

# МИКРОБИОЛОГИЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

УДК: 616.2:578.834.1Coronavirus:54-41]-07

## РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КОРОНАВИРУСА, ВЫЗЫВАЮЩЕГО БЛИЖНЕВОСТОЧНЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ

А.Н. Болдырев, С.А. Боднев, С.Н. Соколов, Т.П. Микрюкова,  
В.В. Солодкий, В.А. Терновой, Ю.В. Туманов,  
О.В. Пьянков, А.П. Агафонов

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

*На основе предложенных Немецким центром по изучению инфекций праймеров и зонда на ген 1b коронавируса ближневосточного респираторного синдрома разработан набор реагентов для его обнаружения. В наборе основные компоненты только отечественного производства. ПЦР проводили по ускоренной программе и ампликон детектировали по конечной точке и в УФ-свете.*

**Ключевые слова:** коронавирус, ближневосточный респираторный синдром, ПЦР, флуоресценция по конечной точке

### **DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION KIT FOR DETECTION OF CORONAVIRUS CAUSING MIDDLE EASTERN RESPIRATORY SYNDROME**

A.N. Boldyrev, S.A. Bodnev, S.N. Sokolov, T.P. Mikryukova, V.V. Solodky, V.A. Ternovoi,  
Yu.V. Tumanov, O.V. Pyankov, A.P. Agafonov

**State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Novosibirsk region, Koltsovo**

*A kit comprising the key components solely of Russian manufacturers and vendors for PCR and detection of Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus 1b gene was developed on the basis of the primers and a probe suggested by German Center for the Study of Infections (Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, DZIF, Germany). The detection of a virus-specific amplicon was performed by measuring the fluorescence as the endpoint and the ultraviolet light after the gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide. The reaction was conducted in an accelerated program in 15 (10) µl volume. This approach does not require expensive equipment and Taq DNA polymerase such as Platinum-Taq DNA polymerase.*

**Key words:** coronavirus, Middle Eastern respiratory syndrome, polymerase chain reaction, fluorescence by end point

По данным ВОЗ на 15 мая (24 апреля) 2014 г. зарегистрировано 572 (254) лабораторно подтверждённых случая заболевания людей БВРС, возбудителем которого является вирус БВРС, включая 173 (93) смертельных случая [4,5]. Цифры по заболеваемости и смертности возросли почти вдвое всего лишь за 20 дней.

Несмотря на недавнее обнаружение нового коронавируса (сентябрь 2012 г.), получившего название вирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) [3], на рынке уже появились ПЦР-наборы реагентов за рубежом [2] и набор, выпускаемый ЦНИИЭ (Москва, Россия), для его тестирования. Наборы, предложенные ВОЗ, позволяют своевременно и быстро обнаруживать возбудителя. Но они ориентированы на проведение ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Стремление исследователей проводить диагностику на высокоточном оборудовании понятно, поскольку исключает контаминацию анализируемых образцов друг другом и обеспечивает полу-

чение результатов в кратчайшие сроки. При возникновении чрезвычайных ситуаций (ЧС) требуется использование недорогих компактных наборов, реагенты которых помещались бы в упаковке малого формата, сохраняли бы свою работоспособность при транспортировке в обычных климатических условиях и выполнении необходимых операций в ходе их использования при отсутствии перекрёстной контаминации, и не требовали при работе с ними дорогостоящего и габаритного оборудования для идентификации искомого патогена.

**Цель работы** – разработка для обнаружения вируса БВРС ПЦР-набора, который позволил бы измерять флуоресценцию полученных ампликонов по конечной точке и мог бы найти применение при работе в условиях различных чрезвычайных ситуациях: проведение диверсии на мероприятиях при большом скоплении людей и, в частности, биотеррористический акт; первичное выявление вируса у лиц, прибывших из стран с высоким риском заражения (Саудовская Аравия и др.), у работников системы здравоохранения и других групп риска (работников посольств и т.п.).

### Материалы и методы

Доктором Haagmans B.L., PhD (Erasmus MC, Rotterdam, the Netherlands) был любезно предоставлен в наше распоряжение вирус ближневосточного респираторного синдрома, который для увеличения титра вируса культивировали на культуре клеток почек зелёной мартышки линии Vero-E6. По 100 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости отбирали из культурального флакона в различные дни культивирования и вносили в 300 мкл лизирующего раствора (набор «РНК-Сорб», ЦНИИЭ) в под-готовленную микроцентрифужную круглодонную пробирку объёмом 2 мл. После проведения дезинфекции внешней поверхности закрытой пробирки орошением 70 %-м водным этанолом передавали на выделение суммарной РНК, которое проводили с использованием того же набора согласно инструкции. Препарат суммарной РНК вносили в реакционную смесь для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) (набор «Реверта-Л», ЦНИИЭ). Полученную смесь кДНК-фрагментов использовали в качестве матрицы для постановки ПЦР. ПЦР с праймерами и зондом («Синтол», Москва, Россия) ставили в двух форматах: немеченный (без внесения зонда в реакционную смесь) и меченный (с зондом) в 15 (10) мкл в амплификаторе «БИС-111» («БИС-Н», Новосибирск, Кольцово, Россия). Детекцию ПЦР-продуктов (ампликонов) проводили, измеряя флуоресценцию по конечной точке в флуоресцентном детекторе «Джин» («ДНК-технология», Москва, Россия), и затем выявляя их в УФ-свете после проведения электрофореза (ЭФ) в агарозном геле (меченый вариант), в случае немеченного варианта – только после ЭФ. Результаты документировали, используя программу «Джин» («ДНК-технология») и систему для документирования и анализа гелей. ЭФ проводили в 2 %-м агарозном геле в 1× ТАЕ-буфере в присутствии бромистого этидия при 80 мА в течение 50 мин. В качестве маркёров использовали смесь ампликонов с шагом длины в 50 п.н., начиная с 50 п.н. («Медиген», Новосибирск, Россия). Для конструирования рекомбинантной плазмиды, несущей нуклеотидную последовательность гена 1b использовали набор TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), а для секвенирования клонированной последовательности – набор для секвенирования BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

