

УДК: 578.835.1Enterovirus-07

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ

Амяга Е.Н.

ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора

*Данная обзорная статья посвящена рассмотрению теоретических основ, методических принципов, актуальности и возможностей применения в практической вирусологии современных молекулярно-генетических методов для детекции и идентификации энтеровирусов.*

*В настоящее время используются подходы, которые позволяют определить молекулярную структуру вирусных частиц, способы их проникновения в клетку и особенности репродукции вируса, а также проанализировать первичную структуру белков и нуклеиновых кислот вируса. К ним относятся полимеразная цепная реакция (ПЦР) и анализ нуклеотидных последовательностей генома, кодирующих белки (секвенирование). Эти методы позволяют выявить в исследуемом материале даже мельчайшие частицы нуклеиновых кислот вирусов, установить причины внутриклеточных процессов, что особенно значимо при диагностике того или иного заболевания.*

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование

## Modern methods of detection and identification of enteroviruses.

Amyaga E.N.

*<sup>1</sup>Khabarovsk research institute of epidemiology and microbiology of Federal service for surveillance on customer rights protection and human wellbeing (Rosпотребнадзор).*

*Present review paper is dedicated to theoretical basics, methodological principles, significance and applicability of modern molecular-genetic methods of detection and identification of enteroviruses in practical virology.*

*Modern approaches allow to identify molecular structure of viral particles, ways of cell penetration and peculiarities of viral reproduction as well as analysis of primary structure of viral protein and viral nucleic acids. Among these approaches are polymerase chain reaction (PCR) and analysis of genome nucleic acid sequences that code proteins (sequencing). These methods allow to identify in the sampling material ultimate particles of viral nucleic acids, help to determine the cause of intracellular processes what is particularly significant in differential diagnosis.*

**Key words:** polymerase chain reaction (PCR), sequencing.

Прогресс в области молекулярной биологии в последние десятилетия сопровождался возникновением новых методов исследования, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) и установлении нуклеотидной последовательности в молекуле ДНК. Эти методы очень скоро нашли применение в лабораторной диагностике различных заболеваний, в том числе энтеровирусных инфекций. В результате сформировалась новая ветвь клинической лабораторной диагностики – молекулярная клиническая диагностика – наука, осуществляющая диагностику болезней на молекулярном уровне и основанная на выявлении специфических генов и продуктов их деятельности – белков [3].

На протяжении последних нескольких лет типирование энтеровирусов проводится методом определения нуклеотидной последовательности РНК для определенного белка капсида, преимущественно VP 1. Эта методика была основана на работах Оберста [12,13,14], которые доказали возможность определения серотипа по нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты. Этот метод более информативен, позволяет идентифицировать штаммы, которые не типировались, либо были признаны сомнительными при типировании классическим методом.

При проведении молекулярного типирования выделяют два этапа: первый – метод ПЦР (полимеразная цепная реакция), второй – анализ нуклеотидных последовательностей (секвенирование).

**Метод ПЦР** - это молекулярно - биологический метод, благодаря которому возможно добиться значительного количества малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале (пробе) [8]. ПЦР в 1983 году разработал Кэри Мюллис (США), за что в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии [2]. Метод представляет собой ферментативную обработку *in vitro* определенных, сравнительно коротких (от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов), двухцепочечных фрагментов ДНК. ПЦР опирается на механизм, основанный на внутриклеточном удвоении (репликации) молекул ДНК ферментом ДНК – полимеразой. В свою очередь, в процессе репликации участвуют: исходная молекула ДНК (матрица), фермент-ДНК-зависимая-ДНК- полимеразы, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты и одноцепочечные ДНК – затравки (праймеры), комплементарные матричной ДНК. Все перечисленные компоненты вступают в реакцию в солевом растворе (буфере): ДНК – полимеразы синтезируют ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, подставляя их по принципу комплементарности к матричной молекуле ДНК, начиная от ДНК – затравки [4,8,9,3].

Классическая ПЦР состоит из повторяющихся температурных циклов, которые, в свою очередь, состоят из трех температурных режимов:

1) разрушение водородных связей между цепями ДНК (93 – 96 градусов С); 2) гибридизация праймеров на ДНК (40 – 75 градусов); 3) синтез комплементарных цепей ДНК путем удлинения праймеров (60 – 75 градусов). В результате повторения циклов ПЦР, увеличение количества, ограниченного праймерами фрагмента ДНК, идет в геометрической прогрессии, поскольку ранее синтезированные фрагменты на каждом цикле реакции выступают в качестве матриц для синтеза новых фрагментов. Как правило, для получения достаточного для детекции количества ДНК необходимо от 20 до 50 циклов ПЦР [8,19].

