

А.О.Семенцова, А.Н.Шиков, В.А.Терновой, А.В.Винокурова, Н.Е.Костина, Е.А.Ставский, А.П.Агафонов

## РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСОВ МАРБУРГ, ЭБОЛА И ЛАССА

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

В работе изложены материалы по разработке и апробации методики для идентификации вирусов Марбург, Эбола и Ласса, основанной на мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, и для проведения дифференциальной диагностики геморрагических лихорадок, вызванных этими вирусами. Представлены результаты по определению аналитической чувствительности и специфической активности мультиплексной ПЦР.

*Ключевые слова:* вирусы Марбург, Эбола, Ласса, мультиплексная ПЦР в режиме реального времени.

A.O.Sementsova, A.N.Shikov, V.A.Ternovoy, A.V.Vinokurova, N.E.Kostina, E.A.Stavsky, A.P.Agafonov

## Development of the Multiplex Real-Time PCR for Marburg, Ebola, and Lassa Viruses Identification

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo

Presented are the data on the development and approbation of the method of Marburg, Ebola, and Lassa viruses identification based on real-time multiplex PCR with hybridization-fluorescent detection. This method is meant for the differential diagnostics of hemorrhagic fevers caused by these viruses. Displayed are the results of determination of multiplex PCR analytical sensitivity and specific activity.

*Key words:* Marburg, Ebola, and Lassa viruses, multiplexed real-time PCR.

Вирусы Эбола и Марбург, относящиеся к семейству *Filoviridae*, и вирус Ласса, относящийся к семейству *Arenaviridae*, являются возбудителями тяжелых геморрагических лихорадок, вспышки и эпидемии которых ежегодно возникают в странах африканского континента. В течение последних 5 лет в Африке зарегистрировано как минимум четыре вспышки заболеваний, вызванных вирусами Эбола и Марбург. В эти эпидемии были вовлечены сразу несколько стран. Вспышка лихорадки Эбола в Уганде в 2007 г. унесла жизни 37 человек (25 % из общего числа заболевших – 149 человек). В числе пациентов оказались 12 местных медицинских работников, 5 из них умерли [1]. Одна из самых крупных вспышек геморрагической лихорадки Марбург была зарегистрирована в Анголе в 2005 г. и стала причиной гибели 329 человек [2]. В 2007 г. в Уганде вирус Марбург был идентифицирован у трех пациентов с клинической картиной геморрагической лихорадки [6].

Появление этих заболеваний в неэндемичных регионах мира связано, в первую очередь, с завозом инфекционных патогенов из эндемичных районов Африки [4]. Так, в 2009 г. в Великобритании регистрировались случаи завоза геморрагической лихорадки Ласса из Мали и Нигерии [5], а в июле 2008 г. в Европе зарегистрирован случай завоза вирусной геморрагической лихорадки Марбург. У женщины, приехавшей в Голландию из Уганды, на 4-е сутки после приезда развилась клиническая картина тяжелой геморрагической лихорадки. Кроме того, нужно иметь в виду постоянную угрозу умышленного использования инфекционных патогенов в качестве

оружия биотерроризма.

Таким образом, разработка методов диагностики инфекционных заболеваний, вызванных вирусами геморрагических лихорадок, важна даже в странах, где вспышки ранее не регистрировались. В связи с этим вирусные геморрагические лихорадки Марбург, Эбола и Ласса, наряду с другими особо опасными инфекциями, включены в перечень инфекционных заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации (Приказ Минздрава РФ № 263 от 02.07.1999). Необходимость как можно более быстрого установления этиологического агента при вирусных геморрагических лихорадках напрямую связана с эффективностью последующих противоэпидемических, профилактических и лечебных мероприятий.

Целью нашей работы явилась разработка способа диагностики вирусных геморрагических лихорадок Марбург, Эбола и Ласса, основанного на методе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

### Материалы и методы

В работе использованы вирусы геморрагических лихорадок Марбург (штамм Popp), Эбола-Заир (штамм Mayinga), Эбола-Судан (штамм Boniface), полученные из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор».

Для изучения специфической активности в качестве контрольных образцов, не содержащих матричной ДНК, были использованы: кДНК вируса кори

(изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2), ДНК человека, ДНК обезьян. Изолят вируса кори был получен из носоглоточного смыва больного. ДНК обезьян (капуцины и саймири семейства *Cebidae* Swainson [3]) получена из образцов крови животных.

