

М. А. Ермолович, А. С. Бабенко¹, Н. В. Климович², Е. О. Самойлович

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПАРВОВИРУСА В19 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии,
ОДО «Праймтех»¹,

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»²

С использованием компонентов только отечественного производства разработан набор реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 методом ПЦР в режиме реального времени и проведена апробация его применения для верификации диагноза. Результаты исследования 53 образцов сыворотки крови пациентов с острой экзантемой, полученные разработанным набором реагентов и аналогичным коммерческим набором, полностью совпали. С использованием отечественного набора реагентов проведена верификация диагноза парвовирусной инфекции у пациентов с костно-суставной патологией, хроническими заболеваниями печени, беременных женщин с неиммунной водянкой плода. Наличие отечественного набора реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 позволит повысить качество и доступность специфической лабораторной диагностики, оценить распространенность и клиническую значимость парвовирусной инфекции в стране.

Ключевые слова: апробация, парвовирус.

**M. A. Yermalovich, A. S. Babenko, N. V. Klimovich,
E. O. Samoilovich**

DEVELOPMENT AND APPROBATION OF A DOMESTIC KIT FOR DETECTION OF PARVOVIRUS B19

Using components of domestic production only, a kit for detection of parvovirus B19 DNA using real-time PCR was developed and an approbation of its use for verification of the diagnosis was carried out. The results of the testing of 53 serum samples from patients with acute exanthema, obtained by the developed kit and a similar commercial kit, completely coincided. Using the domestic kit, the diagnosis of parvovirus infection in patients with osteoarticular pathology, chronic liver disease, and pregnant women with non-immune hydrops fetalis was verified. The presence of a domestic kit for detecting parvovirus B19 DNA will improve the quality and availability of specific laboratory diagnosis and allow to assess the prevalence and clinical significance of parvovirus infection in the country.

Key words: approbation, parvovirus.

Парвовирус В19 представляет собой небольшой ДНК-содержащий вирус, который является патогенным только для человека и размножается преимущественно в клетках-предшественниках эритроидного ряда. Парвовирусная инфекция характеризуется широким спектром клинических проявлений, однако нередко может протекать бессимптомно [4]. Наиболее распространенной формой заболевания является инфекционная эритема (пятая болезнь), которая преимущественно встречается у детей, но может наблюдаться в любом возрасте, и у взрослых нередко сопровождается переходящими артропатиями [5]. Парвовирусная инфекция, перенесенная в период беременности, может приводить к развитию водянки плода и его гибели [7]. Парвовирус В19 был также описан как этиологический агент острого гепатита, в том числе фульминантного [8], и возможный триггер формирования ревматоидного артрита [9]. В трансплантологической парвовирусом В19 тяжелая анемия (вслед-

ствие аплазии клеток красного ростка кроветворения) может приводить к отторжению пересаженных органов [1]. В последние годы увеличилось число исследований, касающихся роли парвовирусной инфекции в инициации развития солидных злокачественных новообразований, а также злокачественных новообразований системы кроветворения [2, 12]. Учитывая разнообразие симптомов парвовирусной инфекции, как клинические, так и научные программы ее исследований должны сопровождаться надежными доступными методами верификации диагноза.

Диагностика парвовирусной инфекции основана на выявлении специфических сывороточных IgM антител или обнаружении вирусной ДНК в сыворотке крови и других видах клинического материала (содержимое серозных полостей, биоптаты органов и тканей и др.) [3]. Специфические IgM антитела формируются в ответ на первичное инфицирование парвовирусом В19 и сохраняются в тече-

ние 1–3 месяцев. Однако у лиц с нарушенным иммунным статусом такие антитела могут отсутствовать или, напротив, их сыворотка кровиможет формировать ложноположительную реакцию в ИФА. Таким образом, во многих случаях выявление вирусной ДНК является наиболее надежным для верификации диагноза.

Оптимальным методом детекции вирусной ДНК служит ПЦР в режиме реального времени, что обусловлено его высокой чувствительностью, а также низкой стоимостью реагентов и доступностью оборудования для его проведения. В настоящее время существует ряд коммерческих тест-систем для выявления ДНК парвовируса В19, вместе с тем, также нередко используются разработанные «in-house» аналогичные тест-системы [6, 10, 11]. Целью настоящей работы является разработка отечественного набора реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 в образцах биологического материала и его использование для верификации диагноза парвовирусной инфекции. Разработка призвана решить несколько задач, включая расширение диагностических возможностей отечественных лабораторий, повышение качества оказания медицинских услуг, импортозамещение имеющихся аналогов.