Существует четыре метода детекции продуктов амплификации ПЦР, применяемых в диагностических лабораториях: гель-электрофорез, гибридизационно-ферментный анализ (ГиФА), флуоресцентная детекция после проведения реакций (FLASH) и флуоресцентная детекция во время проведения реакций (Real-Time PCR). Преимущество отдается Real-Time PCR, поскольку этот способ позволяет избежать проблему контаминации ампликонами. Кроме того, существенно сокращается время проведения анализа (6–8 часов) [2,1,5].

Важно отметить, что вероятность детекции вируса в нестерильных биологических средах (отделяемое носоглотки, кал) ниже, чем в стерильном материале. Это необходимо учитывать при отрицательном анализе у пациента с клиническими признаками Enterovirus-ассоциированной инфекции. Ложноотрицательная реакция может быть связана с полной элиминацией вируса из клеток ЖКТ к моменту развития симптомов заболевания (период репликации вируса в эпителии глотки составляет от 2 дней до 2 недель, в эпителии кишки – до 3 месяцев) [19].

ПЦР применима для выявления вирусов (в частности энтеровирусов) на раннем этапе болезни, что отличает её от серологических методов, требующих около 2 – 4 недель для оценки динамики уровня выявляемых специфических антител [8].

**Метод секвенирования.** Секвенирование белков и нуклеиновых кислот – это определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность) [20].

С развитием молекулярной биологии к концу 70-х г.г. у исследователей возникла проблема установления последовательности нуклеотидов в цепи ДНК. В конце 60-х годов Эрдман и Бегг смогли определить аминокислотную последовательность в белках (секвенирование белков) в автоматическом режиме. Метод заключался в последующем отщеплении по одной аминокислоте от конца искомой белковой цепи с последующей идентификацией полученных простых продуктов. Но секвенировать ДНК подобным образом не представлялось возможным, так как требовалось определить не менее 1-3 тыс нуклеотидов в гене, а в геноме – миллионы и миллиарды нуклеотидов.

Сначала применяли метод ферментативного секвенирования ДНК, который в 1975 году предложили Ф.Сэнгер и Д. Коулсон [15]. Матрицей являлся одноцепочечный фрагмент ДНК, праймерами – синтетические олигонуклеотиды, ферментом - фрагмент Кленова ДНК полимеразы I (Poll) из *E.coli*. Метод состоял из двух этапов: 1) ставили ПЦР с 4-мя типами dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), в результате чего получали набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента; 2) полученную смесь очищали от несвязавшихся дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и разделяли на 8 частей. Затем проводили 4 реакции сначала в присутствии каждого из четырех типов нуклеотидов (в «плюс» системе), а затем в их отсутствии («минус» система). Методом электрофореза определяли последовательность искомой ДНК. Таким образом, была секвенирована короткая ДНК фага ФХ174, состоящая из 5386 нуклеотидных пар (рис.1) [15].

