

Лозюк С. К.

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь*

Поклонская Н. В.

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь*

Амвросьева Т. В.

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь*

МЕТОДИКА ОДНОВРЕМЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ НОРОВИРУСОВ I И II ГЕНОГРУПП С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Норовирусы (NoV) I и II геногрупп — доминирующие агенты заболеваемости острым гастроэнтеритом (ОГЭ) в закрытых и полужакрытых коллективах. Так, на территории Беларуси за последние 10 лет практически 80 % эпизодов заболеваемости в полужакрытых коллективах было связано с NoV I и II геногруппы [1]. На сегодняшний день диагностические наборы на основе ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления NoV I и II геногрупп в Беларуси отсутствуют. Вместе с тем, выявление обеих геногрупп данных возбудителей актуально для генодиагностики в связи с существенным, хотя и разным, их вкладом в формирование спорадической и групповой норовирусной заболеваемости. Так, из 32 зарегистрированных в нашей стране эпизодов групповой заболеваемости 9 % были вызваны NoV I геногруппы.

Целью исследования являлась разработка методики для одновременного выявления NoV I и II геногрупп с помощью ПЦР.

Материалы и методы. Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из проб применяли коммерческие наборы «Рибо-преп» («АмплиСенс», Россия). Для накопления фрагментов генома вируса использовали Fusion ДНК полимеразу («АртБиоТех», Беларусь). Реакцию секвенирования производили с помощью набора «GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit» (Beckman coulter, США) в соответствии с инструкцией по применению. Детекцию результатов секвенирования осуществляли на приборе CEQ 8000 (Beckman coulter, США), анализ результатов — в MEGA6 [2]. Молекулярное типирование проводили с помощью программного продукта «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0» [3] и BLAST [4].

Результаты и обсуждение. В качестве целевой области для праймеров и зондов в геноме NoV использовался регион перекрытия открытых рамок считывания ORC1 и ORC2. Данная последовательность считается консервативным участком (Kageyama et al., 2003; Nishida et al., 2003). За основу были взяты последовательности праймеров Pang et al. (2004), усовершенствованные Freeman и Trujillo (2008; 2006). В последовательность также были включены вырожденные основания для учета возможности нуклеотидных замен в участках отжига праймеров. В качестве внутреннего контроля реакции была использована армированная РНК фага MS2, входящая в состав «Набора универсальных контрольных образцов

для детекции РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР» (ГУ «РНПЦ ЭМ», Беларусь).

Разработанный комплекс праймеров был проанализирован с использованием программ BLAST и primer-BLAST, а также протестирован на образцах, содержащих энтеровирусы, саповирусы, парэховирусы, аденовирусы F, ротавирусы A, астровирусы, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* Ни с одним из исследованных образцов и человеческой ДНК не было получено неспецифической реакции. Предел обнаружения на модельном объекте (синтезированной РНК с клонированной целевой последовательности) составил для НоВ I геногруппы 50 копий в реакции, для НоВ II геногруппы — 5 копий в реакции. Было проведено сравнительное исследование методики в мультиплексном и моноплексном форматах в 4 независимых постановках, при которых использовались одни и те же стандартные образцы (в двух повторях), и реакции шли одновременно в обоих форматах. По результатам эксперимента максимальное среднее квадратичное отклонение составило 0,594 цикла для разведения 5-копий в реакции для НоВ II геногруппы. Представленные результаты свидетельствуют о высокой специфичности праймеров в отношении последовательности мишени и надежности реакции при ее постановке в мультиплексном формате.

Для проверки линейности получаемых результатов сравнивались показатели C_t (значение порогового цикла реакции), получаемые при постановке каждого возбудителя отдельно и при использовании мультиплексного формата. Кривые регрессии строились по трем разведениям для результатов детекции НоВ I геногруппы и по четырем разведениям — для результатов детекции НоВ II геногруппы. Для построения графика использовались данные, полученные в 4 независимых экспериментах. В обоих случаях значение R^2 было 0,99, что свидетельствует о высокой достоверности результатов.

Для проверки воспроизводимости результатов, получаемых при использовании разработанной методики, была поставлена серия экспериментов на одних и тех же стандартных образцах с постановкой 4 независимых реакций в разные дни и 4 реакций, выполненных одновременно. Все пробы ставились в 2 повторях, в анализе использовалось среднее значение C_t .

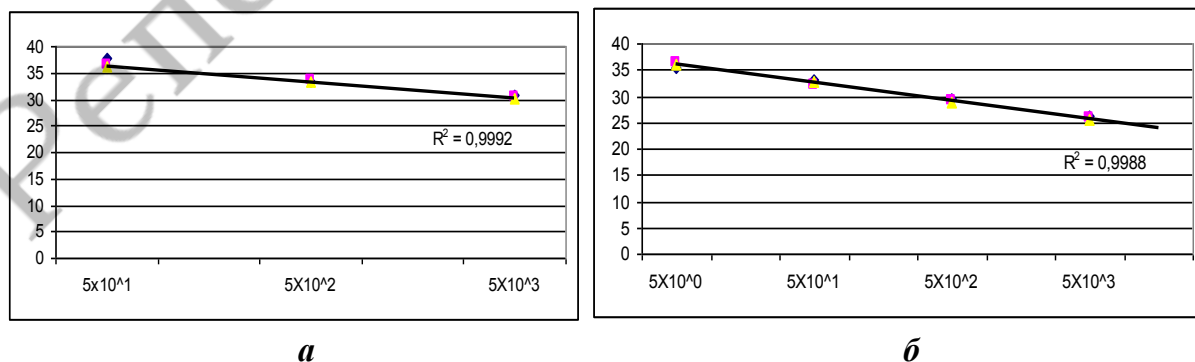


Рис. Линейность результатов выявления для НоВ I (а) и НоВ II геногруппы (б)

Среднеквадратическое отклонение значений C_t (σ) для стандартов, концентрация которых выше $5 \cdot 10^1$ копий в реакции, не превышало 1 цикла. Наблюдался

разброс в пределах 1,5 циклов для разведения $5 \cdot 10^1$ копий в реакции при детекции НоВ I геногруппы и для разведения $5 \cdot 10^0$ копий в реакции для НоВ 2 геногруппы. Данный результат свидетельствует о стабильности разработанной методики и воспроизводимости результатов, получаемых при ее использовании.

Для экспериментальной апробации разработанной методики и сравнения эффективности ее использования с набором ИФА, позволяющим выявлять норовирусы 1 и 2 геногрупп, было исследовано 74 пробы фекалий пациентов с ОГЭ. Всего совпадающие результаты были получены для 56,1 % анализируемых образцов. Положительный результат при исследовании методами ИФА и ПЦР был получен для 21,2 % образцов, отрицательный — для 34,3 %. При этом методом ИФА было выявлено всего 27,4 % положительных образцов, а методом ПЦР — 60,3 %. В случаях, когда результат ИФА и ПЦР не совпадал, проводилось молекулярно-генетическое типирование выявленного вируса, с помощью которого были подтверждены положительные результаты, полученные с использованием разработанной методики. Результаты молекулярного типирования показали, что обнаруженные НоВ принадлежали к следующим генотипам: GI.17(21,2 %), GI.P16/GI.2 (20 %), GI.P16/GI.4 (18,6 %), GI.Pe/GI.4 (12,8 %), GI.4 (8 %), GI.P16/GI.3 (7,7 %), GI.P4/GI.4 Sydney 2012 (4,5 %), GI.P16 (3,8 %), GI.P7 (1,3 %), GI.P21 (1,3 %). Как оказалось, разработанная методика позволяет выявлять новые, ранее не регистрируемые варианты вирусов. Так, с ее помощью были выявлены НоВ, относящиеся к ранее не выявляемым на территории нашей страны генотипам: GI.Pe/GI.4, GI.P17, GI.21, GI.P7, GI.P16/GI.2, GI.P16/GI.4, GI.P16/GI.3, GI.3.

Анализ воспроизводимости результатов

Концентрация мишени	НоВ I геногруппы				НоВ II геногруппы			
	$5 \cdot 10^0$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^0$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
σ в 4 независимых постановках	–	1,51	0,06	0,3	0,49	0,67	0,17	0,14
σ в 4 одновременных постановках	–	1,39	0,008	0,04	1,5	0,05	0,02	0,83

Выводы. В ходе проведенных исследований разработана эффективная методика одновременной детекции НоВ I и II геногрупп методом мультиплексной ПЦР в реальном времени. Данная методика оказалась более чувствительной, по сравнению с применяемыми для этих целей коммерческими ИФА наборами, а также подходящей для обнаружения новых, ранее не циркулировавших в Республике Беларусь норовирусных генотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Групповая* заболеваемость норовирусными гастроэнтеритами в республике Беларусь и молекулярная эпидемиология возбудителей / Н. В. Поклонская [и др.] // Медицинские новости. 2013. № 12. С. 78–82.
2. *MEGA6* : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / T. Koichiro [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
3. *An automated* genotyping tool for enteroviruses and noroviruses / A. Kroneman [et al.] // J. Clin. Virol. 2011. Vol. 51(2). P. 121–125.
4. *Basic* local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215. P. 403–410.