

Р.А.Максютов

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ВИДОСПЕЦИФИЧНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ОСПЫ КОРОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». п. Кольцово, Российская Федерация

Цель. Разработка и апробация метода видоспецифичной детекции вируса оспы коров (ВОК). **Материалы и методы.** В работе использованы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды для родоспецифичной детекции ортопоксвирусов (ОПВ) и видоспецифичной детекции вирусов оспы коров и экстромелии (ВЭ). Пары флуоресцентных красителей и соответствующих тушителей флуоресценции вводили в зонды в соответствии с их специфичностью: ОПВ-специфичный зонд содержал пару FAM/BHQ1, ВОК-специфичный зонд – JOE/BHQ1, ВЭ-специфичный зонд – Cy5/BHQ3. Для определения чувствительности и специфичности метода видоспецифичной детекции вируса оспы коров исследованы образцы 68 различных штаммов ортопоксвирусов. **Результаты и выводы.** Реализован комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров за счет использования мультиплексного варианта ПЦР в реальном времени для одновременной мультилокусной детекции на основе трех независимых генов-мишеней вируса оспы коров, родоспецифичной детекции для исключения ложноотрицательных результатов и дополнительных олигонуклеотидных праймеров и зонда, обеспечивающих специфичную детекцию вируса экстромелии, с целью исключения ложноположительных результатов.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, вирус оспы коров, вирус экстромелии, ПЦР в реальном времени.

Корреспондирующий автор: Ринат Амирович Максютов, e-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

R.A.Maksyutov

Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation

Objective of the study is to develop and validate the method for species-specific detection of cowpox virus (CPV). **Materials and methods.** Utilized were oligonucleotide primers and fluorescence-labeled probes for genus-specific detection of orthopoxviruses (OPV) and species-specific detection of cowpox and ectromelia viruses (EV). Pairs of fluorescent dyes and corresponding fluorescence extinguishers were embodied into probes in accordance with their specificity: OPV-specific probe contained FAM/BHQ1 pair, CPV-specific probe – JOE/BHQ1, and EV-specific – Cy5/BHQ3. For evaluation of sensitivity and specificity of the method for species-specific detection of CPV, investigated were samples of 68 different strains of orthopoxviruses. **Results and conclusions.** Implemented was complex approach to species-specific detection of CPV using multiplex real-time PCR variant for simultaneous multilocus detection on the basis of three independent target genes of CPV, to genus-specific detection for the exclusion of false-negative results, and additional oligonucleotide primers and probes, providing for specific detection of EV, aimed at the exclusion of false-positive results.

Key words: orthopoxviruses, cowpox virus, ectromelia virus, real-time PCR.

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

Corresponding author: Rinat A. Maksyutov, e-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

Citation: Maksyutov R.A. Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:60–63. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-60-63

Оспа коров – зоонозная инфекция, вызываемая вирусом оспы коров (ВОК), естественным хозяином которого является широкий круг представителей отряда грызунов [12]. Как правило, оспа коров вызывает доброкачественные местные повреждения [2], в редких случаях может приводить к генерализации инфекции [1] и смертельным случаям [15]. ВОК относится к роду *Orthopoxvirus* (ОПВ) семейства *Poxviridae* наравне с другими патогенными для человека вирусами натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО) и осповакцины (ВОВ).

В 1980 г., учитывая наличие тяжелых поствакцинальных осложнений при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации натуральной оспы, вакцинацию против данной инфекции Всемирная Организация Здравоохранения

(ВОЗ) рекомендовала в дальнейшем не проводить. Последующее прекращение вакцинации против оспы создало опасную ситуацию, когда человеческая популяция с каждым годом становится все более беззащитной не только перед возможным инфицированием ВНО в результате тиракта или возникновения вируса в природе, но и перед заражением другими близкородственными ортопоксвирусами, такими как ВОО или ВОК. Необычно многочисленные вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей стали в последние годы регистрировать в различных географических регионах, вызываемых ВОК [4, 6, 7, 10], ВОВ [14] и ВОО [11]. Поэтому не вызывает сомнений актуальность разработки современных экспресс-методов детекции патогенных для человека ортопоксвирусов.

