УДК 616.9:578:57.088 https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-208-215 ШИФР СПЕЦИАЛЬНОСТЬ 14.03.10 Клиническая лабор

0 Клиническая лабораторная диагностика



Определение вирусных нуклеиновых кислот в крови человека

М. А. Абдурашитов, Н. А. Нетесова*

Федеральное бюджетное учреждение науки

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,

р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

Многие острые вирусные инфекции вызывают сходную клиническую симптоматику, поэтому установление этиологии вирусного заболевания требует применения целых комплексов серологических или ПЦР-тестов, предназначенных для выявления отдельного вида патогена. Современные методы молекулярной биологии позволяют проводить раннюю диагностику вирусных заболеваний в тот период, пока серологические методы диагностики еще не эффективны. Цель работы состояла в проведении анализа методов молекулярной диагностики, позволяющих определять вирусные нуклеиновые кислоты в крови человека. В статье представлена классификация молекулярных методов диагностики вирусных частиц в клинических образцах. Подробно рассмотрены такие методы, как гибридизация *in situ*, реакция обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), двухраундовая ПЦР, мультиплексная ПЦР, а также технология ДНК-микрочипов, метод массового параллельного секвенирования. Особое внимание уделено NGS-технологиям, которые стали использоваться в вирусологии практически сразу же после их появления и позволили обнаружить целый ряд новых видов вирусов человека (включая представителей анелловирусов, пикорнавирусов, полиомавирусов и др.). Обсуждаются достоинства, проблемы, связанные с применением этих методов в клинической практике, а также перспективы их усовершенствования.

Ключевые слова: амплификация; вирусные инфекции; массовое параллельное секвенирование; молекулярная диагностика; полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Абдурашитов МА, Нетесова НА. Определение вирусных нуклеиновых кислот в крови человека. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(4):208–215. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-208-215

*Контактное лицо: Heтесова Нина Александровна; ninanet@vector.nsc.ru

Determination of Viral Nucleic Acid in the Human Blood

M. A. Abdurashitov, N. A. Netesova*

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russian Federation

Many acute viral infections cause similar clinical symptoms, therefore, establishing the etiology of a viral disease requires the use of whole complexes of serological or PCR tests designed to detect a particular type of pathogen. Modern methods of molecular biology allow early diagnosis of viral diseases at a time when serological diagnostic methods are not yet effective. The aim of the work was to analyze molecular diagnostic methods that allow the determination of viral nucleic acids in human blood. The article presents the classification of molecular methods for the diagnosis of viral particles in clinical specimens. Methods such as *in situ* hybridization, reverse transcription reaction (RT-PCR), nested PCR, multiplex PCR, as well as DNA microarray technology, and the method of massive parallel sequencing are considered in detail. Particular attention is paid to NGS-technologies that were used in virology almost immediately after their appearance and allowed for detection of a number of new types of human viruses (including representatives of anelloviruses, picornaviruses, polyomaviruses, etc.). The advantages and problems associated with the application of these methods in clinical practice, as well as the prospects for their improvement are discussed.

Key words: amplification; viral infections; massive parallel sequencing; molecular diagnostics; polymerase chain reaction

For citation: Abdurashitov MA, Netesova NA. Determination of viral nucleic acid in the human blood. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(4):208–215. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-208-215

*Corresponding author: Nina A. Netesova; ninanet@vector.nsc.ru

Вирусные заболевания представляют собой одну из наиболее распространенных и серьезных угроз здоровью людей. Быстрая и точная диагностика таких заболеваний облегчает выбор наиболее подходящего курса лечения и может способствовать предотвращению массовых эпидемий. Успешность диагностирования вирусной инфекции в крови человека зависит от многих факторов: способности вируса проникать и размножаться в кровотоке, наличия специфических антител к нему, а также от общего состояния иммунной системы. В случае первичного контакта с возбудителем, в первые дни после проникновения в кровеносную систему, наблюдается стремительное увеличение количества вирусных частиц. Именно в данный период применение методов молекулярной диагностики обеспечит максимальную эффективность установления вида патогена. С течением времени иммунная система начинает вырабатывать специфические антитела, что постепенно ведет к исчезновению вирионов. На этом этапе точно поставить диагноз позволяют серологические методы.

Целью настоящей работы является анализ современных методов молекулярной диагностики, позволяющих проводить раннюю диагностику вирусных заболеваний путем выявления чужеродных нуклеиновых кислот в образцах крови пациентов.

Молекулярная диагностика

В настоящее время молекулярная диагностика широко применяется для определения наличия вирусных частиц в клинических образцах. Методы молекулярной диагностики позволяют обнаружить вирусы во время острой фазы заболевания, на сроках, когда серологические методы, включая ИФА, неэффективны.

Молекулярные методы диагностики подразделяются на различные группы: методы с использованием зондов без амплификации нуклеиновых кислот (жидкофазные, твердофазные и гибридизация in situ (ISH)) [1], амплификация с использованием нуклеиновых кислот (полимеразная цепная реакция, ПЦР) [2–5], ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР) [6, 7], мультиплексная ПЦР [8], двухраундовая ПЦР [9], ПЦР с обратной транскрипцией, изотермическая амплификация ДНК, опосредованная петлей (loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP), и микрочипы [10].