Материалы и методы

Выбор молекулярных мишеней и дизайн олигонуклеотидов осуществляли с использованием данных портала NCBI и бесплатной базы нуклеотидных последовательностей GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Процедуру выравнивания последовательностей перед дизайном олигонуклеотидов проводили с использованием демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 (<http://www.thermofisher.com/by/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software.html>) и встроенного приложения AlignX.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли поэтапно для выбранных участков генома парвовируса В19 и гена внутреннего контроля с помощью бесплатного программного онлайн приложения Primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) и бесплатного онлайн алгоритма mfold/DNAfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>). Для анализа вероятности образования вторичных шпилечных структур и димеров олигонуклеотидов использовали бесплатное онлайн обеспечение OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и демонстрационную версию коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 (<http://www.thermofisher.com/by/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software.html>).

Для создания системы контролей использовали референсные образцы ДНК парвовируса В19 (подтверждено классической нестед-ПЦР с последующим нуклеотидным секвенированием фрагмента генома) и референсные образцы геномной ДНК человека (выделение из сыворотки крови сертифицированным коммерческим набором). В качестве контролей использовали образцы плазмидной ДНК, содержащие специфические участки ампликонов мишени (парвовируса В19) и внутреннего контроля (ген GAPDH/геном человека). Рекомбинантные конструкции были получены с использованием коммерческого набора реагентов TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, USA, pGlow-TOPO vector) в соответствии с требованиями инструкции по применению.

ПЦР в режиме реального времени проводили с помощью реагентов производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Состав реакционной смеси базового протокола: концентрация ионов магния – 2 мМ, концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата – 0,2 мМ, концентрация флуоресцентно-меченого зонда и праймеров – 500 нМ каждого, смеси термостабильных Taq и Pfu полимераз – 1,25 МЕ (1 единица Taq-полимеразы и 0,25 единицы Pfu-полимеразы), концентрация Трис-НСl – 60 мМ (рН 9,0), концентрация сульфата аммония – 17 мМ, содержание детергента Твин-20 – 0,01 %. Для исследования брали 100–200 нг ДНК. Общий объем реакционной смеси 25 мкл. Был использован следующий режим амплификации: один цикл 95 °С – 5 минут, 45 циклов 95 °С – 10 секунд, 60 °С – 1 минута. Флуоресценция считывалась в конце стадии элонгации. Для проведения ПЦР в режиме реального времени были использованы приборы ABI 7500 (Applied Biosystems, США) и CFX96 (BioRad, США).

Для валидации результатов, полученных с помощью разработанного набора, использовали коммерческий набор реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенсParvovirus В19-FL» (Россия). В качестве референсной выборки использовали 53 образца сыворотки крови пациентов с острой экзантемой, в том числе 36 положительных на наличие ДНК парвовируса В19 и 17 – отрицательных.

Разработанный набор реагентов был использован для верификации диагноза парвовирусной инфекции у 96 пациентов с костно суставной патологией (59 взрослых и 37 детей), 56 взрослых пациентов с хроническими заболеваниями печени, 31 беременной женщины с неиммунной водянкой плода.

Результаты и обсуждение

Разработка и валидация набора реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 методом ПЦР в режиме реального времени

Для обеспечения детекции парвовируса В19 каждого из трех известных генотипов были отобраны референсные последовательности ДНК генома возбудителя этих генотипов и проведено их выравнивание (таблица 1).

В результате сравнительного анализа было выбрано 5 участков генома парвовируса В19, обладающих наибольшей консервативностью для всех трех генотипов (таблица 2). Выбранные последовательности были проверены на наличие гомологии в геноме человека, других млекопитающих и микроорганизмов с помощью сервиса NCBI – Blast. Совпадений вне генома парвовируса выявлено не было. Выбранные последовательности имели GC состав, максимально приближенный к 50 %, и практически не имели стабильных шпилечных структур при +60 °С.

Всего для возможности плановой смены наборов олигонуклеотидов и снижения риска контаминации были сконструированы три набора олигонуклеотидов для амплификации участков генома парвовируса В19. Для каждого набора был проведен анализ нуклеотидных последовательностей олигонуклеотидов и полученных на их основе ампликонов на наличие димеров и шпилечных структур, который во всех трех случаях не выявил стабильных структур.

