

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-115-121

УДК 616.9:616-07

Е.Г. Фомина, Е.Е. Григорьева, А.С. Владыко

РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕТРОВИРУСНЫЕ ЧАСТИЦЫ: ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

Цель работы – разработка технологии получения положительных контрольных образцов на основе рекомбинантных ретровирусных частиц, а также ее применение при создании наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. **Материалы и методы.** Для выполнения исследований использованы молекулярно-биологические, генно-инженерные и иммунологические методы: полимеразная цепная реакция, рестрикция, лигирование, клонирование, трансформация, трансфекция и цитофлуориметрия. **Результаты и обсуждение.** Разработана и апробирована технология получения положительных контрольных образцов на основе рекомбинантных вирионов, включающая в себя создание генноинженерной конструкции на базе ретровирусного вектора с клонированной в него диагностической последовательностью вирусного генома; получение «пакующей» клеточной линии, продуцирующей химерные ретровирусные частицы; определение титра рекомбинантных вирионов методом проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции; использование полученного на их основе препарата в качестве положительного контрольного образца при ПЦР-диагностике инфекционного агента. Технология использования ретровирусных векторов как носителей фрагментов РНК-геномных вирусов применена при разработке тест-систем для ПЦР-диагностики опасных и особо опасных вирусных инфекций, что позволило повысить эксплуатационные качества диагностических наборов и исключить на этапе их производства работу с концентрированными инфекционными агентами, относящимися к 3 и 4 группам риска по классификации ВОЗ (вирусы Ласса, клещевого энцефалита, лимфоцитарного хориоменингита и возбудители геморрагической лихорадки с почечным синдромом).

Ключевые слова: РНК-содержащие вирусы, молекулярно-генетическая диагностика, рекомбинантные ретровирусные частицы, положительный контрольный образец.

Корреспондирующий автор: Фомина Елена Георгиевна, e-mail: feg1@tut.by.

Для цитирования: Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Владыко А.С. Рекомбинантные ретровирусные частицы: технология получения и использование в качестве положительных контрольных образцов для ПЦР-диагностики опасных вирусных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 2:115–121. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-115-121

Поступила 01.04.20. Отправлена на доработку 18.04.20. Принята к публ. 15.06.20.

E.G. Fomina, E.E. Grigorieva, A.S. Vladyko

Recombinant Retroviral Particles: Technology of Production and Application as Positive Controls for PCR Diagnostics of Dangerous Viral Infections

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

Abstract. Objective. Construction of positive control samples based on recombinant retroviral particles and their application in RT-PCR diagnostic assays for RNA detection of agents of dangerous and particularly dangerous viral infections. **Materials and methods.** Molecular biological, genetic engineering, and immunological methods were used: polymerase chain reaction, restriction, ligation, cloning, transformation, transfection, flow cytometry. **Results and discussion.** Technology of positive control samples producing based on recombinant virions has been developed and tested. It includes construction of retroviral vector with cloned diagnostic sequence of the viral genome; obtaining a packaging cell line producing chimeric retroviral particles; determination of recombinant virions titer by flow cytometry and polymerase chain reaction; application of the obtained preparation as a control sample for PCR diagnostics of infectious agents. Positive controls based on retroviral vectors as carriers of genomic RNA fragments of pathogenic viruses were used in the development of PCR diagnostic kits for dangerous and particularly dangerous viral infections. Their application increased the kits quality and made it possible to exclude the work with concentrated hazardous infectious agents (Lassa virus, tick-borne encephalitis virus, lymphocytic choriomeningitis virus, Puumala virus).

Key words: RNA-containing viruses; molecular-genetic diagnostics; recombinant retroviral particles; positive control

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena G. Fomina, e-mail: feg1@tut.by.

Citation: Fomina E.G., Grigorieva E.E., Vladyko A.S. Recombinant Retroviral Particles: Technology of Production and Application as Positive Controls for PCR Diagnostics of Dangerous Viral Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2020; 2:115–121. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-115-121

Received 01.04.20. Revised 18.04.20. Accepted 15.06.20.

Fomina E.G., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4664-4752>

Grigorieva E.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3919-0625>

Vladyko A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6927-5043>

Одним из основных методов молекулярной диагностики вирусных инфекций в последние годы стала полимеразная цепная реакция (ПЦР). Создание современных диагностических тест-систем для выявления геномов РНК-содержащих вирусов на основе метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) предполагает наличие в комплектации тест-системы положительного контрольного образца (ПКО).

