

Тест-система для диагностики ВК вирусной инфекции человека методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»

К.Л. Дедюля, Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, З.Ф. Богуш, В.А. Землянский, С.К. Лозюк

ГУ «Республиканский научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь

Kit for diagnosis of BK virus infection by the real-time Polymerase Chain Reaction method (PCR)

K.L. Dziadziulia, T.V. Amvrosieva, N.V. Poklonskaya, Z.F. Bogush, V.A. Zemlianski, S.K. Loziuk

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus, Republic of Belarus

Настоящая работа содержит информацию о разработанной на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» диагностической тест-системе, основанной на методе количественной ПЦР в режиме «реального времени». Проведенные исследования показали высокие значения диагностической чувствительности и специфичности тест-системы. Продемонстрирована возможность использования разработанного препарата для лабораторной диагностики полиомавирусной инфекции.

Ключевые слова: полиомавирусная инфекция; ПЦР тест-система; диагностика; вирусология; ВК вирус.

Библиографическое описание: Дедюля КЛ, Амвросьева ТВ, Поклонская НВ, Богуш ЗФ, Землянский ВА, Лозюк СК. Тест-система для диагностики ВК вирусной инфекции человека методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Биопрепараты 2015; (3): 58–60.

The presented work comprises information about developed by Republic Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology the diagnostic kit for detection the BK virus DNA in clinical samples by the real-time Polymerase Chain Reaction method. Accomplished studies showed high level its diagnostic sensitivity and specificity. Suitability of developed kit for laboratory BK virus diagnosis was demonstrated.

Key words: polyomavirus infection; PCR kit; diagnosis; virology; BK virus.

Bibliographic description: Dziadziulia KL, Amvrosieva TV, Poklonskaya NV, Bogush ZF, Zemlianski VA, Loziuk SK. Kit for diagnosis of BK virus infection by the real-time Polymerase Chain Reaction method (PCR). Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (3): 58–60.

ВК вирус – один из представителей патогенных для человека возбудителей рода *Poliomavirus*, выделенный впервые в 1971 г. от реципиента почки, чьи инициалы были В.К. Серологические исследования показывают, что более 80% населения во всем мире ВК вируссеропозитивны [1]. Первичная инфекция протекает бессимптомно, хотя, в некоторых случаях, может сопровождаться слабыми респираторными проявлениями [1, 2]. Во время первичного инфицирования вирус распространяется по организму и остается в латентном состоянии. Основной мишенью персистентной ВК вирусной инфекции являются клетки почек и мочевыводящих путей. У пациентов с иммунодефицитом ее реактивация может приводить к почечной дисфункции в виде так называемой полиомавирус-ассоциированной нефропатии (ПВАН) у реципиентов после трансплантации почки, или к геморрагическому циститу после трансплантации костного мозга [3, 4].

Согласно современным представлениям о патогенезе ПВАН, активная вирусная репликация на 8 недель опережает развитие гистологических изменений в тканях почек. Исходя из этого, регулярный мониторинг уровней ВК вирусной ДНК в моче и крови пациентов является важным репрезентативным методом оценки динамики происходящего в организме инфекционного процесса с целью раннего установления диагноза и профилактики возможных тяжелых осложне-

ний инфекции [1–4]. При этом оценка уровней вирусии дает представление о нарастании вирусной репликации в тканях почек, тогда как выявление вирусной нагрузки в крови (в случае виремии) является чувствительным и специфичным предиктором развития ПВАН, позволяющим провести своевременную коррекцию терапии и избежать негативных последствий в виде отторжения трансплантата. В связи с этим в развитых странах лабораторная диагностика ВК вирусной инфекции, основанная на количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), активно используется и является обязательной частью лабораторного обследования реципиентов после трансплантации органов и клеток, а также других пациентов из групп риска, получающих иммуносупрессивную терапию.

Как известно, в настоящее время на европейском рынке существуют тест-системы для детекции ВК вируса методом количественной ПЦР. Однако стоимость таких диагностикомов достаточно высока (например, для тест-системы производства «Qiagen» она составляет не менее 4500 евро), что делает их малодоступными для широкого использования в практической медицине ряда стран, Республика Беларусь не является исключением. Учитывая тот факт, что для профилактики ВК вирусных осложнений пациентам с иммунодефицитом необходим регулярный мониторинг ВК вирусной нагрузки, финансовая составляющая лабораторного обследования

с использованием импортных тест-систем в расчете на одного пациента является весьма значительной (не менее 1–2 тыс. евро в год). Данные обстоятельства, а также отсутствие производства аналогичных диагностических средств на территории России и других стран постсоветского пространства легли в основу инициации научно-исследовательских и биотехнологических работ по созданию отечественной количественной ПЦР тест-системы с использованием реактивов, реагентов и других комплектующих белорусского производства, не уступающих по качеству импортным, но имеющим более низкую стоимость.

Целью работы было разработка диагностической тест-системы для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса в клиническом материале методом ПЦР в режиме «реального времени».