В работе использовали клетки Vero, полученные из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», и питательная среда Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла MEM x 2ABK) производства ГНЦ ВБ «Вектор».

Культивирование вируса проводили в стационарном режиме на монослой клеток Vero в культуральных флаконах объемом 1 л. Множественность заражения составляла 0,01–0,1 БОЕ на клетку. Адсорбцию вируса проводили в течение 30 мин при температуре 37 °С. После этого монослой клеток заливали 150 мл питательной среды Игла MEM x 2ABK, содержащей 0,06 % глутамина, 2 % эмбриональной сыворотки КРС и антибиотики (бензилпенициллин – 100 ед./мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). Клетки инкубировали при температуре 37 °С до появления ЦПД, в среднем 5 сут. КВЖ использовали для выделения РНК вируса.

Предварительную инактивацию образцов и выделение РНК проводили в условиях, регламентированных МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Вирусную РНК выделяли из культуральной вирусосодержащей жидкости с использованием набора реагентов «Комплект реагентов для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» (НПФ Литех, Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-L» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией по применению.

Специфические праймеры и зонды для вирусов Марбург, Эбола и Ласса подбирали в программе Vector NTI 9.0.0 (InforMax) и с использованием последовательностей геномов этих вирусов, депонированных в международной базе данных NCBI GeneBank.

Реакцию амплификации с детекцией продуктов в режиме реального времени проводили на приборах iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) и Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Результаты ПЦР реги-

стрировали по оптическим каналам Green (470 нм / 510 нм), Yellow (530 нм / 555 нм) и Orange (585 нм / 610 нм). Для детекции продуктов амплификации использовали зонды в формате TaqMan beacons.

Для обеспечения «горячего старта» в реакции амплификации использовали Smart Taq ДНК-полимеразу (ООО «Лаборатория Медиген», Россия).

Положительные контрольные образцы (ПКО) для детекции вирусов Марбург и Эбола были получены методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидами pCR 2.1, включающими вставки ДНК-фрагментов, соответствующих участку гена L вирусов Марбург и Эбола, с последующим выделением и очисткой плазмидной ДНК из бактериальных клеток.

Для детекции вируса Ласса положительные контрольные образцы были получены на основе рекомбинантной плазмиды pUC, несущей вирусспецифическую вставку.

Оптимизацию условий проведения ПЦР проводили по температуре отжига праймеров, концентрации в реакционной смеси праймеров, зондов и ионов магния.

Оценку аналитической чувствительности проводили с использованием десятикратных разведений положительных контрольных образцов для каждого из вирусов. Определение концентрации ДНК осуществляли при помощи коммерческого набора Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) в флуориметре QUBIT (Invitrogen, США). Специфическую активность оценивали проведением ПЦР с комплементарной ДНК (кДНК) вирусов Марбург (штамм Popr), Эбола-Заир (штамм Meyanga), Эбола-Судан (штамм Bonifacie).

### Результаты и обсуждение

Праймеры как для вируса Марбург, так и для вируса Эбола были рассчитаны на участок L-гена длиной 307 п.н. Для вируса Ласса участок-мишень генома длиной 189 п.н. соответствовал фрагменту вирусной РНК L-сегмента генома. Зонды содержали на 5'-конце флуорофор, а на 3'-конце гаситель флуоресценции. Структуры праймеров и зондов и используемые для мечения зондов флуорофоры и гасители флуоресценции приведены в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров и зондов

Вирус	Праймеры и зонды	Последовательность нуклеотидов
Марбург	F 13060	5'-TGGGACAGYGTTTYGATAG-3'
	R 13367	5'-ACAACCATCATRTRCTAGGGAATGCT-3'
	Z 13288	R6G-GTGT CAGAAATGTCCAAACTYGCAGAAGC-BHQ1
Эбола	F 13060	5'-TGGGATGCAGTHTTYGARCC-3'
	R 13367	5'-ACAACCATCATRRTTGCTTGGAAAGGCTT-3' 5'-ACTACCATCATATTGCTAGGAAATGCTT-3'
	Z 13201	FAM-TACTRCCACAATATCGRAACTTTTCTTYTCATTGAA-BHQ1
Ласса	F 1727	5'-GAGACAAGAGACAARGCTTCACAGT-3'
	R 1916	5'-TGGAGGATAGGGTTGGTTTGAAT-3'
	Z 1798	ROX-CACTTCATTTGGTTGACGCTAGATCGCTC-BHQ1