Ранее были разработаны методы на основе ПЦР в реальном времени для детекции ВОК [5] и одно-временной детекции и дифференциации всех патогенных для человека ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК и ВОВ) [13]. В обоих методах мишенью для детекции ВОК являлся район OPT D11L ВОК. В 2011 г. D.S.Caroll *et al.* обнаружили протяженные делеции в OPT D11L двух штаммов вируса оспы коров – Austria_1999 (HQ407377) и Norway_1994_MAN (HQ420899) [3]. Проведенный теоретический анализ показал, что ДНК данных штаммов не должна детектироваться разработанными методами, использующими OPT D11L в качестве мишени для ВОК. И действительно, при экспериментальной проверке ДНК 47 штаммов ВОК, в которую также входили штаммы Austria_1999 и Norway_1994_MAN, только 39 из 47 штаммов смогли быть успешно детектированы разработанным методом [8]. При этом наличие ортопоксвирусной ДНК во всех 47 образцах было доказано с помощью разработанной родоспецифичной методики на основе ПЦР в реальном времени. В результате углубленного изучения района OPT D8L-D11L была выбрана новая комбинация праймеров и гибридизационного зонда, нацеленная на ВОК-специфичный район D8L. Последующий анализ показал специфическую детекцию 46 из 47 ДНК штаммов, включая Austria_1999 и Norway_1994_MAN [8].

По современным данным, вирус оспы коров в силу своей гетерогенности является не одним видом, а представляет собой обобщенное название нескольких (до пяти) независимых видов [3, 4], что всегда будет сохранять вероятность появления генетически отличного штамма ВОК, который сможет избежать выявления с помощью одиночного видоспецифичного метода детекции. В настоящей работе предлагается новый комплексный подход к видоспецифичной и надежной детекции ВОК.

Материалы и методы

Вирусная ДНК. В работе использовали расширенную панель образцов ДНК ортопоксвирусов (ВОК – 47, ВНО – 13, ВОО – 2, ВОВ – 3, вирус экстремелии (ВЭ) – 2, вирус оспы верблюдов (ВОВр) – 1 штамм) и других вирусных агентов (вирусы миксомы кроликов, оспы кур, ветряной оспы и простого герпеса I и II типа) [8, 9].

Дизайн праймеров и зондов. Выбор видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченных зондов проводили на основе выровненных с помощью программ BioEdit v.7.0 и Muscle v.3.6 нуклеотидных последовательностей всех доступных геномов ортопоксвирусов. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов анализировали, используя программу Oligo v.6.0, и проверяли на отсутствие гомологии с известными нуклеотидными последовательностями с помощью программы BLAST. Пары флуоресцентных красителей и соответствующих тушителей флуорес-

ценции вводили в зонды в соответствии с их специфичностью: родоспецифичный зонд содержал пару FAM/ВНQ1, ВОК-специфичный зонд – JOE/ВНQ1, ВЭ-специфичный зонд – Cy5/ВНQ3 (таблица).

ПЦР в реальном времени. ПЦР-анализ с выщеплением 5'-концевой метки (TaqMan формат) проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, USA). 25 мкл реакционной смеси содержало 2,5 мкл 10x TaqMan® Buffer A, 200 мкМ dNTP, 5 мМ MgCl₂, олигонуклеотидные праймеры (300 нМ каждого), гибридизационные зонды (250 нМ каждого), 0,5 ед. AmpliTaq Gold® DNA polymerase, и 1 мкл раствора анализируемой ДНК. ПЦР с измерением интенсивности флуоресценции проводили по следующему протоколу: 10 мин при 95 °С и далее 45 циклов по 15 с при 95 °С и 1 мин при 63 °С.