В качестве положительных образцов могут быть использованы вирусосодержащие биологические жидкости, транскрибированные *in vitro* молекулы РНК, ампликоны генов-мишеней и др. Однако их применение в лабораторной практике ограничивается рядом факторов. Использование в качестве ПКО культуры выявляемого возбудителя предполагает периодическую работу с биологически активными инфекционными агентами, включающую такие опасные процедуры, как наработка биомассы, концентрирование и очистка вируса. При этом в наборах реагентов, предназначенных для выявления и идентификации возбудителей опасных и особо опасных инфекций, такой вариант ПКО значительно уменьшает возможность применения данных диагностикумов вне специализированных лабораторий. Положительные образцы на основе комплементарной ДНК не могут эффективно использоваться в указанном качестве, так как не обеспечивают контроль этапа выделения генетического материала и стадии обратной транскрипции, что повышает риск получения ложноотрицательных результатов. Нестабильность контрольных образцов на основе вирусной РНК при их хранении и транспортировании ввиду чувствительности к действию РНКаз значительно ограничивает возможность применения препаратов подобного типа [1–3].

В последнее время все большее предпочтение отдается генно-инженерным контролям, созданным на основе бактериофагов и вирусов животных [4, 5]. Такие контроли обладают рядом преимуществ: они безопасны в сравнении с биологическими жидкостями, содержащими патогены; позволяют контролировать процесс выделения генетического материала, практически имитируя выделение генома микроорганизма из природного материала; при необходимости дают возможность сравнительной количественной оценки содержания патогена в исследуемой пробе; потенциально их можно стандартизировать по количеству генов-мишеней. Получение генно-инженерных положительных образцов особенно актуально, когда речь идет о вирусных агентах, для которых не разработаны адекватные методы культивирования (гепатит С, ВИЧ), или о вирусных агентах, относящихся к 3 и 4 группам риска по современной классификации ВОЗ [6–9].

Как правило, генно-инженерные положительные контроли представляют собой рекомбинантные бактериофаги или вирусы, в геном которых клонированы диагностические гены-мишени. Примеры использования таких контролей многообразны: армированные

РНК на основе бактериофага M2 для молекулярно-генетической диагностики энтеровирусных [10, 11] и арбовирусных инфекций [12], ретровирусные частицы [13] и рекомбинантные вирионы на основе вируса гриппа для диагностики гепатита С [14], вирусоподобные частицы на базе лентивирусов для диагностики MERS-CoV [15] и лихорадки Эбола [7].

В целом, разработка положительных контролей, устойчивых к воздействию РНКаз и позволяющих максимально имитировать вирусную частицу, обеспечивая таким образом возможность контроля всех этапов исследования, остается актуальным вопросом при создании диагностических тестов для детекции РНК-содержащих вирусов.

Целью данного исследования являлась разработка технологии получения положительных контрольных образцов на основе рекомбинантных ретровирусных частиц и ее применение при создании наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом ОТ-ПЦР.

Материалы и методы

Все генно-инженерные манипуляции проводили с использованием коллекционного штамма *Escherichia coli* DH5 α (*supE44 lacU169 (f80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Трансформацию бактериальных клеток, выделение плазмидной ДНК, электрофоретический анализ фрагментов осуществляли согласно рекомендациям, приведенным в руководстве [16]; рестрикцию, лигирование плазмидной ДНК и фрагментов – в соответствии с условиями, рекомендуемыми изготовителем Thermo Scientific (США). Для выделения вирионной РНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Российская Федерация) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-Л» (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Российская Федерация) согласно прилагаемой инструкции. Для постановки ПЦР использовали Taq-полимеразу, десятикратный реакционный буфер, раствор MgCl₂, смесь дезоксинуклеотидов (Thermo Scientific, США), а также праймеры и гибридизационные зонды, синтезированные ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). ПЦР осуществляли на термоциклере Corbett Research (Corbett Life Sciences, Австралия), ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени – на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad, США). Для подбора праймеров и гибридизационных проб использовали программу Vector NTI.

«Пакующая» клеточная линия GP+env-AM12, продуцирующая ретровирусные вирионы с амфотропным спектром хозяев, а также линия клеток NIH 3T3, созданная на основе фибробластов мыши и используемая для определения биологического титра вируса, получены из Российской коллекции

клеточных культур позвоночных (PKKK П) (Санкт-Петербург, Российская Федерация). Клеточные линии культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ L-глутамина (Sigma, США), 100 ед/мл пенициллина (Sigma, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США) при температуре 37 °С и 5 % содержания CO₂.

Ретровирусный вектор вводили в «пакующую» клеточную линию GP+env-AM12 посредством полибренновой методики трансфекции. Для этого 4·10⁵ клеток «пакующей» линии помещали во флакон с площадью ростовой поверхности 25 см² за день до постановки эксперимента. На второй день среду культивирования заменяли 1 мл свежей среды, содержащей 10 мкг плазмидной ДНК, и инкубировали в течение 6 ч в присутствии 10 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Затем проводили химический «шок» в присутствии 20 % DMSO (Sigma, США) в течение 5 мин, далее клетки отмывали и помещали в свежую среду. На следующий день культуральную среду заменяли на селективную, содержащую 400 мкг/мл G418 (Sigma, США) (химический аналог неомицина). Клоны, устойчивые к антибиотику, изолировали на 12–14 день после трансфекции и размножали в монослое для последующего анализа.