### Результаты и обсуждение

При возникновении ЧС требуется, как правило, выявление искомого патогена, которое следует проводить в двух-трех повторях в расчёте на один образец. Что касается выявления патогена, такого как вирус БВРС, то инфицирование им лиц в отдельных странах регистрируется в настоящее время как единичные случаи, которые известны из научной литературы [1]. Такие случаи выявлены в Европе, Африке, Азии и совсем недавно в Америке [5]. Эти факты навели на мысль, что для первичного скрининга лиц, инфицированных коронавирусом БВРС, дорогостоящие наборы и оборудование не требуются. Кроме того, следует учитывать, что ПЦР-наборы требуют периодического обновления из-за присутствия в нём фермента, со временем снижающего свою активность, а после их закупки в отсутствие заболевших и вовсе могут оказаться не востребованными в течение гарантийного срока.

В ходе исследования нами были подобраны условия для проведения ПЦР, которая может быть использована при ЧС для обнаружения коронавируса БВРС. Условия её проведения существенно отличаются от тех условий, которые предложены Немецким центром. В нашем наборе используется Hot Start Taq-ДНК-полимераза («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), которая функционирует в присутствии низкой концентрации соли, что требует пониженной температуры для отжига праймеров. Активация её осуществляется при температуре выше 70° С, что позволяет избежать образования димеров. Эта полимераза вместе с обратной транскриптазой из набора «Реверта-Л» оказалась способной заменить Platinum Taq-ДНК-полимеразу из набора SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), используемого для выявления БВРС в режиме реального времени. Поскольку в ходе ПЦР образуется ампликон длиной 82 п.н., было сокращено время, отведённое в цикле на стадию денатурации ампликона с 15 с до 1 с и 10 с на стадию отжига (набор пр-ва Invitrogen – 30 с). Учитывая длину ампликона, мы отказались от включения в темпера-

турно-временной профиль стадии синтеза. Т.о., программа ПЦР выглядит как: 1× [94 °С, 10 с], 35–40× [96 °С, 1 с, 49 °С, 10 с], 1× [72 °С, 30 с]. Время проведения ПЦР – ~ 70 мин.

### **Заключение**

В итоге разработан набор, который включал четыре реагента. Первый содержал праймеры, 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфата, полимеразный буфер («СибЭнзим») и воду (для проведения ПЦР, ГНЦ ВБ «Вектор»); второй – 50 мМ хлорид магния («СибЭнзим»), третий – зонд, 4-й – Hot Start-Taq-ДНК-полимеразу. В набор также входят положительный контрольный образец (ПКО) – плазмидная ДНК, несущая искомую вирусспецифичную нуклеотидную последовательность; отрицательный контрольный образец (ОКО) – вода для проведения ПЦР и стандартный образец предприятия (СОП) – ДНК человека, выделенная из крови здоровых доноров. Последний используется только при выявлении вируса, полученного от человека. Введение такой ДНК в отдельную пробу обусловлено тем, чтобы показать, что праймеры не образуют вирусспецифичный ампликон в присутствии ДНК здорового человека. В ближайшее время предполагается использование набора для тестирования панели, включающей контрольные образцы коронавируса БВРС.

### **Литература**

1. Guery B. et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission // Lancet. – 2013. – V. 381. – № 9885. – P. 2265–2272.
2. Lu X. et al. Real-time reverse transcription-PCR assay panel for Middle East respiratory syndrome coronavirus // J. Clin. Microbiol. – 2014. – V. 52. – № 1. – P. 67–75.
3. ProMED-mail. Novel coronavirus – Saudi Arabia: human isolate. Archive Number: 20120920.1302733. (<http://www.promedmail.org/>).
4. ProMED-mail. [6] Who risk assessment – Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) Archive Number: 20140424.2424017 (<http://www.promedmail.org/>).
5. ProMED-mail. [2] Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update Archive Number: 20140515.2474996 (<http://www.promedmail.org/>).

### **Ответственный автор:**

*Болдырев Александр Николаевич – старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru*