

Применение метода гнездовой пцр в одной пробирке для диагностики краснухи

НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ

Для дифференциации краснухи среди других острых экзантемных заболеваний требуется лабораторное обследование больных. Разработан метод гнездовой ПЦР в одной пробирке, основанный на температурном разделении двух раундов реакции, для детекции вируса краснухи в клиническом материале. Метод является высоко специфичным и имеет такую же чувствительность, как стандартная гнездовая ПЦР. Преимуществом метода является также сокращение расхода реагентов и времени на постановку реакции.

Ключевые слова: краснуха, диагностика, ПЦР

Клинические симптомы, возникающие при краснухе, являются характерными и для ряда других инфекционных заболеваний. Сыпь, похожая на краснушную, может появляться и при инфекциях, вызываемых другими вирусами, например, вирусом кори, парвовирусом В19, вирусом герпеса человека 6-го типа, аденовирусом и энтеровирусами, вирус Экхо и вирус Коксаки [9]. Для дифференциации краснухи среди заболеваний со схожей клинической картиной требуется лабораторное обследование больных.

В настоящее время лабораторная диагностика краснухи основывается на выявлении специфических IgM антител в сыворотке крови больных. Однако в тех случаях, когда результаты серологических тестов являются неубедительными, применяют методы молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые также используют и для молекулярно-эпидемиологического исследования [5, 9].

Описаны в литературе и применяются ряд модификаций ПЦР для детекции вируса краснухи: классическая ПЦР [6], ПЦР с гибридизационной идентификацией продуктов амплификации [6], ПЦР со специфическим зондом TaqMan [4], гнездовая ПЦР [3, 4, 5, 8]. Наиболее широко для диагностики краснухи используется гнездовая ПЦР, которая заключается в амплификации в первом раунде реакции фрагмента кДНК, служащего матрицей для второго раунда. Однако работа с амплифицированным материалом может приводить к появлению ложноположительных результатов вследствие кросс-контаминации. Тем не менее, существует реальная возможность решить эту проблему с помощью постановки гнездовой ПЦР в одной пробирке. Данный метод разработан и применяется в отношении ряда патогенов [1, 7], однако до проведения настоящих исследований для детекции вируса краснухи он не использовался.

Материал и методы

Предварительный подбор и оценка пар праймеров осуществлялась с использованием компьютерной программы PrimerPremier 5.0. (Applied Biosystems) на основании нуклеотидной последовательности полного генома вакцинного штамма ТО-336 вируса краснухи, полученного из Международной генетической базы данных (код доступа АВ047329).

Оптимизация реакции проводилась с использованием штамма Wistar RA27/3M вируса краснухи, полученного из моновалентной живой аттенуированной вакцины Рудивакс (Авентис Пастер, Франция) с известным титром (3 lg ТЦД50/мл). Для определения специфичности реакции использовали вирусы краснухи трех генотипов (1E, 1G и 1h), вирус кори, вирус Экхо 6, аденовирус, парвовирус В19.

Исследованы образцы клинического материала (5 проб мочи и 15 носоглоточных мазков), собранные от 20 больных краснухой. Во всех случаях диагноз краснуха подтвержден лабораторно путем выявления в сыворотке крови специфических IgM антител к вирусу краснухи в иммуноферментной тест-системе производства Dade-Behring, Германия. Сбор проб проводился в течение 0-5 дней после появления сыпи, их хранение осуществлялось при температуре -200С.

Выделение РНК из клинических проб и из культуральной жидкости, содержащей вирусы краснухи, кори и Экхо 6, выполняли с использованием «TRI-reagent» (SigmaAldrich, США) согласно инструкции производителя. Набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Нидерланды) был использован для выделения нуклеиновых кислот из образцов, содержащих адено-и парвовирус В19, так как обеспечивает экстракцию как РНК, так и ДНК. Обратную транскрипцию проводили в объеме 20 мкл, реакционная смесь содержала 1 мкл фермента Superscript III (200 ед.), 0,5 мкл ингибитора РНКаз (20 ед.), 2 мкл 0,1М DTT, 4 мкл 5х буфера, 1 мкл 10мМ смеси дНТФ и 5 мкл 0,03 мкг/мл универсальных гексамеров (Invitrogen, Бельгия). В смесь вносили 1,5 мкл воды и 5 мкл выделенной РНК. Начальная денатурация и отжиг праймеров проводились без ферментов в течение 5 мин при 650С, обратная транскрипция – 80 мин при 550С. Детекцию РНК вируса краснухи в клинических пробах выполняли методом диагностической гнездовой ПЦР, описанным Eggerding A. с соавт. [3].

Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, рН 8,5 (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА) с добавлением бромистого этидия.

Результаты и обсуждение

Принцип метода гнездовой ПЦР в одной пробирке заключается в температурном разделении последовательных раундов реакции, что достигается использованием двух пар праймеров с различными температурами отжига. Так, первый раунд проводится при высокой температуре, когда на матрице способны отжигаться только наружные праймеры, во втором раунде при значительно более низкой температуре работают внутренние праймеры. Поэтому ключевым этапом разработки метода гнездовой ПЦР в одной пробирке являлся подбор праймеров. Подбор праймеров и оптимизация реакции. Подбор праймеров осуществлялся в соответствии со следующими критериями:

- праймеры должны локализоваться в пределах высоко консервативной области генома вируса краснухи для успешной детекции любого из 13 известных в настоящее время генотипов;
- наружная пара праймеров должна ограничивать фрагмент, величина которого не превышает 300 п.н. и позволяет подобрать соответствующую внутреннюю пару праймеров;
- температуры отжига наружной и внутренней пары должны иметь значительные различия для разделения первого и второго раундов амплификации;

- эффективность работы праймеров должна быть как можно более высокой для достижения максимальной чувствительности реакции.

Согласно результатам анализа нуклеотидных последовательностей 12 вирусов краснухи 8 различных генотипов, проведенного Zhou Y. С соавт., средний уровень варибельности генома составляет 7% [10]. Наиболее консервативным является 5'-конец генома, кодирующий метилтрансферазный домен неструктурного белка Р150 (позиции с 60 по 650), варибельность которого – 4%. Поэтому подбор праймеров проводился в пределах данного участка генома. Длина амплифицируемого фрагмента в работах разных авторов значительно варьирует: от 143 до 592 п.н. [3, 4, 5, 6, 8]. В том случае, когда размер ампликона составляет 300 п.н. и более, его секвенирование и последующий анализ позволяют предположить генотип вируса, однако для полноценного генетического анализа вируса фрагмент такой длины является недостаточным [9]. В диагностической ПЦР исследуется преимущественно клинический материал от больных, и анализ проводится, как правило, не в день забора пробы, поэтому существует вероятность деградации вирусных частиц и нарушения целостности вирусной РНК. В таких случаях с большей вероятностью будет синтезирован более короткий фрагмент (100-300 п.н.). Поэтому праймеры подбирались таким образом, чтобы размер ампликона не превышал 300 п.н. Эффективность работы праймеров оценивалась согласно таким критериям, как образование вторичных структур, димеров и кросс-димеров, неспецифическое связывание с матрицей, эффективность синтеза целевого продукта.

В наибольшей степени всем вышеуказанным условиям удовлетворяли две пары праймеров (табл. 1). Их основные характеристики приведены в таблице 2.

Таблица 1. Праймеры для постановки гнездовой ПЦР в одной пробирке

Название	Локализация в геноме	Последовательность, 5'-3'
176F1	176-198	5'-AAGCGGGCCATCGTAGCCGTGAT-3'
408R1	408-387	5'-GCGAGTTTGCGTGCCGTCCTGT-3'
192F2	192-207	5'-CCGTGATACCCAGACC-3'
311R2	296-311	5'-CGTGTAGGGCTTCTTT-3'

Таблица 2. Основные характеристики праймеров для постановки гнездовой ПЦР в одной пробирке

Праймер	Рейтинг	Tm	GC%	ΔG	Неспецифическое связывание			
					Шпильки, Д G	Димеры, Д G	Кросс-димеры, ΔG	С матрицей, Д G
176F1	52	68,9	56,5	-48,2	0,1	-9,3		-21,1
408R1	54	69,1	59,1	-46,6	-	-7,0		-22,7
192F2	78	40,3	56,3	-27,9	-0,5	-	-4,2	-13,9
311R2	100	44,7	50,0	-30,7	-	-		-

Анализ областей связывания праймеров в геноме разных генотипов вируса краснухи показал существование лишь единичных замен у некоторых вирусов в сравнении с последовательностью праймеров. В частности только один штамм 2В генотипа содержал 2 замены в пределах области связывания праймера 408R1, тогда как на остальные штаммы приходилось не более одной замены (штаммы генотипов 2А, 2В, 1С и 1В).