Титр вируса определяли согласно модифицированному протоколу, описанному в статье D. Markowitz [17]. Культуральную жидкость, собранную от клонов клеток GP+env-AM12, трансфицированных ретровирусным вектором, центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g для удаления клеток и дебриса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса. Реципиентные клетки NIH 3T3 высевали с плотностью 3·10⁵ на 25 см² во флаконы за 24 ч до инфицирования. На второй день среду заменяли на 1 мл свежей среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена и аликвоты тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 2 ч, после чего среду заменяли на свежую. Количество клеток, экспрессирующих eGFP, анализировали спустя 72 ч после инфицирования с помощью проточного цитофлуориметра (BD Biosciences FACSCanto I, США). Титр вирусных частиц рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{титр вируса} = A \cdot B / 100 \cdot C,$$

где *A* – количество клеток в культуральном сосуде на момент инфицирования; *B* – количество флуоресцирующих клеток; *C* – корректирующий коэффициент, учитывающий разведение супернатанта, нанесенное на клетки.

Для определения титра ретровирусных частиц методом ОТ-ПЦР использовали набор реагентов «Универсальный РНК-стандарт с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени «Белар-РНК-стандарт-ПЦР/РВ» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь).

Результаты и обсуждение

При разработке диагностических тестов для выявления РНК-содержащих вирусов особое значение приобретает способ получения положительных контрольных образцов. Эти образцы должны содержать РНК-копию гена-мишени, желательна защищенная белковой оболочкой, и подвергаться всем основным этапам пробоподготовки: выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция. На наш взгляд, наиболее подходящим способом получения контрольных образцов является клеточный биосинтез «пакующей» линией рекомбинантных ретровирусных частиц, в геном которых встроен диагностический ген-мишень. Специфическая нуклеотидная последовательность в такой частице упакована в белковую оболочку, которая защищает ее от действия РНКаз, и представлена в диплоидной форме в виде РНК. Идея использования ретровирусных частиц как носителей генетической информации, обусловленная природной способностью ретровирусов встраиваться в геном клетки-хозяина в форме провируса и транскрибироваться в его составе, используя клеточную ферментативную систему, положена в основу создания высокотехнологичного способа получения РНК-стандартов. Данная технология апробирована при разработке диагностических тест-систем для выявления геномов возбудителей наиболее актуальных для Республики Беларусь природно-очаговых инфекций: геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) и клещевого энцефалита (КЭ), а также опасной геморрагической лихорадки Ласса, эндемичной для стран Африки.

Технологический процесс биосинтеза рекомбинантных ретровирусных частиц состоит из нескольких этапов. Первый этап связан с конструированием плазмидного вектора, объединяющего ретровирусную и бактериальную часть и содержащего кассеты регуляторных элементов, необходимых для успешной репликации его в про- и эукариотической клеточной системе, а также ген-мишень инфекционного агента.

Бактериальная часть конструкции включает плазмиду pBR322 и позволяет проводить все генно-инженерные манипуляции по клонированию и отбору рекомбинантных плазмид в бактериальном штамме *E. coli DH5a*. Достоинством плазмиды является тот факт, что ее репликация происходит независимо от клеточного цикла. Это позволяет получить большое количество копий плазмиды, что важно для последующих этапов клонирования. В состав вектора включен ген устойчивости к ампициллину, благодаря наличию которого возможна селекция бактериальных клонов при выращивании на среде с антибиотиком.

Ретровирусная часть получена на базе генома вируса лейкемии мышей Молони (MoMuLV), она содержит только цис-действующие последователь-

ности, необходимые для репликации (длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeat); Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; полипуриновый тракт – сайт инициации синтеза плюс-цепи ДНК (PPT, polyurine tract). По концам LTR расположены небольшие частично инвертированные повторы (att-сайты), необходимые для интеграции провируса в геном инфицированной клетки. В вектор встроены полилинкер, содержащий сайты гидролиза ферментов рестрикции.

В ретровирусную кассету вектора клонированы дополнительно две функционально значимые нуклеотидные последовательности: одна из них кодирует зеленый флуоресцирующий белок (*egfp*), другая – аминогликозид 3'-фосфотрансферазу (*neo*). Транскрипция каждого из этих белков происходит под контролем собственного промотора: зеленый флуоресцирующий белок транскрибируется с CMV-промотора (промотор ранних генов цитомегаловируса), ген *neo* – с 5'-промотора вируса лейкемии мышей Молони. Каждая из последовательностей несет свою функциональную нагрузку. Экспрессируемый белок eGFP позволяет оценить титр ретровирусных частиц с использованием цитофлуориметра, а аминогликозид 3'-фосфотрансфераза – селективировать рекомбинантные клеточные клоны на среде с антибиотиком.