Аналитическая чувствительность мультиплексной ПЦР

Разведения ПКО	ПКО/Марбург		ПКО/Эбола		ПКО/Ласса	
	Кол-во копий*	Сt**	Кол-во копий*	Сt**	Кол-во копий*	Сt**
0	~10 <sup>7</sup>	18,3	~10 <sup>9</sup>	13,0	~10 <sup>7</sup>	19,9
-1	~10 <sup>6</sup>	22,0	~10 <sup>8</sup>	16,6	~10 <sup>6</sup>	22,7
-2	~10 <sup>5</sup>	25,8	~10 <sup>7</sup>	20,4	~10 <sup>5</sup>	27,7
-3	~10 <sup>4</sup>	28,8	~10 <sup>6</sup>	24,1	~10 <sup>4</sup>	31,8
-4	~10 <sup>3</sup>	34,0	~10 <sup>5</sup>	28,5	<b>2×10<sup>3</sup></b>	<b>35,0</b>
-5	<b>5×10<sup>2</sup></b>	<b>36,9</b>	~10 <sup>4</sup>	33,2	~10 <sup>2</sup>	-
-6	~10	-	<b>1×10<sup>3</sup></b>	<b>39,8</b>	~10	-
-7	<10	-	~10 <sup>2</sup>	-	<10	-

\* Кол-во копий ДНК-матриц, выраженное в геномных эквивалентах (ГЭ).

\*\* Сt – число циклов, после которых сигнал флуоресценции в положительном образце превышает уровень фона.

Оптимальную температуру отжига праймеров определяли постановкой ПЦР в реальном времени с десятикратными разведениями положительных контрольных образцов в приборе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) с градиентом температур отжига: 50, 53, 55, 59, 62 и 65 °С. Как моноварианты постановки ПЦР, так и постановка ПЦР в мультиплексном формате, показали наибольшую чувствительность определения ДНК-мишени в реакционной смеси при температуре отжига праймеров 55 °С. В дальнейшей работе применяли оптимизированный температурно-временной протокол проведения реакции амплификации, состоящий из денатурации при 95 °С в течение 5 мин и 45 циклов, каждый из которых включает денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 10 с, отжиг праймеров при температуре 55 °С в течение 25 с, синтез комплементарной цепи при температуре 72 °С в течение 25 с. Детекцию продуктов амплификации проводили на каналах Green (для вирусов Эбола), Yellow (для вируса Марбург) и Orange (для вируса Ласса) при температуре 55 °С.

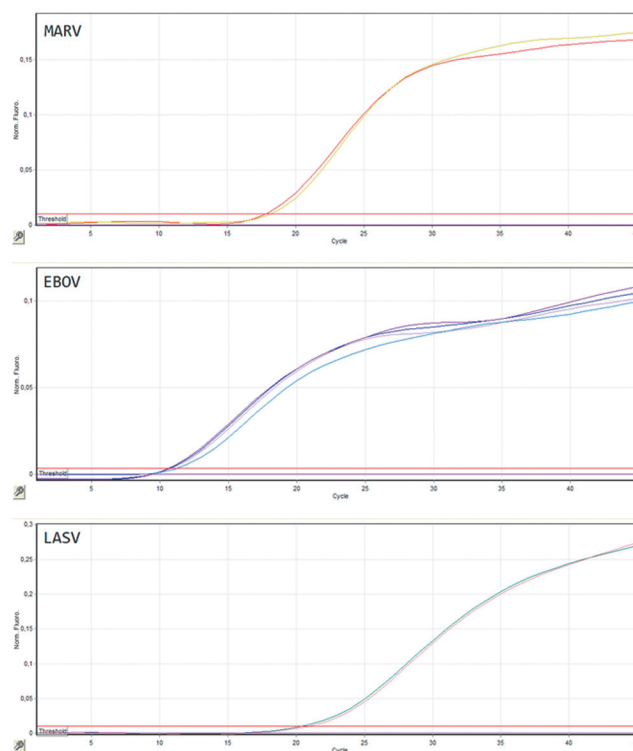
Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 10×Taq буфер без Mg<sup>2+</sup> (ООО «Лаборатория Медиген», Россия) – конечная концентрация 1×; 100 mM раствор MgCl<sub>2</sub> – конечная концентрация 3,3 mM; 5 mM раствор dNTP – конечная концентрация каждого 0,2 mM; смесь праймеров – конечная концентрация каждого 0,1–0,15 μM; смесь зондов – конечная концентрация каждого 0,1 μM; SmartTaq ДНК-полимераза – конечная концентрация 1,5 е.а./мкл; вода для ПЦР.