Материалы

1. Исследовано 466 клинических образцов (моча и сыворотка крови) от реципиентов почки, которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница».

Методы

1. Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводились 1:1 транспортной средой для проб клинического материала, производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

2. Для выделения ДНК из проб клинического материала применяли коммерческий набор «Рибо-Преп» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

3. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA 6.0 [5].

4. Детекцию ВК вирусов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Использовали олигонуклеотиды, Taq-полимераза, раствор $MgCl_2$ и смесь дезоксинуклеотидов производства «PrimeTech» (Беларусь). Реакционная смесь для проведения ПЦР была на основе буфера, содержащего 650 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 166 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% Tween 20. Смесь дезоксинуклеотидов и Taq-полимеразу использовали в концентрациях 200 мкмоль и 2,5 ед. соответственно. $MgCl_2$ использовали в концентрации 6 ммоль. Оптимизированный температурный профиль реакции состоял из 45 циклов денатурации при 95°C в течение 15 секунд и объединенной стадии отжига-элонгации при 60°C в течение 40 секунд.

5. Диагностическую чувствительность разработанных тест-систем вычисляли по формуле: (количество положительных проб / количество истинно положительных проб) × 100%, диагностическую специфичность – по формуле: (количество отрицательных проб / количество истинно отрицательных проб) × 100%. В качестве истинно положительных и истинно отрицательных проб использовали пробы, оказавшиеся положительными или отрицательными при исследовании их ранее описанным в литературе методом ПЦР [6].

Результаты и обсуждение

Исходя из биологии ВК вируса и анализа научной литературы по данной проблеме, разработано 2 набора праймеров

и зондов, локализованных в различных регионах его генома. Подбор праймеров и зондов проводили по результатам компьютерного анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей ВК вирусов из базы данных NCBI при помощи программы MEGA 6.0 [5]. Праймеры подобраны к наиболее консервативным участкам генома ВК вируса. В результате выбраны два набора праймеров и зондов, обозначенных как ВК-VP3 и ВК-Т, соответственно локализованных в участках генома, кодирующих капсидный белок VP3 и большой Т-антиген.

Выполнена оптимизация реакции ПЦР, которая включала два этапа: оптимизацию состава реакционной смеси (ПЦР-буфер, концентрация $MgCl_2$) и подбор условий проведения реакции (температурный профиль и длительность каждого из сегментов цикла).

Проведена оценка эффективности ПЦР при независимом использовании каждого из наборов праймеров ВК-VP3 и ВК-Т и их совместной работе в ПЦР-смеси. Полученные результаты показали, что оптимальным для детекции ВК вируса является использование варианта ПЦР в реальном времени с одновременным введением в реакционную смесь двух пар праймеров и двух меченых зондов, участвующих в двух параллельных процессах амплификации. В этих условиях диагностическая реакция отличалась значительно большей чувствительностью (рис. 1).

В качестве положительного контроля и количественного ДНК-стандарта для разработанной тест-системы на базе вектора рUC18 создана плаزمида рВК-1,2VT, содержащая вставку размером 1228 пар оснований, кодирующую фрагменты мишени для обоих наборов разработанных диагностических праймеров.

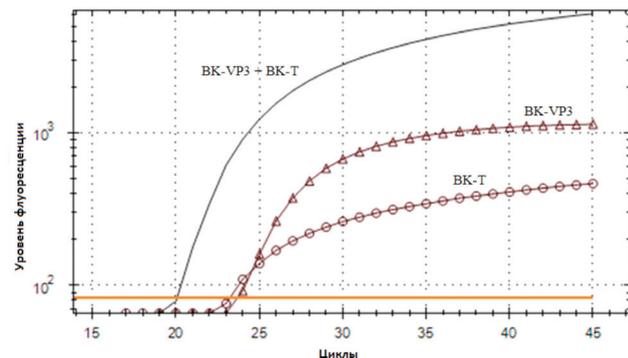


Рис. 1. Результаты исследования проб мочи с помощью ПЦР в реальном времени при независимом использовании каждого из наборов праймеров ВК-VP3 и ВК-Т и их совместной работе в ПЦР-смеси.

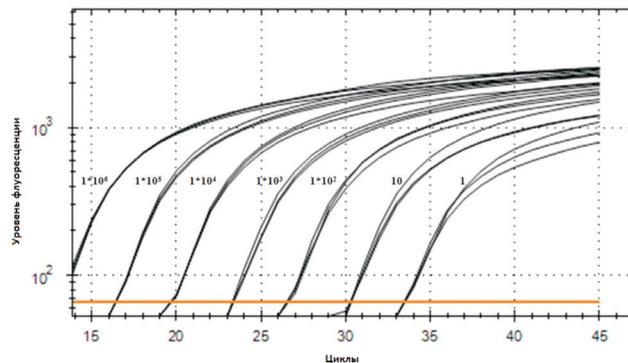


Рис. 2. Результаты ПЦР в режиме реального времени серии 10-кратных разведений плазмиды рВК-1,2VT с концентрацией ДНК от 1×10^6 до 1 ГЭ/мкл.