Таким образом, в результате проведенных генно-инженерных манипуляций конструируется плазида, содержащая все необходимые элементы для успешной репликации как в бактериальной, так и в эукариотической системе, в полилинкер которой дополнительно клонируется диагностически значимый ген-мишень (рис. 1).

Для создания векторных конструкций pLCMV3' retro, pLassaretro, pTBE retro, pPUU retro, содержащих в качестве вставки диагностически значимые фрагменты генома вирусов ЛХМ, Ласса, КЭ и ГЛПС соответственно, определены, амплифицированы и клонированы в ретровирусный вектор вирусспецифические диагностические гены-мишени: фрагмент S-сегмента генома вируса ЛХМ (штамм Armstrong) размером 156 пар нуклеотидов (п.н.);

фрагмент L-сегмента генома вируса Ласса (198 п.н.); фрагмент гена NS5 вируса клещевого энцефалита (92 п.н.); фрагмент M-сегмента вируса Пуумала (365 п.н.).

На следующем этапе ретровирусные векторы с помощью полибреновой методики трансфекции вводили в клетки «пакующей» клеточной линии. «Пакующие» линии представляют собой перевиваемые клетки, в которых осуществляется синтез всех вирусспецифических белков, необходимых для формирования инфекционных ретровирусных частиц. В наших экспериментах использована клеточная линия GP+env-AM12, продуцирующая ретровирусные вирионы с амфотропным спектром хозяев [18].

В результате трансфекции сконструированными ретровирусными векторами клеток мышинных фибробластов GP+env-AM12 и их последующего культивирования на селективной среде получены клоны «пакующих» клеточных линий AM12 LCMV3' retro, AM12 Lassaretro, AM12 TBE retro, AM12 PUU retro, продуцирующие рекомбинантные ретровирусные частицы.

Супернатант «пакующей» клеточной линии содержит химерные ретровирусные вирионы, титр которых определяется с помощью инфицирования определенной дозой вируса индикаторной клеточной линии НИИ 3Т3 и последующего подсчета инфицированных клеток на проточном цитофлуориметре. Маркером, указывающим на инфицированность клеток, служит экспрессия в них зеленого флуоресцирующего белка. Количественной характеристикой титра вирусных частиц является количество флуоресцирующих клеток, подсчитанное с использованием метода проточной цитометрии. Проверенный таким образом инфекционный титр является точкой отсчета для определения физического титра (количество геном-эквивалентов гена-мишени в полученном образце положительного контроля), который может быть значительно выше по следующим причинам: геном ретровируса диплоидный; частицы могут быть дефектными и не инфицировать индикаторные клетки, но содержать репортерный ген. Физический титр определяется экспериментально с использованием

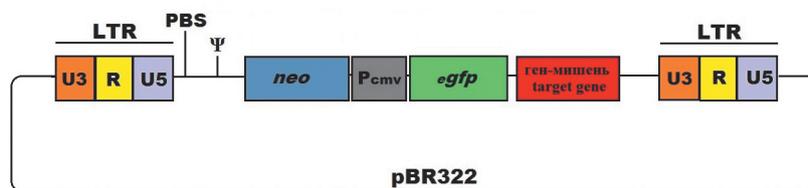


Рис. 1. Структура ретровирусного вектора:

LTR (long terminal repeat) – длинные концевые повторы, включающие U3, R, U5 районы вирусного генома; PBS (primer binding site) – сайт связывания т-РНК затравки; Ψ – область упаковки-димеризации вирусного генома; *neo* – нуклеотидная последовательность, кодирующая аминогликозид 3'-фосфотрансферазу; P_{CMV} – промотор ранних генов цитомегаловируса человека; *egfp* – ген, кодирующий белок eGFP (enhanced green fluorescent protein); *ген-мишень* – фрагмент ДНК диагностически значимого участка вирусного генома

Fig. 1. Retroviral vector structure:

LTR – long terminal repeat including U3, R, U5 regions; PBS – primer binding site; Ψ – extended retroviral packaging signal; *neo* – neomycin phosphotransferase gene; P_{CMV} – human cytomegalovirus (CMV) early promoter region; *egfp* – enhanced green fluorescent protein gene; *target gene* – diagnostically significant DNA fragment of the viral genome