Методы с использованием зондов без амплификации нуклеиновых кислот

Методы, основанные на использовании зондов, требуют присутствия не менее 10⁶ определяемых молекул в анализируемом образце. Таким образом, эти методы применимы для быстрого и специфического обнаружения вирусов лишь при условии их достаточного количества в образцах крови [11].

Отдельно стоит рассмотреть гибридизацию *in situ* (ISH), когда используются радиоактивно меченые зонды для обнаружения вирусных последовательностей-мишеней ДНК или РНК в интактных клетках или тканях. На сегодняшний день широкое применение находит новое поколение методов ISH, в котором используют нерадиоактивный дигоксигенин — гаптен, позволяющий проводить анализ с большим разрешением. ISH является быстрым методом определения внутриклеточной локализации вирусов, например, гепатита. Стабильность связывания целевых последовательностей нуклеиновых кислот и зондов зависит от температуры и концентрации солей, от GC-состава и длины зонда.

Во флуоресцентной ISH (FISH) для обнаружения вирусов используют пептид-нуклеиновую кислоту. FISH является точным и высокочувствительным методом выявления геномной ДНК и РНК в гомогенизированных тканях. Основным недостатком этого метода является низкая доступность к целевой последовательности нуклеиновой кислоты в клетках из-за твердофазной гибридизации [12].

Методы с амплификацией нуклеиновых кислот

С открытием ПЦР началась эра точных и быстрых методов в молекулярно-биологических исследованиях и диагностике. ПЦР является наиболее известным практическим подходом для амплификации целевой последовательности ДНК в тысячи раз в течение короткого времени. В основе метода лежит проведение нескольких циклов амплификации целевого фрагмента ДНК с праймеров-затравок при помощи термофильной ДНК-полимеразы с удвоением количества фрагмента в каждом цикле амплификации. Результат реакции может быть определен в конце процесса, либо детектироваться в реальном времени [13].

Для определения вирусной РНК вначале необходимо провести реакцию обратной транскрипции для создания одноцепочечной кДНК с последующей ПЦР (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР

является быстрым методом анализа (достаточно 1–2 ч), хотя чувствительность не всегда одинакова для различных штаммов вирусов и лимитирована стадией обратной транскрипции.

Двухраундовая ПЦР исследуемого фрагмента ДНК является производной простой ПЦР и характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. В этой технике используются две пары праймеров: сначала проводится амплификация последовательности-мишени с пары внешних праймеров, а затем — с пары праймеров, лежащих внутри уже синтезированного фрагмента ДНК [14, 15]. Двухраундовая амплификация является и самым большим недостатком. Она увеличивает риск контаминации и требует больше времени для анализа по сравнению с простой ПЦР.

Мультиплексная ПЦР является вариантом ПЦР, в котором используются более одного набора праймеров с совпадающими температурами отжига, для детекции двух и более целевых последовательностей ДНК. Мультиплексная ПЦР является эффективным средством практической молекулярной диагностики для обнаружения множественных вирусных патогенов. Одновременное проведение нескольких реакций в одной пробирке представляется экономически целесообразным подходом для научных исследований и клинического применения [16, 17].

ПЦР в реальном времени в настоящее время является «золотым стандартом» определения нуклеиновых кислот в вирусологических исследованиях. ПЦР в реальном времени может применяться для количественного определения вирусных нуклеиновых кислот в образцах крови. Этот метод также позволяет проводить высокочувствительный, специфичный и воспроизводимый анализ вирусных нуклеиновых кислот.

Микрочипы

Среди множества разнообразных методов диагностики именно микрочипы (биочипы или «лаборатории-на-чипе») превращают молекулярную диагностику в мощный миниатюрный инструмент. Принцип микрочипов основан на параллельной гибридизации мишени (меченые РНК или ДНК) и зондов (несколько отдельных видов нуклеиновых кислот, иммобилизованных на твердой поверхности). По сути, микрочипы являются эволюцией Саузерн-блоттинга [18]. При необходимости связавшиеся с зондами фрагменты нуклеиновых кислот могут быть смыты или физически отделены от подложки для определения их полной последовательности (рис. 1).

Методы с использованием микрочипов являются достаточно высокочувствительными и специфичными. Однако для детекции результата гибридизации между зондами и мечеными целевыми последовательностями необходим специальный сканер. Микрочипы способны анализировать тысячи генов, включая вирусные нуклеотидные последовательности, одновременно. Этот метод хорошо подходит для выявления сразу нескольких вирусов в образце.

Повысить диагностическую эффективность ПЦР помогают новые протоколы выделения нуклеиновых кислот, включающие смывку фрагментов ДНК и РНК с форменных элементов крови при помощи трипсина [19, 20]. С другой стороны, применение новых технологий массового параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS) позволяет анализировать пикограммы нуклеиновых кислот, в том числе и фрагментированных [21]. Таким образом, использование более чувствительных и производительных методов молекулярной диагностики позволит выявлять ДНК и РНК возбудителя в сложных случаях с длительным течением заболевания. Это может стать важным решением для постановки диагноза, когда классические методы не дают однозначного ответа.