В качестве внутреннего контроля реакции амплификации была использована геномная ДНК человека, при-

Таблица 1. Сведения о нуклеотидных последовательностях парвовируса В19 трех генотипов, использованных в качестве референсных

Генотип	Номер PubMed	Длина	Наименование
1	AY386330.1	5596 пн	B19 virusisolate J35
	FJ591158.1	5412 пн	Human parvovirus B19 isolate KU1
	AB030673.1	4628 пн	Human parvovirus B19 isolate: N8
	DQ408301.1	4890 пн	Human parvovirus B19 isolate BN30.1
	AY504945.1	5595 пн	B19 virusisolate NAN
	AF162273.1	5594 пн	Erythrovirus B19 strain HV
	NC_000883.1	5594 пн	Humanparvovirus B19
2	DQ333427.1	4767 пн	Human parvovirus B19 isolate BN32.2
	DQ333428.1	4517 пн	Human parvovirus B19 isolate BN33.2
	AB550331.1	5588 пн	Human parvovirus B19 DNA isolate: F27
	DQ333426.1	4925 пн	Human parvovirus B19 isolate BN31.2
	NC_004295.1	5028 пн	Humanerythrovirus V9
3	DQ408303.1	4890 пн	Human parvovirus B19 isolate BN30.3
	DQ408302.1	4930 пн	Human parvovirus B19 isolate BN58.3
	DQ408304.1	4931 пн	Human parvovirus B19 isolate BN60.3
	DQ408305.1	4931 пн	Human parvovirus B19 isolate BN59.3

Таблица 2. Топология наиболее консервативных участков на полноразмерной последовательности ДНК парвовируса, выбранных для конструирования праймеров

Номер участка генома	Расположение консервативного участка на полногеномной ДНК парвовируса В19	Локализация на полногеномной ДНК парвовируса В19	Длина консервативного участка, п.о.	% гомологии для парвовирусов В19 всех известных генотипов
1	2040–2281	NS1	241	>90
2	2147–2281	NS1	134	
3	2957–3106	VP1u	149	
4	3068–3267	VP1u/VP2	199	
5	3215–3345	VP1/VP2	130	

сутствующая во всех исследуемых образцах клинического материала, пригодных для диагностики парвовирусной инфекции человека. Мишенями для создания последовательностей внутреннего контроля служили гены GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) и СYP1B1 (цитохром P450, семейство 1, подсемейство В, полипептид 1, для выявления которых были подобраны специфические праймеры и флуоресцентно-меченые зонды.

На основании компьютерного анализа было сконструировано 6 наборов олигонуклеотидов: 4 с использованием в качестве мишени GAPDH и 2 с использованием СYP1B1. Наборы специфических олигонуклеотидов были подвергнуты компьютерному анализу на предмет наличия вторичных структур типа шпилька, а также димеров олигонуклеотидов одного типа, одной последовательности или разных типов и последовательностей. Результаты анализа показали, что все смеси пригодны для использования в качестве внутреннего контроля, однако последующая постановка ПЦР в режиме реального времени выявила, что оптимальными являются смеси, направленные на ген GAPDH (Gin 3 и Gin 4). Для последующих этапов работы был использован набор Gin 3.

Проведена сравнительная оценка разработанного экспериментального набора для выявления ДНК парвовируса В19 в режиме реального времени и аналогичной коммерческой тест-системы. На наличие ДНК парвовируса В19 с помощью экспериментального набора было исследовано 53 образца сыворотки крови, в том числе 36 положительных и 17 отрицательных. В качестве

референс-набора был использован зарегистрированный в Республике Беларусь коммерческий набор реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 в клиническом материале методом ПЦР с гибридоизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенсParvovirus B19-FL» (Россия).

Все 36 образцов сыворотки крови, распознанные коммерческим набором как положительные, были положительными в разработанном наборе. Все 17 отрицательных по результатам «АмплиСенсParvovirus B19-FL» образцов были отрицательными и в разработанном наборе (таблица 3). Таким образом, диагностическая чувствительность разработанного набора составила 100 %, диагностическая специфичность – 100 %. Поскольку разработанный набор предполагает только определение наличия или отсутствия ДНК парвовируса В19 в образце (качественный анализ), сравнение с коммерческим набором по количественным характеристикам не проводилось.

После проведения клинических испытаний Министерством здравоохранения Республики Беларусь был зарегистрирован «Набор реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 методом ПЦР в режиме реального времени (Parvovirus B19)», ТУ ВУ 100558032.264-2015 (регистрационное удостоверение № ИМ-7.103611 от 16.12.2015).