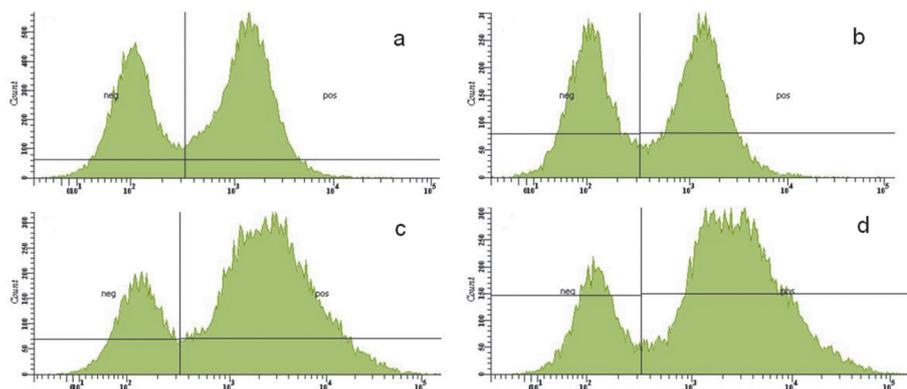


Рис. 2. Определение количества флуоресцирующих клеток индикаторной клеточной линии, инфицированных ретровирусными частицами, содержащимися в культуральной жидкости «пакующих» клеточных линий AM12 LCMV3' retro (a), AM12 Lassaretro (b), AM12 TBEretro (c), AM12 PUUretro (d)

Fig. 2. Quantification of fluorescent indicator cells infected with retroviral particles from culture medium of packaging cell lines AM12 LCMV3' retro (a), AM12 Lassaretro (b), AM12 TBEretro (c), AM12 PUUretro (d)

молекулярно-генетических методов путем десятикратного титрования супернатанта клеточной линии с последующим выделением РНК, постановкой ОТ-ПЦР. Мишенью для проведения ПЦР в режиме реального времени служит нуклеотидная последовательность гена *egfp*, содержащаяся в ретровирусном векторе. Таким образом, биологический титр ретровирусных частиц оценивался как по экспрессии белка, так и по наличию нуклеотидной последовательности гена-мишени в составе рекомбинантной частицы в культуральной жидкости.

Инфекционный титр ретровирусных частиц, продуцируемых клеточными клонами «пакующих» линий AM12 LCMV3' retro, AM12 Lassaretro, AM12 TBEretro, AM12 PUUretro, изучен с использованием индикаторной линии NIH 3T3 с помощью проточного цитофлуориметра по флуоресцентному сигналу зеленого флуоресцирующего белка. Его значение для отдельных клеточных клонов составило от $1,4 \cdot 10^5$ до $4,7 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Репрезентативные результаты экспериментов представлены на рис. 2.

В связи с тем, что диагностически значимый вирусный репортерный ген находится в составе одной кассеты с *egfp*, количество геном-эквивалентов, определяемое относительно стандартных разведений плазмидной ДНК, содержащей его нуклеотидную последовательность, приблизительно рав-

но значению физического титра рекомбинантных частиц. Пример определения количества геном-эквивалентов гена-мишени вируса ЛХМ в образце культуральной жидкости «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3' retro представлен на рис. 3.

Стабильная продукция рекомбинантных вирионов «пакующими» линиями позволяет стандартизировать процесс получения положительных контрольных образцов K^{+LCMV} ОТ-ПЦР, K^{+LAS} ОТ-ПЦР, K^{+TBE} ОТ-ПЦР, K^{+PUU} ОТ-ПЦР при комплектации диагностических тест-систем для выявления генетического материала опасных и особо опасных вирусов: «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ», «Белар-БУНИА-ФЛАВИ-ФИЛО-АРЕНА-ПЦР», «Белар-КИ-ПЦР/РВ» и «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ».

Полученные клеточные линии депонированы в Специализированную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека, созданную в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (номера депонентов: 27/14 AM12 PUUretro, 28/14 AM12 TBEretro, 29/14 AM12 Lassaretro и 30/14 AM12 LCMV3' retro), и могут эффективно применяться на протяжении многих лет, не требуя проведения дополнительных генно-инженерных манипуляций.

Исследования по оценке свойств положительных контрольных образцов K^{+LCMV} ОТ-ПЦР, K^{+LAS} ОТ-ПЦР, K^{+TBE} ОТ-ПЦР и K^{+PUU} ОТ-ПЦР показали их относительную стабильность в условиях продолжи-