Оптимизация условий реакции включала поиск оптимальной температуры отжига для каждой пары праймеров, определение оптимального состава реакционной смеси, установление оптимальных количеств праймеров. В результате проведенных исследований был определен оптимальный состав реакционной смеси, включающий 60мМ ТрисHCl (pH8,5), 15мМ (NH₄)₂SO₄, 2,2 мМ MgCl₂, 200 мкмоль dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы.

Отличительной особенностью разработанного метода является температурное разделение двух раундов реакции. Если во время первого раунда реакции наружные праймеры используются не полностью, они способны отжигаться на матрице во втором раунде. Как результат, происходит синтез не только ампликонов наружных и внутренних пар праймеров, но и ампликонов, образующихся с одного наружного и одного внутреннего праймера. Появление таких продуктов реакции приводит к значительному снижению чувствительности реакции. Поэтому соотношение праймеров должно быть подобрано таким образом, чтобы наружные праймеры полностью использовались в ходе первого раунда. Исследования показали, что оптимальное соотношение праймеров составляет: по 0,25 пмоль на реакцию для праймеров 176F1 и 408R1 и по 25 пмоль – для 192F2 и 311R2.

Режим проведения гнездовой ПЦР, обеспечивающий наиболее эффективны синтез продукта определен следующим: 940С – 3 мин (начальная денатурация), 940С – 30 сек, 750С – 30 сек, 720С – 30 сек (1 раунд, 35 циклов), 940С – 30 сек, 520С – 30 сек, 720С – 30 сек (2 раунд, 40 циклов), 720С – 5 мин (заключительная элонгация).

Оценка чувствительности и специфичности. Для оценки чувствительности метода готовили последовательные 10-кратные разведения краснушной вакцины, содержание вируса в которой составляло 3 lg ТЦД₅₀/мл. Из каждого разведения выделяли РНК, проводили реакцию обратной транскрипции, и полученную кДНК использовали в качестве матрицы при постановке гнездовой ПЦР в одной пробирке. Положительные результаты были получены во всех разведениях до 10⁻⁴ включительно, что соответствует 0,1 ТЦД₅₀/мл вирусной РНК. Такая чувствительность реакции соответствует аналогичному показателю для диагностических гнездовых ПЦР, разработанных другими авторами [3, 5]. Специфичность праймеров определяли в реакции с использованием трех генотипов вирусов краснухи (1Е, 1G и 1h), циркуляция которых отмечалась в Республике Беларусь в 2004-2006 гг. [2], а также вирусов, вызывающих сходные с краснухой симптомы: вирус кори, парвовирус В19, Экхо 6, аденовирус. С помощью предложенного метода специфический ПЦР-продукт был получен только в пробах, содержащих вирус краснухи, что свидетельствует о его высокой специфичности и универсальности в отношении различных генотипов вируса краснухи (рис).