Концентрацию очищенного препарата рекомбинантной плазмиды измеряли спектрофотометрически и определяли число молекул плазмиды. Плазмиду линейаризовали при помощи обработки рестриктазой *HindIII* и далее из исходного препарата рВК-1,2VT готовили серию 10-кратных разведений с концентрацией ДНК от 1×10^6 до 1 ГЭ/мкл. Полученные разведения использовали в качестве матрицы в реакции с праймерами для изучения аналитической чувствительности тест-системы и приготовления ДНК-стандартов. Полученные результаты показали, что порог чувствительности набора в отношении ВК вирусов (рис. 2) был менее 10 ГЭ/мкл. В качестве ДНК-стандартов выбраны две стандартные концентрации ДНК: 1×10^4 и 10 ГЭ/мкл. Данные стандарты будут использованы как калибраторы при проведении количественной ПЦР для определения уровней ВК вирусной нагрузки в организме пациентов.

Изучение диагностической специфичности и чувствительности разработанной тест-системы проводили в параллельных исследованиях клинического материала – 46 проб клинического материала (24 проб мочи и 22 проб сыворотки крови), в которых ранее мультиплексной ПЦР с системой праймеров для дифференциальной диагностики ВК и JC вирусов [6] было (в 8 пробах) или не было обнаружено (в 38 пробах) наличие ДНК ВК и JC вирусов. При использовании создаваемой тест-системы ВК вирус был выявлен во всех 8 положительных пробах. В установленных ранее 32 отрицательных пробах вирус не определялся.

Таким образом, разработанная тест-система для детекции ДНК ВК вируса выявила все отобранные положительные и отрицательные пробы без ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов, что указывает на ее 100% диагностическую чувствительность и специфичность.

В ходе проведенных полевых испытаний тест-системы с использованием 466 образцов клинического материала, полученного в период с 2011 по 2014 гг. от реципиентов почки, выявлено 42 положительных пробы с уровнем вирусной нагрузки, варьировавшей от 4.2×10^7 до 1.3×10^4 ГЭ/мл.

Выводы

Созданная ПЦР тест-система для количественного выявления ВК вируса в клиническом материале пока не имеет аналогов в Беларуси и сопредельных странах – членах ЕАЭС, что указывает на хорошие перспективы ее востребованности на отечественном и зарубежном рынках диагностических средств. Актуальность данной разработки очевидна в связи с активным развитием трансплантации органов и тканей в последние годы. Кроме того, она может найти свое широкое использование для диагностики полиомавирусных осложнений при ряде заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитными состояниями, с целью количественной оценки уровня ВК вирусной нагрузки и коррекции проводимой терапии (например, в онкологии, при обследовании пациентов со СПИДом и др.).

Литература:

1. Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(7–8): 865–76.
2. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* 2012; 14(9): 672–83.
3. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 373579.
4. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology.* 2009; 384(2): 266–73.
5. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evolution* 2013; 30: 2725–9.
6. Bárcena-Panero A, Echevarría JE, Romero-Gómez MP, Royuela E, Castellanos A, González I, Fedele G. Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012; 35(2):173–9.

References

1. Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(7–8): 865–76.
2. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* 2012; 14(9): 672–83.
3. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 373579.
4. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology.* 2009; 384(2): 266–73.
5. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evolution* 2013; 30: 2725–9.
6. Bárcena-Panero A, Echevarría JE, Romero-Gómez MP, Royuela E, Castellanos A, González I, Fedele G. Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012; 35(2): 173–9.

Authors:

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 23 Filimonov ul., Minsk, 220114, Republic of Belarus.

Dziadziulia KL. Senior Researcher at the Laboratory of infection with the natural reservoir, Candidate of Biological Sciences.

Amvrosieva TV. Head of Laboratory of infection with the natural reservoir, Doctor of Medical Sciences, professor.

Poklonskaya NV. Senior Researcher at the Laboratory of infection with the natural reservoir, Candidate of Biological Sciences.

Bogush ZF. Researcher at the Laboratory of infection with the natural reservoir.

Zemlianski VA. Junior Researcher at the Laboratory of infection with the natural reservoir.

Loziuk SK. Junior Researcher at the Laboratory of infection with the natural reservoir

Об авторах:

ГУ «Республиканский научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии». Республика Беларусь, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23

Дедюля Константин Леонидович. Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, канд. биол. наук.

Амвросьева Тамара Васильевна. Заведующий лаборатории инфекций с природным резервуаром, д-р мед. наук, профессор.

Поклонская Наталья Владимировна. Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, канд. биол. наук.

Богущ Зоя Федоровна. Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром.

Землянский Вячеслав Андреевич. Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром.

Лозюк Светлана Константиновна. Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром.

Адрес для переписки: Дедюля Константин Леонидович; labsanvir@gmail.com

Поступила 06.08.2015 г.

Принята 18.08.2015 г.