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР для идентификации вирусов Марбург, Эбола и Ласса, которую определяли с использованием десятикратных разведений положительных контрольных образцов, представлены в табл. 2.

Специфическую активность оценивали постановкой ПЦР в реальном времени с кДНК вирусов Марбург (штамм Popp), Эбола-Заир (штамм Mayinga), Эбола-Судан (штамм Boniface), вируса кори (изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2), ДНК человека, ДНК обезьян (капуцинов и саймири). При этом об-

разцы, содержащие кДНК вируса Марбург и вирусов Эбола, детектировались на каналах Yellow и Green соответственно (рисунок). Перекрестных неспецифических реакций между этими близкородственными вирусами не выявлено. В отношении ДНК человека, ДНК обезьян и кДНК вируса кори также не выявлено неспецифических реакций. Флуоресценция в этих образцах не превышала уровень фона на трех каналах детекции.

Таким образом, на основе разработанной методики идентификации вирусов Марбург, Эбола и



Кривые флуоресценции на трех оптических каналах амплификатора Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия):

Флуоресценция в образцах, содержащих генетический материал: вируса Марбург (MARV) – 2 образца на канале Yellow, вирусов Эбола (EBOV) – 4 образца на канале Green, ПКО вируса Ласса (LASV) – 2 образца на канале Orange

Ласса в дальнейшем возможно создание диагностической тест-системы, позволяющей провести дифференциально-диагностические мероприятия в первые часы поступления образцов клинического материала или объектов окружающей среды, что делает возможным установление этиологии заболевания до получения данных вирусологических исследований. Использование количественно охарактеризованных образцов при постановке ПЦР в реальном времени позволяет определять уровень вирусной нагрузки в различных типах клинического материала, что может быть полезным как в клинической практике для оценки динамики заболевания и эффективности проводимого лечения, так и в исследовательской работе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бундибугио, Уганда: эпидемия лихорадки Эбола закончилась. [Сайт] Врачи без границ; 16.01.2008 [дата обращения 27.04.2011] URL: <http://www.ru.msf.org/russia/article.cfm?article=8D1A6C4F-15C5-F00A-2535-B75C1B8943A1>
2. Лихорадка Марбург добралась до столицы Анголы. [Сайт] МедНовости; 28.03.05 [дата обращения 20.03.2008]. URL: <http://medportal.ru/mednovosti/news/2005/03/28/angola/>
3. Соколов В.Б. Систематика млекопитающих. М.: Высшая школа; 1973. Т. 1. 430 с.
4. Haas W.H., Breuer T., Pfaff G., Schmitz H., Köhler P., Asper M. et al. Imported Lassa fever in Germany: surveillance and

management of contact persons. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 36:1254–8.

5. Kitching A., Addiman S., Cathcart S., Bishop L., Krahé D., Nicholas M. et al. A fatal case of Lassa fever in London, January 2009. *Eurosurveillance*. 2009; 14(6). pii: 19117

6. Ligon B.L. Outbreak of Marburg hemorrhagic fever in Angola: a review of the history of the disease and its biological aspects. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 2005; 16(3):219–24.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. [Bundibugio, Uganda: Ebola fever epidemic is over]. Web-site of the International Medical Humanitarian Organization "Doctors without Borders"/"MSF"; 16 Jan 2008 [cited 27 Apr 2011]. Available from: <http://www.ru.msf.org/russia/article.cfm?article=8D1A6C4F-15C5-F00A-2535-B75C1B8943A1>

2. [Marburg Fever got to the capital of Angola]. Medical news web-site; 28 Mar 2005 [cited 20 Mar 2008]. Available from: <http://medportal.ru/mednovosti/news/2005/03/28/angola/>

3. Sokolov V.B. [Taxonomy of Mammals]. M.: Vys. Shkola; 1973. Vol. 1. 430 p.

#### Authors:

Sementsova A.O., Shikov A.N., Ternovoy V.A., Vinokurova A.V., Kostina N.E., Stavsky E.A., Agafonov A.P. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.

#### Об авторах:

Семенцова А.О., Шиков А.Н., Терновой В.А., Винокурова А.В., Костина Н.Е., Ставский Е.А., Агафонов А.П. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово.

Поступила 28.04.11.