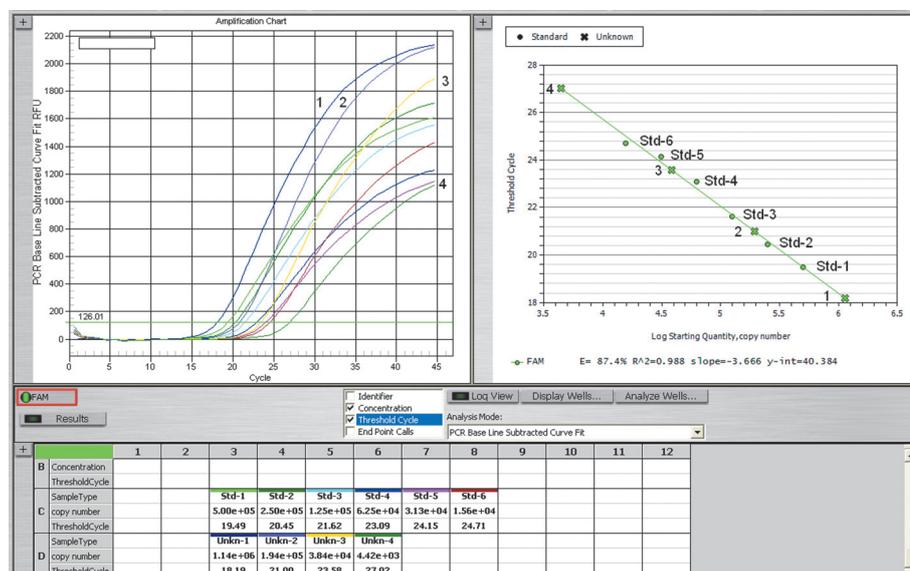


Рис. 3. Оценка количества геном-эквивалентов гена-мишени вируса ЛХМ в культуральной жидкости «пакующей» клеточной линии AM12 LCMV3' retro методом ОТ-ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени:

Std 1-6 – двукратные разведения плазмидной ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность гена *egfp*, с известным количеством копий генетического материала; *1-4* – серийные разведения образца культуральной жидкости «пакующей» линии AM12 LCMV3' retro

Fig. 3. Evaluation of LCMV target gene copies in packaging cell line AM12 LCMV3' retro culture medium by real time RT-PCR:

Std 1-6 – two-fold dilutions of plasmid DNA containing *egfp* nucleotide sequence with determined number of genetic material copies; *1-4* – serial dilutions of AM12 LCMV3' retro culture medium sample

Стабильность положительных контрольных образцов на основе рекомбинантных ретровирусных частиц при различных условиях хранения

Stability of positive control samples based on recombinant retroviral particles under various storage conditions

Условия хранения Storage conditions	Срок хранения Storage period	ΔCt K ^{+LCMV} ОТ-ПЦР K ^{+LCMV} RT-PCR	ΔCt^* K ^{+LAS} ОТ-ПЦР K ^{+LAS} RT-PCR	ΔCt K ^{+TBE} ОТ-ПЦР K ^{+TBE} RT-PCR	ΔCt K ^{+PUU} ОТ-ПЦР K ^{+PUU} RT-PCR
-70 °C	1 год 1 year	0.01	0.01	0.02	0.01
	2 года 2 years	0.05	0.03	0.08	0.08
	3 года 3 years	0.17	0.23	0.19	0.16
	4 года 4 years	0.51	0.64	0.60	0.62
-20 °C	1 месяц 1 month	-0.01	0.02	-0.01	0.01
	6 месяцев 6 months	0.04	-0.02	0.05	0.02
	12 месяцев 12 months	0.12	0.11	0.09	0.09
+4 °C	8 часов 8 hours	0.03	0.02	0.01	-0.02
	16 часов 16 hours	0.14	0.08	0.17	0.10
	24 часа 24 hours	0.36	0.24	0.18	0.22

* – образцы исследованы методом ОТ-ПЦР с использованием набора реагентов «Белар-РНК-стандарт-ПЦР/РВ»; результаты представлены как среднее значение полученной для трех независимых экспериментов разницы в пороговом цикле (ΔCt) по сравнению с образцами, подвергнутыми однократному кратковременному замораживанию при -70 °C.

* – samples were assessed by RT-PCR with Belar-RNA-standard PCR real-time kit; the results are presented as the average value of the difference in the threshold cycle (ΔCt) obtained for three independent experiments compared to samples subjected to a single short-term freezing at -70 °C.

тельного хранения при -70 °C, сохранность эксплуатационных характеристик в пределах срока годности тест-систем при соблюдении соответствующих требований (12 мес., -20 °C), а также при моделировании условий, применяемых в случае транспортирования диагностических наборов (24 ч, +4 °C). Результаты исследований представлены в таблице.

Технология использования ретровирусных векторов как носителей фрагментов РНК-геномных патогенных вирусов на примере четырех РНК-содержащих вирусов, относящихся к разным семействам, является доказательством того, что описанные подходы могут использоваться при разработке современных тест-систем для ПЦР-диагностики широкого спектра вирусов, генетический материал которых представлен молекулой РНК.