Разработанный набор реагентов был использован для верификации диагноза парвовирусной инфекции в группах пациентов, для которых использование только серологической диагностики является недостаточным, включая лиц с костно-суставной патологией, хроническими заболеваниями печени, беременных женщин с не-

Таблица 3. Выявление ДНК парвовируса В19 у взрослых и детей с различными формами костно-суставной патологии

Нозологическая форма	Обследовано, абс.	Выявлено, абс. (%)
Взрослые		
Артриты	27	6 (22,2 %)
В том числе:		
Ревматоидный артрит	13	2 (15,4 %)
Недифференцированные полиартриты	14	4 (28,6 %)
Артрозы в ст.обострения	32	1 (3,1 %)
Дети		
Реактивный артрит	37	0

иммунной водяняккой плода. Необходимость использования молекулярных методов была обусловлена риском получения ложноположительных результатов при исследовании IgM у таких пациентов вследствие нарушения у них иммунного статуса, либо длительным периодом между инфицированием и выявлением заболевания, приводящим к получению ложноотрицательных результатов выявления IgM, как это наблюдается при водянке плода.

У лиц с костно-суставной патологией основанием для обследования на парвовирусную инфекцию служило внезапное появление острого артрита у детей и взрослых, а также такие состояния у взрослых, как обострение ревматоидного артрита и артрозы в стадии обострения, сопровождающиеся синовитами, требующими разгрузочной пункции сустава (таблица 3).

У детей ни в одном случае генетический материал парвовируса В19 обнаружен не был, в то время как у взрослых пациентов он выявлен в 22,2 % случаев. Несколько чаще парвовирусная инфекция служила причиной развития недифференцированных артритов (28,6 %), однако обнаруживалась и при ревматоидном артрите (15,4 %), симулируя обострение основного заболевания. Обострение артроза крайне редко было обусловлено присоединением парвовирусной инфекции (3,1 %).

Поражение суставов при парвовирусной инфекции в большинстве случаев имело благополучный исход. Однако у 3 женщин суставной синдром характеризовался волнообразным течением, и через 6-12 месяцев был зафиксирован переход в тяжелую ревматическую патологию: ревматоидный артрит, недифференцированный полиартрит, недифференцированный эрозивный полиартрит. В последнем из указанных случаев формирование ревматической патологии происходило на фоне длительной (в течение 14 месяцев) персистенции в крови ДНК парвовируса В19, что было подтверждено 4-кратным проведением ПЦР с интервалом 1–8 месяцев.

У пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени цитопенический синдром является одним из проявлений основного заболевания, однако сходные симптомы могут быть следствием инфицирования парвовирусом В19. При обследовании 56 пациентов с хроническими заболеваниями печени и признаками анемии, тромбоцитопении или лейкопении у 7 в сыворотке крови была обнаружена ДНК парвовируса В19, у 49 маркеры парвовирусной инфекции отсутствовали. Снижение уровня гемоглобина наблюдалось у 5 (71,4 %) из 7 заболевших с парвовирусной инфекцией и лишь у 26,5 % (13/49) пациентов без маркеров парвовирусной инфекции ($p = 0,02$).

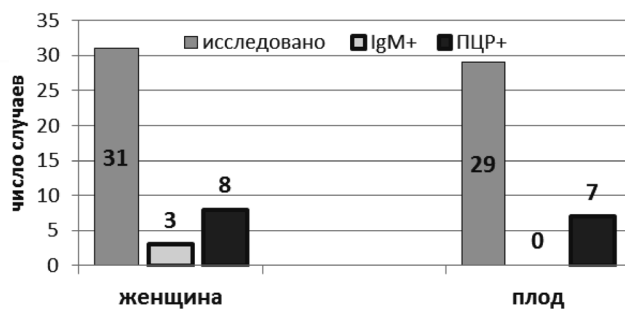


Рисунок. Число случаев водянки плода парвовирусной этиологии, верифицированных серологическими и молекулярными методами

Частота тромбоцитопении и лейкопении в этих группах пациентов статистически не различались (42,9 % и 36,7 %, соответственно). Таким образом, в группах пациентов с костно-суставной патологией и хроническими заболеваниями печени, у которых серологическая диагностика может быть затруднена вследствие риска получения ложноположительных результатов ИФА, детекция генетического материала возбудителя методом ПЦР является более надежным методом диагностики.

Парвовирусная инфекция является одной из значимых причин развития неиммунной водянки плода (НИВП) при заболевании женщины в период беременности. При исследовании клинического материала от 31 женщины с НИВП только у 3 (9,7 %) имелись специфические IgM антитела. В то же время, ДНК парвовируса В19 была обнаружена у 8 (25,8 %) женщин, что позволило подтвердить парвовирусную этиологию заболевания (рисунок).