Результаты и обсуждение

Одним из вариантов решения проблемы надежной видоспецифичной детекции ВОК и отсутствия ложноотрицательных результатов является мультилокусный подход. В этом случае в каждом индивидуальном локусе ВОК-специфичные праймеры/зонд не обязательно должны детектировать все известные штаммы ВОК – достаточно добиться детекции каждого штамма хотя бы по одному–двум локусам. Такой подход значительно повысит количество подходящих видоспецифичных районов с учетом высокой гетерогенности и кластеризации по нескольким отдельным группам известных геномов ВОК [3].

Для многих ВОК-специфичных районов генома (не имеющих гомологии с геномами других патогенных для человека ортопоксвирусов) оказывается невозможным выбор олигонуклеотидов, не выявляющих ДНК ВЭ (непатогенный для человека ортопоксвирус). С точки зрения целевого предназначения разрабатываемого метода – анализ клинических образцов человека, отсутствие возможности дифференцировать ВОК от ВЭ не является недостатком, однако это необходимо учесть для расширения арсенала средств, подходящих для детекции ДНК ортопоксвирусов. Решение данной задачи может быть реализовано за счет одновременного использования ВЭ-специфичных и ВОК-специфичных олигонуклеотидов. Тогда при отсутствии ВЭ-специфичного сигнала и наличии сигнала для флуорофорного красителя, специфичного ВОК, можно будет идентифицировать образец как вирус оспы коров.

Альтернативно, для усиления надежности одновременно с ВОК-специфичными олигонуклеотидами целесообразно использовать родоспецифичную диагностику в одной пробирке. В таком случае, даже если будет получен ложноотрицательный результат по детекции ВОК, всегда будет идентифицирована ортопоксвирусная ДНК в образце за счет использования высококонсервативного района, и данный образец сможет быть охарактеризован последующим

Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды для родоспецифичной детекции ортопоксвирусов и видоспецифичной детекции ВОК и ВЭ

Мишень	Название	Последовательность олигонуклеотидов, 5'-3'	Краситель / тушитель
ОПВ-С8L	OPV_C8L_probe	TTCCGAATGAATGTTTTCATATGGCC	FAM/ВНQ1
	OPV_C8L_upper	GATAGTTTTTTTCATTAATCTTTAACAAT	
	OPV_C8L_lower	GGCTAGATGTTTCTACGGATTTC	
ВОК-D8L	CPXV_D8L_probe	AAGTCATCTACTACATAGACCATGATCAACCAA	JOE/ВНQ1
	CPXV_D8L_upper	GGTAGGTTTCATGTTGGAAAATATC	
	CPXV_D8L_lower	AAGATGTTATTAGTGGTATTAGAGAGAAAT	
ВОК-D11L	CPXV_D11L_probe	CCACAATCAGGATCTGTAAGCGGAGC	JOE/ВНQ1
	CPXV_D11L_upper	AAAACCTCTCCACTTTCATCTTCT	
	CPXV_D11L_upper2	GATCTTCTTTCAATGGTAGGATTATA	
	CPXV_D11L_lower	GCATTCAGATACGGATACTGATTC	
ВОК-K2R	CPXV_K2R_probe	CATCCATTCCTAATCATATCCCACGTG	JOE/ВНQ1
	CPXV_K2R_upper	GCGATCCTGGAATGTATAT	
	CPXV_K2R_lower	CTCTGTCTGTGTGTTACTA	
ВЭ-EVM001	ECTV_EVM001_probe	AATGCCGTACATTGGAGAGACGCTA	Cy5/ВНQ3
	ECTV_EVM001_upper	CATGAGTGATGGCTGGAGATT	
	ECTV_EVM001_lower	AAACACAGTGAATGCTCGGTT	

секвенированием.