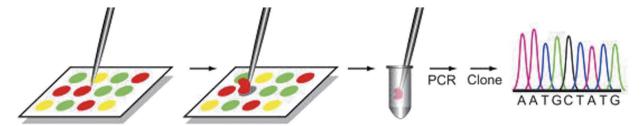


Рис. 1. Схема определения последовательности фрагмента вирусной ДНК путем гибридизации на биочипе, физического отделения связавшейся ДНК тонкой иглой, ПЦР-амплификации, клонирования и последующего секвенирования [18]. Fig. 1. Viral DNA Recovery and Sequencing Scheme (Hybridized viral sequences were physically scraped from a DNA microarray spot, amplified, cloned, and subsequently sequenced) [18].

Применение массового параллельного секвенирования в вирусологии

Секвенирование следующего поколения (NGS-секвенирование) дает возможность получения огромного объема данных в ходе одного эксперимента и позволяет выявлять чужеродные нуклеиновые кислоты в крови без необходимости использования трудоемкого и далеко не всегда успешного культивирования вирусов. Основными направлениями NGSисследований в вирусологии являются: поиск новых вирусных патогенов, анализ вариабельности в определенных группах вирусов, определение всей совокупности вирусов (вирома) в организмах, изучение процессов взаимодействия в системе паразит-хозяин и молекулярных основ патогенеза [13, 21]. Особую ценность новые технологии секвенирования представляют для диагностики инфекционных вирусных заболеваний, так как по сравнению с классическими способами позволяют сократить время выявления патогена и одновременно дают информацию о первичной структуре его генома. На основании анализа этой структуры возможны предсказание устойчивости нового штамма к применяемым лекарственным препаратам и оценка действенности имеющихся серологических тестов [23, 24].

Как и любая новая технология на этапе своего становления, методы NGS для постановки диагноза при вирусных заболеваниях нуждаются в дальнейшем усовершенствовании. Одной из важнейших проблем, с которой столкнулись исследователи, является загрязнение образцов нецелевыми нуклеиновыми кислотами. Прежде всего это относится к ДНК хозяина, попадающей в кровь в результате распада лейкоцитов или перманентно присутствующей в плазме крови (так называемая циркулирующая внеклеточная ДНК [25]). Последовательности ДНК хозяина легко могут быть опознаны и удалены при биоинформатической обработке данных, полученных при секвенировании, но при малых количествах вирионов в крови присутствие ДНК хозяина может существенно снизить объем данных по вирусным нуклеиновым кислотам. Так, в одной из ранее проведенных работ доля последовательностей патогена составила лишь 0,00067 % в общем массиве данных секвенирования суммарной ДНК из крови человека [13, 26]. Используя предварительное концентрирование вирионов из плазмы крови больных путем высокоскоростного центрифугирования, удается несколько улучшить показатели. Например, в случае секвенирования тотальной кДНК из плазмы крови пациентов с норовирусной инфекцией после предварительного ультрацентрифугирования доля структур нуклеиновых кислот патогена составила 0,12-1,90 % [27]. Для более значительного увеличения числа прочтений (ридов) вирусных геномов можно использовать ряд простых приемов при пробоподготовке. Предварительно образец крови подвергается центрифугированию для осаждения и удаления кровяных клеток. С этой же

целью иногда применяется фильтрация через мелкопористые вирусологические мембраны. Поскольку митохондрии из распавшихся клеток хозяина не удается удалить полностью, то дополнительно проводят обработку хлороформом, растворяющим их липидные мембраны. В полученном препарате все еще содержатся значительные количества циркулирующей и митохондриальной ДНК человека, которая может быть элиминирована дополнительной обработкой неспецифическими нуклеазами. Нуклеиновые кислоты вирусов при этом защищены капсидными оболочками и не подвергаются деструкции. Таким образом удается значительно уменьшить число нецелевых последовательностей при проведении секвенирования на NGS-машинах [28, 29].

С учетом этих приемов наиболее эффективная процедура выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов крови для NGS-анализа включает в себя стадии, показанные на рисунке 2 [13].

Результаты проведения отдельных стадий могут выборочно контролироваться с помощью электронной микроскопии (присутствие вирионов) или ПЦР-тестов на количество ДНК че-



Рис. 2. Схема процедуры выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов крови для NGS-анализа.

Fig. 2. Scheme for viral nucleic acids isolation from blood samples for NGS analysis.

ловека (определение степени контаминации ДНК хозяина) [30]. Доступен ряд коммерческих наборов для выделения вирусных нуклеиновых кислот из жидких биоматериалов, которые включают в себя буферные растворы для лизиса вирионов и миниколонки для очистки нуклеиновых кислот. Также могут быть разработаны специализированные аппараты для отделения клеток крови хозяина от вирусных частиц. Например, сотрудниками Массачусетского технологического института (США) и партнерских научных и медицинских организаций создан аппарат, использующий микрофлюидные технологии для негативной селекции вирионов из образцов крови [31].

Еще одним известным подходом для увеличения выхода вирусных нуклеиновых кислот является их обогащение, в котором используется гибридизация с синтезированными одноцепочечными олигонуклеотидами, структура которых соответствует наиболее консервативным участкам известных вирусных патогенов. Созданы и успешно апробированы тестовые панели, позволяющие увеличить число чтений вирусных последовательностей в одном NGS-эксперименте до 50–99 % и при этом охватывающие широкий круг вероятных патогенов [32, 33].

