысенко С.Н., Власов Н.А., Непоклонов Е.А. // **Вопросы вирусологии.** – 2008. – Т.53, №4. – С.18-23.

15. Львов Д.К. Первый прорыв нового для России генотипа 2.3.2 высоковирулентного вируса гриппа А/Н5N1 на Дальнем Востоке / Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Власов Н.А., Прилипов А.Г., Дерябин П.Г., Федякина И.Т., Галкина И.В., Забережный А.Д., Ляпина О.В., Шляпкинова О.В., Киреев Д.Е., Фесенко Е.Е., Калмыков М.В., Виткова О.Н., Морозова Т.Н., Прошина Е.С., Гребенникова Т.В., **Аканина Д.С.**, Самохвалов Е.И., Альховский С.В., Волков В.А., Семенов В.И., Гапонов В.В., Шмаков Н.И., Кушнир А.Т., Казарян А.С., Стариков Н.С., Петренко М.С., Славский А.А., Литвин К.Е., Щербакова Л.О., Фролов А.В., Манин Т.Б., Уманец О.А., Бандеев В.В., Хван А.М., Дунаев В.Г., Челедина Т.П., Абгарян С.Р., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Любченко Е.Н., Флягин В.Н., Тихонова И.Ф., Маслов Д.В., Ананьев В.Ю., Баранов Н.И., Гореликов В.Н., Яковлев С.С., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А., Suarez D. // **Вопросы вирусологии**, 2008. – Т.53, №5. – С.4-8.
16. Сыроешкин А.В. Вирус гриппа А в прибрежных биоценозах Западной Арктики / Азова М.М., Гребенникова Т.В., **Аканина Д.С.**, Колесников М.В., Лапшин В.Б. // **Вестник РУДН. Серия «Медицина»**. - 2008. - №6. – С. 619 -622.
17. Сыроешкин А. В. Вирус гриппа А в прибрежных биоценозах Западной Арктики / Сыроешкин А. В., Гребенникова Т. В., Азова М. М., **Аканина Д. С.**, Колесников М. В., Лапшин В. Б. // Труды IX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». – 27-30 ноября 2008 г. – с. 469.
18. **Аканина Д.С.** Разработка средств диагностики вируса гриппа А подтипа Н5N1 методом ПЦР и ПЦР в реальном времени / **Аканина Д.С.**, Гребенникова Т.В., Плетенева Т.В. // Сборник научных трудов конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека». – 2012. – С.93-96.

Примечание: в 2006 году Хомик Д.С. сменила фамилию на Аканина Д.С.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность директору ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ Академику РАН Д. К. Львову за возможность выполнения данной работы в лаборатории Молекулярной диагностики Института.

Автор выражает глубокую благодарность заместителю директора ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ, Члену-корреспонденту РАМН Л. В. Урываеву за научные консультации в процессе написания работы.

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, профессору, зав. Лабораторией молекулярной диагностики ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ Гребенниковой Татьяне Владимировне за научное руководство, поддержку и консультации при выполнении и написании работы.

Автор выражает особую благодарность д.х.н. зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии РУДН профессору Т.В. Плетенёвой за научные консультации и поддержку, и сотруднику кафедры к.б.н. Т. В. Максимовой.

Автор выражает особую благодарность зав. Лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ д.м.н., профессору Е.И. Бурцевой за предоставленные материалы и консультативную помощь, а также сотрудникам лаборатории д.б.н., ведущему научному сотруднику В.Т. Ивановой, к.б.н. С.В. Трушакковой за консультативную помощь.

Автор выражает глубокую благодарность зав. Лабораторией экологии вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» Минздрава РФ д.б.н., доценту М.Ю. Щелканову за предоставленные материалы вирусологических исследований и научные консультации, к.б.н., ведущему научному сотруднику В.С. Богдановой за консультативную и практическую помощь в выполнении работы.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной диагностики к.б.н. Кирееву Д.Е., к.б.н. Южакову А.Г, к.б.н. Костиной Л.В., за оказанную помощь в выполнении работы. Автор глубоко признателен и благодарен своим соавторам за внимание и ценные консультации при выполнении работы.