Формирование водянки происходит в срок от двух недель до 2–3 месяцев после инфицирования, поэтому на момент выявления патологии плода и проведения обследования IgM антитела у женщины могут уже исчезнуть, то есть результат их исследования будет ложноотрицательным. Применение молекулярных методов диагностики является более предпочтительным при этиологической расшифровке случаев водянки плода.

Клинический материал новорожденных и плодов был доставлен на исследование в 29 случаях НИВП, в том числе в 26 случаях это была сыворотка крови, в пяти случаях также околоплодные воды или содержимое серозных полостей и в одном случае - патологоанатомические образцы внутренних органов. IgM антитела не были обнаружены ни в одном образце сыворотки крови. Вирусную ДНК удалось выявить у 7 новорожденных или плодов, в том числе в образцах сыворотки крови (5 случаев), околоплодных вод, асцитической жидкости, патологоанатомических образцах (по одному случаю). Таким образом, при обследовании новорожденного или плода ПЦР-диагностика является еще более значимой, чем при обследовании женщины, предоставляя практически единственный инструмент подтверждения инфицирования парвовирусом В19.

Выявление ДНК парвовируса В19 является эффективным и надежным средством диагностики парвовирусной инфекции и может применяться как у пациентов с острой экзантемой при отсутствии ИФА-тест-систем, так и в тех случаях, когда серологическая диагностика оказывается недостаточной или малоэффективной (у лиц с нарушенным иммунным статусом, костно-суставной патологией, в случаях водянки плода, для оценки длитель-

ности вирусии, исследовании патологоанатомического материала и т. д.).

Наличие отечественного набора реагентов для выявления ДНК парвовируса В19 позволит повысить качество и доступность специфической лабораторной диагностики, более полно оценить распространенность и клиническую значимость парвовирусной инфекции в стране.

Литература

1. A Case Report of Parvovirus B19 Infection in a Renal Allograft / D. M. Oramas [et al.] // *Int. J. Surg. Pathol.* – 2017. – Vol. 25, № 7. – P. 648–651.
2. *Detection* and a possible link between parvovirus B19 and thyroid cancer / A. Etemadi [et al.] // *Tumour Biol.* – 2017. – Vol. 39, № 6. – P. 1–7.
3. *False-negative serology* in patients with acute parvovirus B19 infection / S. Bredl [et al.] // *Journal of Clinical Virology.* – 2011. – Vol. 51. – P. 115–120.
4. Heegaard, E. D., Brown K. E. Human Parvovirus B19 / E. D. Heegaard, K. E. Brown // *Clin. Microbiol. Rev.*– 2002. – Vol. 15, № 3. – P. 485–505.
5. *High incidence* of maternal parvovirus B19 infection in a large unselected population-based pregnancy cohort in Norway / R. Barlinn [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2017. – Vol. 94. – P. 57–62.

Оригинальные научные публикации

6. *Koppelman*, M. H. Real-time polymerase chain reaction detection of parvovirus B19 DNA in blood donations using a commercial and an in-house assay / M. H. Koppelman, P. van Swieten, H. T. Cuijpers // *Transfusion.* – 2011. – Vol. 51, № 6. – P. 1346–1354.
7. *Ornoy*, A., Ergaz, Z. Parvovirus B19 infection during pregnancy and risks to the fetus / A. Ornoy, Z. Ergaz // *Birth Defects Res.* – 2017. – Vol. 109, № 5. – P.311-323.
8. *Parvovirus* B19 induced hepatic failure in an adult requiring liver transplantation / D. S.Krygier, et al. // *World J.Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15, № 32. – P. 4067–4069.
9. *Parvovirus* B19 infection modulates the levels of cytokines in the plasma of rheumatoid arthritis patients / M. Naciute [et al.] // *Cytokine.* – 2017. – Vol. 96. – P.41–48.
10. *Quantitative* analysis of human parvovirus B19 DNA in maternal and fetal serum, and amniotic fluid during an early stage of pregnancy / A. Ishikawa [et al.] // *J. Med Virol.* – 2015. – Vol. 87, № 4. – P. 683–685.
11. *Validation* of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA / M. W. Molenaar-de Backer [et al.] // *Transfusion.* – 2016. – Vol. 56, № 2. – P. 440–448.
12. *Zaki*, S. A. Detection of human parvovirus B19 in cancer patients using ELISA and real-time PCR / S. A. Zaki // *Indian J. Med.Microbiol.* – 2012. – Vol. 30, № 4. – P. 407–410.

Поступила 18.08.2017 г.