Технология получения положительных контролей на основе рекомбинантных молекул дает возможность значительно улучшить молекулярно-генетическую диагностику РНК-содержащих вирусов, адекватно оценить эффективность реакции как на стадии разработки диагностического теста, так и при его коммерческом использовании. Данный подход к получению положительных контрольных образцов приобретает особую значимость в тех случаях, когда речь идет об опасных, особо опасных и вновь возникающих вирусных инфекциях, а также патогенных РНК-содержащих вирусах, для которых не найдены адекватные способы культивирования. Вместе с тем предложенная технология в случае

экстремальной ситуации при необходимости неотложной диагностики позволяет использовать искусственно синтезированные ДНК-фрагменты геномов вирусов, не имея их в наличии, и получать их РНК-копии.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Маношкин А.В., Петров А.А., Мельников Д.Г., Пантюхин В.Б., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3:41–4.
2. Петров А.А., Лебедев В.Н., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., Сизикова Т.Е., Пышная Н.С., Павельев Д.И., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Использование генно-инженерных конструкций в качестве контрольных образцов при оценке наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6):372–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-6-372-375.
3. Mikel P., Vasickova P., Kralik P. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens. *Food Environ. Virol.* 2015; 7(2):96–111. DOI: 10.1007/s12560-015-9188-2.
4. Ninove L., Nougairède A., Gazin C., Thirion L., Delogu I., Zandotti C., Charrel R.N., De Lamballerie X. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One*. 2011; 6(2):e16142. DOI: 10.1371/journal.pone.0016142.
5. Wen A., Steinmetz N. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45(15):4074–126. DOI: 10.1039/c5cs00287g.
6. Fu Y., Wang G., Wu Q., Yang X., Zhang R., Zhang K., Lin