Выход целевого материала после выделения не является достаточным для большинства секвенирующих машин, требующих не менее 1 мкг ДНК на одно секвенирование. Это объясняется относительно невысокой концентрацией вирусных частиц в крови и малыми размерами геномов большинства вирусов. Однако эта трудность может быть преодолена проведением дополнительной ПЦР-амплификации [13, 34]. В последние годы появились коммерческие наборы для увеличения количества ДНК в низкокопийных образцах, основанные на этом принципе (Illumina TruSeq Nano, NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, ThruPLEX Plasma-seq Kit, KAPA Hyper Prep Kit). После получения вирусной ДНК или кДНК в достаточном количестве дальнейшая пробоподготовка зависит от типа секвенирующей машины и проводится в соответствии с протоколами производителя прибора.

Кроме наличия ДНК хозяина, другую сложность в идентификации патогена могут создать вирусы, не являющиеся основной причиной инфекции, а появившиеся в результате вторичной инфекции или являющиеся составной частью нормального микробиома человека. Как показали ДНК-чиповые и NGS-исследования последних лет, вирусы, вызывающие острые и хронические инфекционные заболевания, составляют лишь небольшую, эпизодически возникающую часть вирома человека [35, 36]. По большей части разнообразные вирусыкомменсалы или вирусы с неизвестной степенью патогенности обнаруживаются в кишечнике, на коже, слизистых оболочках и различных органах человека, а в крови, насколько это известно в настоящее время, присутствуют лишь некоторые их виды [37]. Так, в плазме крови более 90 % обследованных здоровых людей были найдены анелловирусы [38]. В NGS-ридах ДНК из плазмы крови также часты последовательности, соответствующие хорошо изученным представителям семейства Herpesviridae: цитомегаловирусу, вирусу Эпштейна-Барр и герпесвирусам типов 1, 2, 6 и 8, причем количество такой ДНК увеличивается с возрастом обследуемых [39]. Современное обобщенное представление о структуре вирома человека, подавляющую часть которого составляют малоизученные и не вызывающие острых инфекций разновидности вирусов, показано на рисунке 4.

В образцах крови некоторых бессимптомных индивидов могут быть обнаружены ДНК или РНК других вирусов, в частности энтеровирусов и аденовирусов, а также бактериофагов [40–42]. Таким образом, при анализе данных NGS необходимо учитывать возможность присутствия в крови вирусов, не являющихся возбудителем изучаемого основного заболевания (ви-

русов-комменсалов, вирусов хронических и вторичных инфекций, а также малопатогенных и медленно размножающихся штаммов вирусов). Это может привести к ложной идентификации патогена. Кроме того, при многих скоротечных острых инфекциях, например вызываемых некоторыми флавивирусами, титр возбудителя в крови достаточно высок лишь в течение первых дней, а затем резко снижается из-за включения иммунного ответа, хотя симптоматика заболевания еще частично сохраняется [43]. Запоздалое взятие образца крови в этих случаях увеличивает вероятность ошибки в NGS-диагностике.

NGS-технологии стали использоваться в вирусологии практически сразу же после их появления, и, несмотря на описанные трудности, с их помощью уже обнаружен целый ряд новых видов

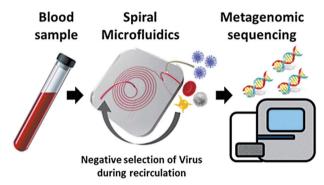


Рис. 3. Негативная селекция вирусных частиц путем рециркуляции [31].

Fig. 3. Negative selection of virus during recirculation [31].

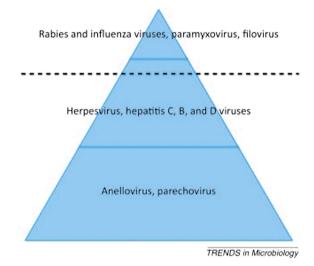


Рис. 4. Пирамида вирусных инфекций. Показатель, при котором у людей проявляются явные симптомы болезни (процент инфицированных) может быть высоким (вирусы бешенства и гриппа, парамиксовирус и филовирус — вершина «айсберга»), средним (вирусы герпеса, гепатита С, В и D) или низким (анелловирус и пареховирус, основание «айсберга»). В истории вирусологических исследований внимание постепенно переходило от вершины к основанию пирамиды. Область под пунктирной линией соответствует бессимптомным инфекциям [39].

Fig. 4. The iceberg of viral infections. The rate at which people show overt disease symptoms as a proportion of those infected can be high (rabies and influenza viruses, paramyxovirus, and filovirus; tip of iceberg), medium (herpesvirus, hepatitis C, B, and D viruses), or low (anellovirus and parechovirus; base of iceberg). In the history of virus discovery attention has progressively shifted from the tip to the base of the iceberg. The volume below the dashed line corresponds to the asymptomatic infections [39].

вирусов человека, включая представителей анелловирусов, пикорнавирусов, полиомавирусов и многих других [44]. В качестве примеров успешного использования массового параллельного секвенирования для идентификации новых опасных вирусных патогенов можно привести выявление возбудителей острой геморрагической лихорадки (рабдовирус Bas-Congo), острой инфекции центральной нервной системы (цикловирус CyCV-VN), тромбоцитопении (буньявирус HNF) [45—47].