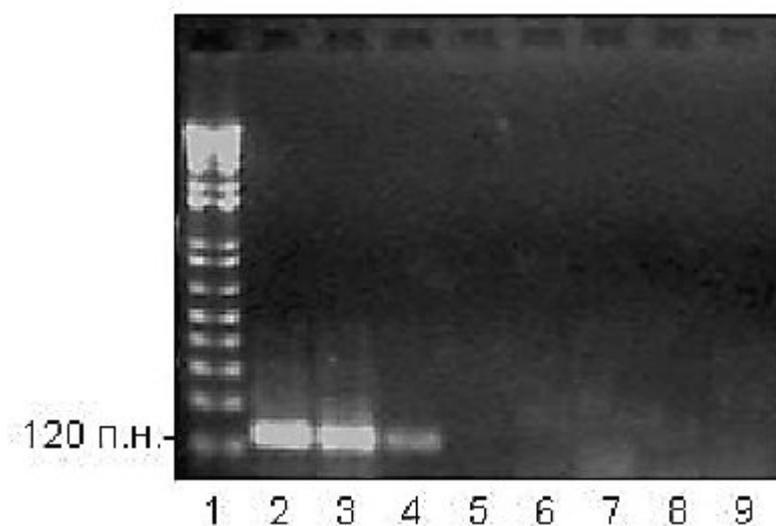


Рис. Оценка специфичности праймеров к вирусам, вызывающим экзантемные инфекции. 1 – весовой ДНК-маркер, 2-4 вирусы краснухи (генотипы 1Е, 1G и 1h, соответственно), 5 – парвовирус В19, 6 – вирус ЕСНО 6, 7 – вирус кори, 8 – аденовирус, 9 – отрицательный контроль.

С помощью гнездовой ПЦР в одной пробирке были проанализированы 20 клинических образцов (5 проб мочи и 15 носоглоточных мазков), собранных от больных с лабораторно подтвержденным диагнозом краснуха. Параллельно эти же образцы исследовали методом гнездовой ПЦР, описанным Eggerding F.A. с соавт. [3]. Вирусная РНК была выявлена в 5 пробах (25%) при исследовании методом гнездовой ПЦР и в 7 пробах (35%) – методом гнездовой ПЦР в одной пробирке. Совпадение результатов исследования наблюдалось для 5 проб, тогда как 2 пробы оказались положительными только в гнездовой ПЦР в одной пробирке. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода гнездовой ПЦР в одной пробирке для диагностики краснухи.

Выводы:

1. Разработанный нами метод гнездовой ПЦР в одной пробирке является надежным методом детекции вируса краснухи и обладает высокой чувствительностью и специфичностью.
2. При проведении первого и второго раундов реакции в одной пробирке, обеспечивается такая же низкая вероятность кросс-контаминации, как и в ПЦР в ее классической постановке в 1 раунд.
3. Преимуществом метода в сравнении с обычной гнездовой ПЦР является также сокращение расхода реагентов и времени на постановку реакции.

Литература

1. Поклонская, Н. В., Амвросьева, Т. В., Дьяконова, О. В. Модифицированный метод гнездовой ПЦР в одной пробирке для детекции энтеровирусов // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 4. С. 46 – 47.
2. Семейко, Г. В., Ермолович, М. А., Hubschen, J.M., Самойлович, Е. О., Muller, С. Р. Новые генотипы вируса краснухи, выявленные в Беларуси: изменения в международной классификации диких вирусов краснухи // Материалы Республ. науч.-практ. конф. «Вирусные и бактериальные инфекции: эпидемиология,

клиника, лабораторная диагностика и профилактика», 29-30 ноября 2007 г. Минск, 2007. С. 38 – 39.

3. Eggerding, F.A., Peters, J., Lee, R.K., Inderlied, C.B. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA // J. Clin. Microbiol. 1991. Vol. 29. № 5. P. 945 – 952.
4. Hubschen, J.M., Kremer, J.R., De Landtsheer, S., Muller, C.P. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus // J. Virol. Methods. 2008. Vol. 149. № 2. P. 246 – 250.
5. Jin, L., Thomas, B. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome // J. Med. Virol. 2007. Vol. 79. № 7. P. 1017 – 1024.
6. Johnstone, P., Bosma, T.J., Whitby, E.J., Best, J.M., Sanders, P.G. Detection of the 5' region of the rubella virus in clinical samples by polymerase chain reaction // Clin. Diagn. Virol. 1996. Vol. 5. P. 55 – 60.
7. Tan, W., Xia, N., Cong, Y. Identification of hepatitis C or/and G virus RNA in one tube by reverse transcription nested polymerase chain reaction // Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 1998. V. 12. № 2. P. 176 – 178.
8. Vyse, A.J., Jin, L. An RT-PCR assay using oral fluid samples to detect rubella virus genome for epidemiological surveillance // Mol. Cell. Probes. 2002. Vol. 16. № 2. P. 93 – 97.
9. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second ed. Geneva: WHO. 2006. 100 p.
10. Zhou, Y., Ushijima, H., Frey, T.K. Genomic analysis of diverse rubella virus genotypes // J. Gen. Virol. 2007. Vol. 88. P. 932 – 941.