- G., Han Y., Bao L., Li Z., Li J. Preparation of MS2-based nanoparticles as control and standard materials for the molecular detection of Dengue virus serotypes. *Virus Res.* 2017; 233:42–50. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.02.011.
7. Mattiuzzo G., Ashall J., Doris K.S., MacLellan-Gibson K., Nicolson C., Wilkinson D.E., Harvey R., Almond N., Anderson R., Efstathiou S., Minor P.D., Page M. Development of lentivirus-based reference materials for Ebola virus nucleic acid amplification technology-based assays. *PLoS One.* 2015; 10(11):e0142751. DOI: 10.1371/journal.pone.0142751.
8. Dedkov V., Magassouba N., Safonova M., Naydenova E., Ayginin A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A., Camara J., Kritziy A., Tuchkov I., Shchelkanov M., Maleev V. Development and evaluation of a one-step quantitative RT-PCR assay for detection of Lassa virus. *J. Virol. Methods.* 2019; 271:113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674.
9. Gholami M., Ravanshad M., Baesi K., Samiee S., Rozbahani N., Mohraz M. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology. *Iran Biomed J.* 2018; 22(6):394–400. DOI: 10.29252/22.6.394.
10. Землянский В.А., Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. Векторная конструкция для накопления армированной РНК. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук.* 2015; 2:19–22.
11. Mikel P., Vasickova P., Tesarik R., Malenovska H., Kulich P., Vesely T., Kralik P. Preparation of MS2 phage-like particles and their use as potential process control viruses for detection and quantification of enteric RNA viruses in different matrices. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1911. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01911.
12. Borghetti I., Zambenedetti M., Requião L., Vieira D., Krieger M., Pontello Rampazzo R. External control viral-like particle construction for detection of emergent arboviruses by real-time reverse-transcription PCR. *BioMed Res. Int.* 2019; 2019:2560401. DOI: 10.1155/2019/2560401.
13. Куликов С.М., Судариков А.Б., Глинщикова О.А. Внутренний стандарт на основе ретровирусного вектора для определения вируса гепатита С в конкурентной полимеразной цепной реакции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2004; 6:84–8.
14. Wang X., Liu F., Jiang L., Bao Y., Xiao Y., Wang H. Use of chimeric influenza viruses as a novel internal control for diagnostic rRT-PCR assays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 100(4):1667–76. DOI: 10.1007/s00253-015-7042-y.
15. Zhou D., Li Y., Li J., Yu J., Yang H., Wei H. Construction of lentivirus-based reference material for RT-PCR detection of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus and its application in external quality assessment. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019; 19(9):5510–16. DOI: 10.1166/jnn.2019.16591.
16. Sambrook J., Russell D.W., editors. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: in 3 vol. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Vol. 1. 749 p.
17. Markowitz D., Goff S., Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology.* 1988; 167(2):400–6. PMID: 2462307.
18. Markowitz D., Goff S., Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 1988; 62(4):1120–4. PMID: 2831375 PMCID: PMC253118.
4. Ninove L., Nougairede A., Gazin C., Thirion L., Delogu I., Zandotti C., Charrel R.N., De Lamballerie X. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One.* 2011; 6(2):e16142. DOI: 10.1371/journal.pone.0016142.
5. Wen A., Steinmetz N. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem. Soc. Rev.* 2016; 45(15):4074–126. DOI: 10.1039/c5cs00287g.
6. Fu Y., Wang G., Wu Q., Yang X., Zhang R., Zhang K., Lin G., Han Y., Bao L., Li Z., Li J. Preparation of MS2-based nanoparticles as control and standard materials for the molecular detection of Dengue virus serotypes. *Virus Res.* 2017; 233:42–50. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.02.011.
7. Mattiuzzo G., Ashall J., Doris K.S., MacLellan-Gibson K., Nicolson C., Wilkinson D.E., Harvey R., Almond N., Anderson R., Efstathiou S., Minor P.D., Page M. Development of lentivirus-based reference materials for Ebola virus nucleic acid amplification technology-based assays. *PLoS One.* 2015; 10(11):e0142751. DOI: 10.1371/journal.pone.0142751.
8. Dedkov V., Magassouba N., Safonova M., Naydenova E., Ayginin A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A., Camara J., Kritziy A., Tuchkov I., Shchelkanov M., Maleev V. Development and evaluation of a one-step quantitative RT-PCR assay for detection of Lassa virus. *J. Virol. Methods.* 2019; 271:113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674.
9. Gholami M., Ravanshad M., Baesi K., Samiee S., Rozbahani N., Mohraz M. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology. *Iran Biomed J.* 2018; 22(6):394–400. DOI: 10.29252/22.6.394.
10. Zemlyansky V.A., Dedyulya K.L., Poklonskaya N.V., Amvros'eva T.V. [Vector design for accumulation of reinforced RNA]. *Vestnik Natsional'noi Akademii Nauk Belarusi [Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Science series].* 2015; 2:19–22.
11. Mikel P., Vasickova P., Tesarik R., Malenovska H., Kulich P., Vesely T., Kralik P. Preparation of MS2 phage-like particles and their use as potential process control viruses for detection and quantification of enteric RNA viruses in different matrices. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1911. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01911.
12. Borghetti I., Zambenedetti M., Requião L., Vieira D., Krieger M., Pontello Rampazzo R. External control viral-like particle construction for detection of emergent arboviruses by real-time reverse-transcription PCR. *BioMed Res. Int.* 2019; 2019:2560401. DOI: 10.1155/2019/2560401.
13. Kulikov S.M., Sudarikov A.B., Glinshchikova O.A. [Internal standard on the basis of retroviral vector for the detection of Hepatitis C virus in competitive polymerase chain reaction]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 2004; 6:84–8.
14. Wang X., Liu F., Jiang L., Bao Y., Xiao Y., Wang H. Use of chimeric influenza viruses as a novel internal control for diagnostic rRT-PCR assays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 100(4):1667–76. DOI: 10.1007/s00253-015-7042-y.
15. Zhou D., Li Y., Li J., Yu J., Yang H., Wei H. Construction of lentivirus-based reference material for RT-PCR detection of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus and its application in external quality assessment. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019; 19(9):5510–16. DOI: 10.1166/jnn.2019.16591.
16. Sambrook J., Russell D.W., editors. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: in 3 vol. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Vol. 1. 749 p.
17. Markowitz D., Goff S., Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology.* 1988; 167(2):400–6. PMID: 2462307.
18. Markowitz D., Goff S., Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 1988; 62(4):1120–4. PMID: 2831375 PMCID: PMC253118.

References

1. Syzykova T.Ye., Melnikova Ye.V., Manoshkin A.V., Petrov A.A., Melnikov D.G., Pantyukhov V.B., Lebedev V.N., Borisevitch S.V. The application of external and internal control objects in case of using of polymerase chain reaction and reverse transcription of polymerase chain reaction *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics].* 2013; 3:41–4.
2. Petrov A.A., Lebedev V.N., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Sizikova T.E., Pyshnaya N.S., Paveliev D.I., Kutaev D.A., Borisevich S.V. The use of genetic engineering constructions as control samples on evaluation of diagnostic kits for reveal of RNA of hazard and extremely hazard agents of virus infections by reverse transcription - polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics].* 2018; 63(6):372–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-6-372-375.
3. Mikel P., Vasickova P., Kralik P. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens. *Food Environ. Virol.* 2015; 7(2):96–111. DOI: 10.1007/s12560-015-9188-2.

Authors:

Fomina E.G., Grigorieva E.E., Vladko A.S. Republican Research and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, 23, Filimonova St., Minsk, 220114, Republic of Belarus. E-mail: feg1@tut.by.

Об авторах:

Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Владыко А.С. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии. Республика Беларусь, Минск, ул. Филимонова, 23. E-mail: feg1@tut.by.