Как известно, многие острые вирусные инфекции имеют сходную симптоматику, поэтому установление точной этиологии заболевания требует проведения целых комплексов серологических или ПЦР-тестов, каждый из которых предназначен для выявления отдельного вида патогена, в то время как NGSтехнологии упрощают идентификацию вида вируса. Иллюстрацией может служить установление единичного случая желтой лихорадки в 2010 г. в Уганде у пациента с острой геморрагической лихорадкой [13, 48]. Имеющиеся серологические и ПЦР-тесты на распространенных в этой стране возбудителей лихорадки денге, лихорадки западного Нила, малярии, крымско-конгской лихорадки, а также на вирусы Эбола и Марбург. дали отрицательный результат. Поэтому авторы исследования использовали секвенирование следующего поколения и обнаружили в сыворотке крови больного последовательности вируса YFV, причем покрытие генома вируса составило 98 %. В ряде других описанных случаев использование метагеномного NGSанализа помогло установить возбудителей острого энцефалита у пациентов. Как известно, это тяжелое состояние может быть вызвано более чем сотней различных вирусных и бактериальных патогенов, что затрудняет выбор наиболее подходящего метода лечения [49]. Методы ПЦР-диагностики, несмотря на простоту, в таких случаях требуют знания нуклеотидных структур геномов всех предполагаемых возбудителей заболевания, в то время как NGS-анализ позволяет выявить даже очень редкие или ранее неизвестные патогены (рис. 5).

Высокая степень чувствительности нового метода диагностики была подтверждена во время вспышки заболевания лихорадкой Эбола в 2008 г. [50]. В отличие от традиционных серологических тестов, секвенирование следующего поколения позволило выявить наличие вируса во всех исследованных образцах сыворотки крови. Для получения вирусной кДНК авторы работы применили ОТ-ПЦР со случайных праймеров, а анализ нуклеотидных последовательностей показал, что возбудителем является новый, прежде неизвестный вариант вируса Эболы, несколько отличающийся по серологическим свойствам от описанных субтипов. Еще одним примером выявления новых субтипов вирусов с помощью NGS-технологий служит получение трех полногеномных последовательностей вируса чикунгунья из плазмы крови трех бессимптомных носителей в Пуэрто-Рико [13, 51]. Проблема незначительного количества инфекционных агентов в крови в этом примере была успешно решена с помощью предварительного проведения изотермической транскрипционной РНК-амплификации (transcription-mediated amplification, TMA), считающейся более эффективной, чем ПЦР-амплификация.

Технологии NGS успешно применяются не только для поиска новых возбудителей и идентификации видов патогенов, но и для быстрого определения вариантов известного вируса, циркулирующих в данной местности во время вспышки заболевания. Геномы близкородственных вирусов содержат высококонсервативные участки, что дает возможность значительно упростить пробоподготовку в таких случаях. Используя праймеры на эти участки, проводят ПЦР амплификацию тотальной РНК (или ДНК), выделенной из крови. Полученные таким образом ПЦР-продукты не содержат контаминирующей ДНК, и поэтому последующее секвенирование на NGS-машинах позволяет получить очень высокую степень покрытия исследуемых участков генома. Так как наборы реактивов для NGS все еще дорогостоящи, то в ходе одного секвенирования рационально получать данные сразу для нескольких десятков образцов. Для

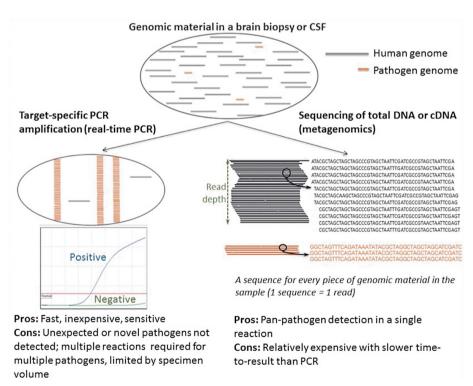


Рис. 5. Схематичное сравнение метода патоген-специфичной ПЦР с методом метагеномного анализа для обнаружения патогена [49].

Fig. 5. Schematic of pathogen-specific real-time PCR versus metagenomics for pathogen detection [49].

различения последовательностей из разных проб используются короткие олигонуклеотидные метки (индексы или баркоды), пришитые к секвенируемым фрагментам ДНК. В частности, этот прием уже находит применение для определения субтипов гриппа в ходе анализа РНК во время сезонных вспышек. Хотя для обнаружения вируса гриппа достаточно исследовать мазки из носоглотки, но метод также может быть легко адаптирован для образцов крови при иных вирусных заболеваниях [52]. На рисунке 6 представлена краткая схема определения вирусных нуклеиновых кислот в биоматериале человека (образцы крови, биопсийный материал, мазки, выделения организма). Вирусные частицы выделяют из образца на основе размера и/или плотности. Затем вирусные нуклеиновые кислоты экстрагируют, проводят пробоподготовку и секвенируют. Последовательности подвергают скринингу для удаления невирусных последовательностей (например, от человеческих или бактериальных хозяев). Наконец, короткие чтения собираются в более длинные непрерывные последовательности и аннотируются.