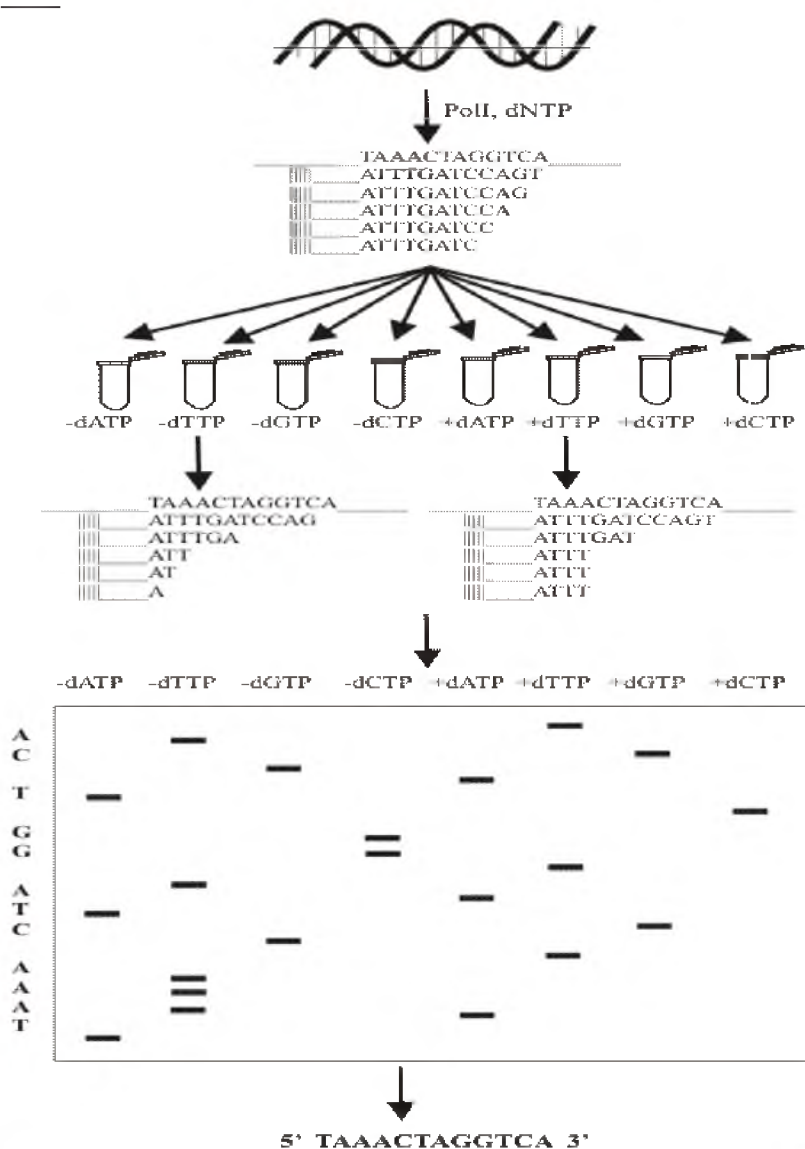


Рис.1 Секвенирование по Сэнгеру «плюс – минус» метод [15].

На смену «плюс-минус» методу пришел метод терминирующих аналогов трифосфатов, который разработан в 1977 г. Этот способ усовершенствован и применяется по настоящее время. Он также основан на ферментативном копировании с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E.coli*, а праймерами служат синтетические олигонуклеотиды. Для того, чтобы определить первичную структуру искомого фрагмента ДНК, необходимо провести 4 реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. В процессе электрофореза по расположению полос в полиакриламидном геле определяется последовательность нуклеотидов (рис.2) [16].

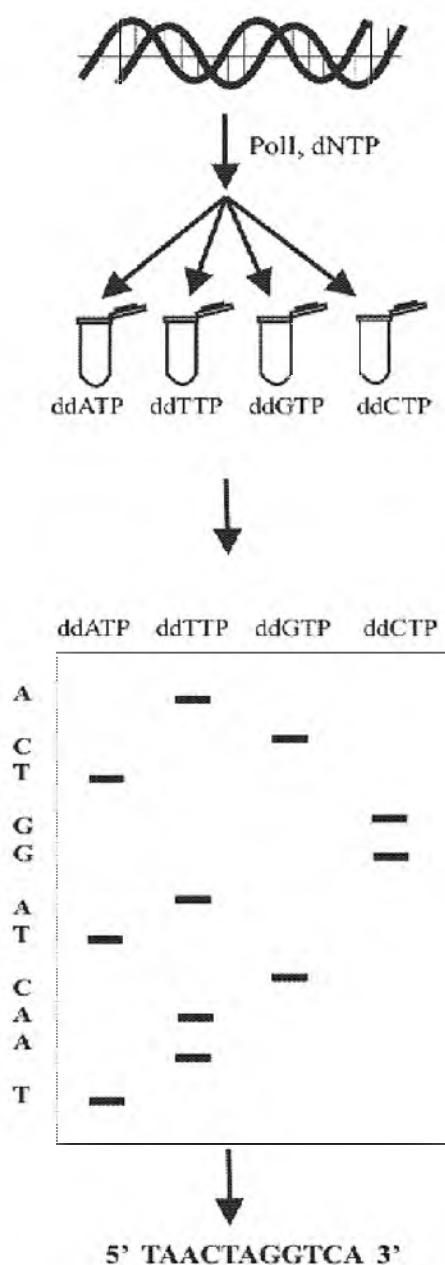


Рис.2 Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов» [16].

В 1977 году А. Максам и Л. Гилберт нашли химическую реакцию, расщепляющую молекулу ДНК в месте расположения одного определенного нуклеотида – метод химической дегградации. Препарат, содержащий меченую ДНК, делили на четыре алиquotы, затем каждую из них обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. В результате происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых - по азоту в положении 7. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента [15,16].

В лабораториях, оснащенных современным оборудованием, используют автоматическое секвенирование, в основе которого лежит упоминавшийся выше метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP. Аналогично варианту Сэнгера, автоматическое секвенирование состоит из двух этапов: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза. Автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченых фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий подсчет собранных данных. По сути, автоматическое секвенирование отличается от ручного секвенирования только типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченые терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченые терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченый праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов секвенсионной реакции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции на одной дорожке [15,6,20].

Таким образом, в результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов [12,13].

**Пирофосфатная технология секвенирования** нового поколения (**пиросеквенирование**), позволяет с высокой производительностью и точностью осуществлять прочтение нуклеотидной последовательности, проводить идентификацию вирусов, может с успехом применяться при расшифровке абсолютно неизвестных последовательностей ДНК и скрининге клинически значимых полиморфизмов и мутаций [10]. Существенной особенностью современной технологии пиросеквенирования является использование эмульсионной ПЦР для одновременной параллельной подготовки сотен тысяч препаратов ДНК, наличие специальных проточных камер с сотней тысяч микролунок, заполняемых шариками с образцами анализируемой ДНК и микрошариками с иммобилизованными ферментами, применение высокочувствительной цифровой фотокамеры и специализированного программного обеспечения [10].

**Выводы:** Помимо высокой чувствительности и быстрой диагностики, главным преимуществом молекулярных методов исследования является определение некультивируемых агентов. ДНК амплификация позволяет идентифицировать патогенный микроорганизм в низкой концентрации и в малом объеме пробы. Имеется возможность диагностики и идентификации возбудителей инфекций в латентной фазе развития. Данные методы позволяют проводить различия патогенных микроорганизмов со схожими антигенными структурами. Единственным недостатком является высокая стоимость оборудования и реактивов [21].

#### Литература:

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в трех томах. - Москва: Мир, 1994.- Т. 1. – 517с.
2. Бобкова М.Р. ПЦР в диагностике и лечении ВИЧ-инфекции / Пособие для врачей-лаборантов. - М.,1999. – 51с.
3. Бородин Е.А. ИФА и ПЦР – современные методы клинической лабораторной диагностики //Лабораторная диагностика. – 2012. - № 22. - С.16-22.
4. Зайцева Н.Н., Ефимов Е.И., Носов Н.Н., Парфенова О.И., Пекшева О.Ю. Современные молекулярно-генетические методы исследования в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией (аналитический обзор) / МедиАль, 2014. – № 2. - С.11 – 14.
5. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. - Москва: Высшая школа, 2000. — 479с.
6. Мейхи Б.Вирусология. Методы, пер. с англ. - М., 1988. – 48с.
7. Прилуцкий А.С., Бабенко С.В., Колесникова А.Г., Чернуцкий С.О. Разработка и применение современных лабораторных методов в эпидемиологическом мониторинге, диагностике и лечении энтеровирусных инфекций // Таврический медико-биологический вестник. — 2009. — Т. 12, № 3. — С.63-68.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени» / М.: БИ-НОМ. Лаборатория знаний, 2009. – С.19-21.
9. Херсонская А.М. Оснащение современной лаборатории / Справочник заведующего КДЛ. - 2007. - № 11. – С.32 – 38.
10. Янбухтина Э.Р., Сухарева Е.Ю., Тазетдинов А.М. Современные молекулярные технологии лабораторной диагностики //Лабораторная диагностика. - 2014. - № 4(1). - С.64-65.
11. Melnick, J. L., Rennick, V., Hampi, B., and al., e. Lyophilized compination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for identification of of field strains of 42 enteroviruses / Bulletin of World Health Organization. – 1973. - № 48. - P.263-268.
12. Norder, H., Bjerregaard, L., and Magnius, L. O. Homotypic enteroviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing //Journal of Medical Virology. – 2001. - № 63. - P.155-160.

13. Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., and Pallanch, M. A. Molecular evolution of the Human Enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification // Journal of Virology. – 1999. - № 73. - P.178-180.
14. Oberste, M. S., Maher, K., and Pallanch, M. A. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. // Virus Research. – 1998. - № 58. - P.132-136.
15. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. – 1975. - P. 444-448.
16. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. - P.43 - 45.
17. <http://meduniver.com>
18. <http://www.infectology.ru>
19. <http://www.helix.ru>
20. <http://molbiol.ru>
21. <http://aquavitro.org>
22. <http://medlec.org>

***Сведения об авторах***

*Амяга Елена Николаевна – младший научный сотрудник Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению энтеровирусных инфекций. E-mail: adm@hniiet.ru*