Рассматриваемая тема субтипирования очень важна в диагностике многих вирусных заболеваний. От правильного определения разновидности того или иного вируса зависит выбор курса лечения, так как различные штаммы отличаются по устойчивости к применяемым антивирусным препаратам. Эволюция вирусов происходит с большой скоростью, что особенно характерно для РНК-содержащих вирусов, полимераза которых не обладает корректирующей активностью. Это приводит к возникновению вариантов вируса с измененными антигенными, тропизменными и лекарственно-устойчивыми свойствами за относительно короткое время. Секвенирование следующего поколения нуклеиновых кислот из образцов крови позволяет быстро определить субтип патогена путем сравне-

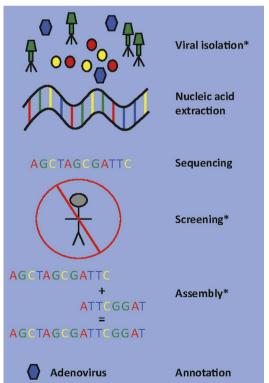


Рис. 6. Общая процедура определения патогенных микроорганизмов с использованием метагеномики.

ния его нуклеотидных последовательностей с известными первичными структурами геномов вирусов [13, 53].

В научной литературе также обсуждается возможность NGS-мониторинга состояния пациентов с хроническими вирусными инфекциями и с заболеваниями с длительным латентным периодом. В частности, использование массового параллельного секвенирования выглядит перспективным для отслеживания течения такого заболевания, как СПИД, включая и контроль успешности применения лекарственных препаратов и лечебных процедур. Особо привлекательной особенностью NGS-анализа в этом случае является то, что определяются не только вирусная нагрузка и появление новых мутационных вариантов ВИЧ (квазивидов), но и разнообразные вторичные инфекции, вызванные снижением иммунитета [54].

В более отдаленной перспективе NGS-исследования могут применяться гораздо шире, чем в настоящее время. Этому способствуют уникальные возможности технологии, не требующей культивирования и изоляции вируса и позволяющей определить весь спектр чужеродных ДНК и РНК, присутствующих в крови [55]. Кроме выявления и идентификации вирусов у заболевших людей NGS также может применяться для определения видов животных, являющихся природным резервуаром инфекции, а также для мониторинга присутствия опасных вирусов в популяциях диких животных или на животноводческих фермах. Такие наблюдения помогут заблаговременно осуществить необходимые меры по предупреждению вспышек заболеваний (информирование населения для снижения числа контактов с носителями, вакцинация, ограничение нахождения людей в неблагополучном районе и т. д.) [13, 56].

Другой областью применения NGS может стать анализ крови доноров, предназначенной для переливания нуждающимся лицам. Существует большое число хронических или латентных вирусных заболеваний с неявно выраженной симптоматикой, которые могут быть переданы при переливании крови (например, СПИД, гепатиты, парвовирусная инфекция и т. д.). Контроль стерильности банков крови поможет избежать случайного заражения реципиентов такими инфекциями [57–59].

В настоящее время оборудование и расходные материалы для проведения массового параллельного секвенирования все еще достаточно дороги для широкого применения в диагностических целях. Тем не менее быстрый технический прогресс, наблюдаемый в последнее десятилетие в области определения структур нуклеиновых кислот, и постоянное снижение стоимости процесса секвенирования дают все основания полагать, что в будущем процедура NGS-анализа ДНК и РНК в крови для выявления патогенных вирусов станет одной из стандартных и часто применяемых в клинической практике.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственных заданий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 141-00171-01, № 141-00069-18-01 на проведение прикладных научных исследований (номера государственного учета НИР АААА-Б17-217022820201-7 (28.02.2017) и АААА-A16-116040810107-1 (17.03.2018)).

Acknowledgments. The study reported was conducted in the framework of the State task State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR № 141-00171-01, № 141-00069-18-01 (R&D public accounting No. AAAA-Б17-217022820201-7 (28.02.2017) и AAAA-A16-116040810107-1 (17.03.2018)).

Информация об отсутствии конфликта интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

^{*} Не обязательные или зависящие от цели исследования шаги [52]. Fig. 6. General procedure for identifying pathogens using shotgun metagenomics.

^{*} Denotes optional or application-dependent steps [52].

Литература / References

- Wu F, Hong T, Della-Latta P. Nonamplified probe-based microbial detection and identification. In: Tang YW, Stratton CW. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. New York: Springer; 2013.
- Lo YMD, Chan KCA. Introduction to the polymerase chain reaction. In: Lo YMD, Chiu RWK, Chan KCA, eds. Clinical Applications of PCR. Methods in Molecular Biology. Humana Press: 2006. P. 1–10.
- Chang CC, Chen CC, Wei SC, Lu HH, Liang YH, Lin CW. Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. Sensors (Basel). 2012;12(6):8319–37. https://doi. org/10.3390/s120608319
- Karami A, Gill P, Motamedi MH, Saghafinia M. A review of the current isothermal amplification techniques: applications, advantages and disadvantages. J Global Infect Dis. 2011;3(3):293–302. https://doi.org/10.4103/0974-777x.83538
- Balachandra K, Thawaranantha D, Pitaksutheepong C, Techayingpaiboon D, Jongtrakulsiri S, Bhumisawasdi J. Detection of hepatitis B virus DNA in blood donors using polymerase chain reaction. B Dep Med Sci. 2013;36(3):145–52.
- Chang CC, Chen CC, Wei SC, Lu HH, Liang YH, Lin CW. Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. Sensors (Basel). 2012;12(6):8319–37. https://doi. org/10.3390/s120608319
- Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol Biol*. 2013;943:1– 16. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_1
- Loeffelholz M, Dong J. PCR and its variations. In: Tang YW, Stratton CW. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. New York: Springer; 2013.
- Nurtjahyani SD, Handajani R. Detection of hepatitis B virus DNA among abdominal typhus patients with hepatitis B virus co-infection in Tuban district based on nested PCR technique. J Biol Agr Healthcare. 2013;3(6):101–5.
- Hu Y. Molecular techniques for blood and blood product screening. In: Tang YW, Stratton CW. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. New York: Springer; 2013.
- Tang YW, Stratton CW. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. New York: Springer; 2012.
- Nuriya H, Inoue K, Tanaka T, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, et al. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. J Clin Microbiol. 2010;48(11):3843–51. https://doi.org/10.1128/JCM.00415-10
- 13. Разработка нового метода диагностики вирусных заболеваний на ранних стадиях. Отчет о НИР (промежуточный). ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребназдоза; рук. Нетесова Н.А.; исполн.: Евдокимов А.А. и др. М.; 2017. 24 с. № ГР НИР АААА-А16-116040810107-1. Деп. в ЦИТИС 28.02.2017, № ИКРБС АААА-Б17-217022820201-7. [Development of a new method for the diagnosis of viral diseases in the early stages. Research report (intermediate). FBUN GNTS VB «Vektor» Rospotrebnazdoza; advisors: Netesova NA; prepared by: Evdokimov AA, et al. Moscow; 2017. 24 p. No. SR AAAA-A16-116040810107-1. Deposited in CITIS on 28.02.2017, No IKRBS AAAA-Б17-217022820201-7 (In Russ.)]
- Cobo F. Application of molecular diagnostic techniques for viral testing. *Open Virol J.* 2012;6:104–14. https://doi. org/10.2174/1874357901206010104
- Chauhan H, Kher H, Chandel B, Dadawala A, Jain L. Evaluation of group specific nested PCR for detection of Bluetongue virus. Vet World. 2009;2(5):179–82.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559–70.
- Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, et al. Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Intern Med.* 2013;52(2):201–11.

- Wang D, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol.* 2003;1(2):E2. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000002
- 19. Ситько ВЛ, Куксова АН, Евдокимова ИИ, Нетесова НА, Дегтярев СХ. Разработка простого метода получения высокоочищенной ДНК, связанной с клетками крови. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2014;13(4):50–5. [Sitko VL, Kuksova AN, Evdokimova II, Netesova NA, Degtyarev SKh. Development of a simple method for obtaining highly purified blood cell-related DNA. Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2014;13(4):50–5 (In Russ.)]
- Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, Permyakova VI, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clin Chem.* 2005;51(7):1317–9.
- Lee AY, Lee CS, Van Gelder RN Scalable metagenomics alignment research tool (SMART): a scalable, rapid, and complete search heuristic for the classification of metagenomic sequences from complex sequence populations. *BMC Bioinformatics*. 2016;17:292. https://doi.org/10.1186/s12859-016-1159-6
- Cadwell K. The virome in host health and disease. *Immunity*. 2015;42(5):805–13. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.003
- Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *J Clin Virol*. 2013;58(2):346–50. https://doi. org/10.1016/j.jcv.2013.03.003
- Lavezzo E, Barzon L, Toppo S, Palù G. Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(9):1011–23. https://doi.org/ 10.1080/14737159.2016.1217158
- Gravina S, Sedivy JM, Vijg J. The dark side of circulating nucleic acids. Aging Cell. 2016;15(3):398–9. https://doi. org/10.1111/acel.12454
- Chiu CY. Viral pathogen discovery. Curr Opin Microbiol. 2013;16(4):468–78. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.05.001
- Batty EM, Wong TH, Trebes A, Argoud K, Attar M, Buck D, et al. A modified RNA-Seq approach for whole genome sequencing of RNA viruses from faecal and blood samples. *PLoS One*. 2013;8(6):e66129. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066129
- 28. Hall RJ, Wang J, Todd AK, Bissielo AB, Yen S, Strydom H, et al. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods*. 2014;195:194–204.
- Li L, Deng X, Mee ET, Collot-Teixeira S, Anderson R, Schepelmann S, et al. Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. J Virol Methods. 2015;213:139–46. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.12.002
- Breitbart M, Rohwer F. Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. *Biotechniques*. 2005;39(5):729–36. https://doi. org/10.2144/000112019
- Choi K, Ryu H, Siddle KJ, Piantadosi A, Freimark L, Park DJ, et al. Negative selection by spiral inertial microfluidics improves viral recovery and sequencing from blood. *Anal Chem.* 2018;90(7):4657–62. https://doi.org/10.1021/acs. analchem.7b05200
- Wylie TN, Wylie KM, Herter BN, Storch GA. Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture. Genome Res. 2015;25(12):1910–20. https://doi.org/10.1101/gr.191049.115
- O'Flaherty BM, Li Y, Tao Y, Paden CR, Queen K, Zhang J, et al. Comprehensive viral enrichment enables sensitive respiratory virus genomic identification and analysis by next generation sequencing. *Genome Res.* 2018;28(6):869–77. https://doi.org/10.1101/gr.226316.117

- Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt9):1853–68. https:// doi.org/10.1099/vir.0.043182-0
- Wylie KM, Weinstock GM, Storch GA. Emerging view of the human virome. *Transl Res*. 2012;160(4):283–90. https://doi. org/10.1016/j.trsl.2012.03.006
- Parker MT. An ecological framework of the human virome provides classification of current knowledge and identifies areas of forthcoming discovery. Yale J Biol Med. 2016;89(3):339–51.
- Vu DL, Kaiser L. The concept of commensal viruses almost 20 years later: redefining borders in clinical virology. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(10):688–90. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.005
- Hino S, Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. Rev Med Virol. 2007;17(1):45–57. https://doi.org/10.1002/ rmv.524
- 39. Lecuit M, Eloit M. The human virome: new tools and concepts. *Trends Microbiol*. 2013;21(10):510–5. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.07.001
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. Cell. 2009;138(1):30–50. https://doi.org/10.1016/j. cell.2009.06.036
- De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell.* 2013;155(5):1178– 87. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.034
- Moustafa A, Xie C, Kirkness E, Biggs W, Wong E, Turpaz Y, et al. The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog.* 2017;13(3):e1006292. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006292
- Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, eds. Principles and Practice of Clinical Virology. Oxford: Wiley-Blackwell: 2009.
- Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol*. 2012;2(1):63–77. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004
- 45. Grard G, Fair JN, Lee D, Ślikas E, Steffen I, Muyembe JJ, et al. A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa. *PLoS Pathog*. 2012;8(9):e1002924. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002924
- 46. Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, Chau TT, Tu le TP, de Vries M, et al. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. MBio. 2013;4(3):e00213–31. https://doi.org/10.1128/mBio.00231-13
- 47. Xu B, Liu L, Huang X, Ma H, Zhang Y, Du Y, et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of

Об авторах

Абдурашитов Мурат Абдурашитович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией эпигенетики отдела производства и применения средств ПЦР диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9402-5254

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук, заведующая отделом разработки средств ПЦР диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, **ORCID:** http://orcid.org/ 0000-0002-3380-9573

Поступила 09.11.2018 После доработки 15.11.2018 Принята к публикации 15.11.2018

- a new bunyavirus. *PLoS Pathog.* 2011;7(11):e1002369. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002369
- 48. McMullan LK, Frace M, Sammons SA, Shoemaker T, Balinandi S, Wamala JF, et al. Using next generation sequencing to identify yellow fever virus in Uganda. *Virology*. 2012;422(1):1–5. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.024
- Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. *J Infect.* 2018;76(3):225–40. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.014
- Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albariño CG, Conlan S, Reeder SA, et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000212. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212
- Chiu CY, Bres V, Yu G, Krysztof D, Naccache SN, Lee D, et al. Genomic assays for identification of Chikungunya virus in blood donors, Puerto Rico, 2014. Emerg Infect Dis. 2015;21(8):1409–13. https://doi.org/10.3201/eid2108.150458
- Bibby K. Metagenomic identification of viral pathogens. *Trends Biotechnol.* 2013;31(5):275–9. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.016
- Posada-Cespedes S, Seifert D, Beerenwinkel N. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. Virus Res. 2016;239:17–32. https://doi. org/10.1016/j.virusres.2016.09.016
- Gibson RM, Schmotzer CL, Quiñones-Mateu ME. Next-generation sequencing to help monitor patients infected with HIV: ready for clinical use? *Curr Infect Dis Rep.* 2014;16(4):401. https://doi.org/10.1007/s11908-014-0401-5
- Rasmussen ÅL, Katze MG. Genomic signatures of emerging viruses: a new era of systems epidemiology. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):611–8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.016
- Smith I, Wang LF. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2013;3(1):84–91. https://doi.org/10.1016/j. coviro.2012.11.006
- Walsh GM, Shih AW, Solh Z, Golder M, Schubert P, Fearon M, Sheffield WP. Blood-borne pathogens: a canadian blood services centre for innovation symposium. *Transfus Med Rev.* 2016;30(2):53–68. https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2016.02.003
- Lau P, Cordey S, Brito F, Tirefort D, Petty TJ, Turin L, et al. Metagenomics analysis of red blood cell and fresh-frozen plasma units. *Transfusion*. 2017;57(7):1787–1800. https:// doi.org/10.1111/trf.14148
- Sauvage V, Gomez J, Boizeau L, Laperche S. The potential of viral metagenomics in blood transfusion safety. *Trans*fus Clin Biol. 2017;24(3):218–22. https://doi.org/10.1016/j. tracli.2017.06.018

Authors

Murat A. Abdurashitov, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Epigenetics, Department of Production and Use of PCR Tools for Viral and Rickettsial Diseases Diagnostics of the State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, **ORCID:** https://orcid.org/0000-0002-9402-5254

Nina A. Netesova, Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Development of PCR Tools for Viral and Rickettsial Diseases Diagnostics of the State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0002-3380-9573

Received 9 November 2018 Revised 15 November 2018 Accepted 15 November 2018