С учетом обобщения вышеобозначенных подходов был разработан мультиплексный вариант ПЦР в реальном времени (таблица) для одновременной родоспецифичной детекции на основе ОПТ С8L, ВОК-специфичной детекции на основе ОПТ D8L, D11L [8] и K2R (рис. 1) и ВЭ-специфичной детекции на основе ОПТ EVM001 (рис. 2). Разработанный вариант ВЭ-специфичной детекции на основе уникального для ВЭ района позволит эффективно дифференцировать данный вирусный агент относительно штаммов ВОК. Следует отметить, что олигонуклеотиды к району ОПТ K2R являются более ВОК-специфичными в сравнении с методом на основе ОПТ D8L за счет наличия двух нуклеотидных замен в области, комплементарной гибридационному зонду CPXV_K2R_probe, для ВЭ (рис. 1).

В состав гибридационных зондов включили различные флуоресцентные красители и тушители флуоресценции для возможности проведения ПЦР в мультиплексном формате: для ОПВ-специфичного

зонда – FAM/ВНQ1, трех вариантов ВОК – JOE/ВНQ1 и ВЭ – Cy5/ВНQ3.

Последующий анализ на панели ДНК различных штаммов ортопоксвирусов, включая ВОК, ВНО, ВОО, ВОВ, ВЭ и ВОВр (суммарно, 68 штаммов) и других вирусных агентов, включая вирусы миксомы кроликов, оспы кур, ветряной оспы и простого герпеса I и II типов, показал абсолютную ВОК-специфичность и адекватность интерпретации полученных результатов.

В настоящее время предложенный комплексный подход для надежной детекции различных гетерогенных штаммов вируса оспы коров применяется в Сотрудничающем Центре ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музее штаммов и ДНК вируса оспы при ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

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

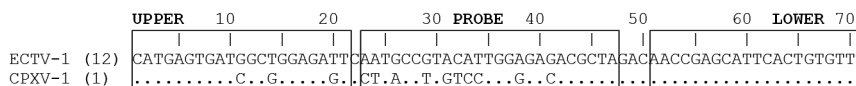


Рис. 1. Сравнение нуклеотидной последовательности ОПТ K2R ВОК штамм Ratrox09 с соответствующими районами геномов ортопоксвирусов. Элайнмент на основе 50 штаммов выполнен с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor. Штаммы одного вида с полностью идентичными нуклеотидными последовательностями рассматриваемого сегмента представлены однократно с указанием в скобках количества таких штаммов. Идентичные нуклеотиды в сравниваемых последовательностях вирусных геномов по отношению к последовательности ОПТ K2R ВОК штамм Ratrox09 обозначены точками, делеции – прочерком. Рамками отмечены области, комплементарные олигонуклеотидным праймерам и гибридационному зонду для видоспецифичной детекции ДНК ВОК. Цифры сверху нуклеотидной последовательности обозначают положение нуклеотидов в анализируемом сегменте ДНК. Обозначения штаммов: CPXV-1 (KC813501.1, LN864566.1, LN864565.1, KC813512.1, KC813510.1, KC813508.1, KC813505.1, KC813503.1, HQ407377.1), CPXV-2 (KC813511.1, KC813507.1, KC813506.1, KC813495.1, KC813491.1, HQ420898.1, HQ420895.1), CPXV-3 (KC813504.1, KC813500.1, KC813498.1, KC813497.1, KC813492.1), CPXV-4 (HQ420900.1, HQ420899.1, HQ420896.1, AF482758.2, U87234.1), CPXV-5 (DQ437593.1, U87583.1, U87582.1), CPXV-6 (KC813499.1, HQ420894.1), CPXV-7 (HQ420897.1), CPXV-8 (KC813494.1), CPXV-9 (KC813493.1), CPXV-10 (U87581.1), CPXV-11 (HQ420893.1), CPXV-12 (X94355.2), ECTV-1 (KJ563295.1, KJ563295.1, JQ410350.1, JQ410350.1, AF012825.2, AF012825.2, AJ567693.1, AJ567692.1, AJ567688.1, U87580.1, U87579.1, U87578.1, U87235.1). UPPER, CPXV_K2R_upper; PROBE, CPXV_K2R_probe; LOWER, CPXV_K2R_lower

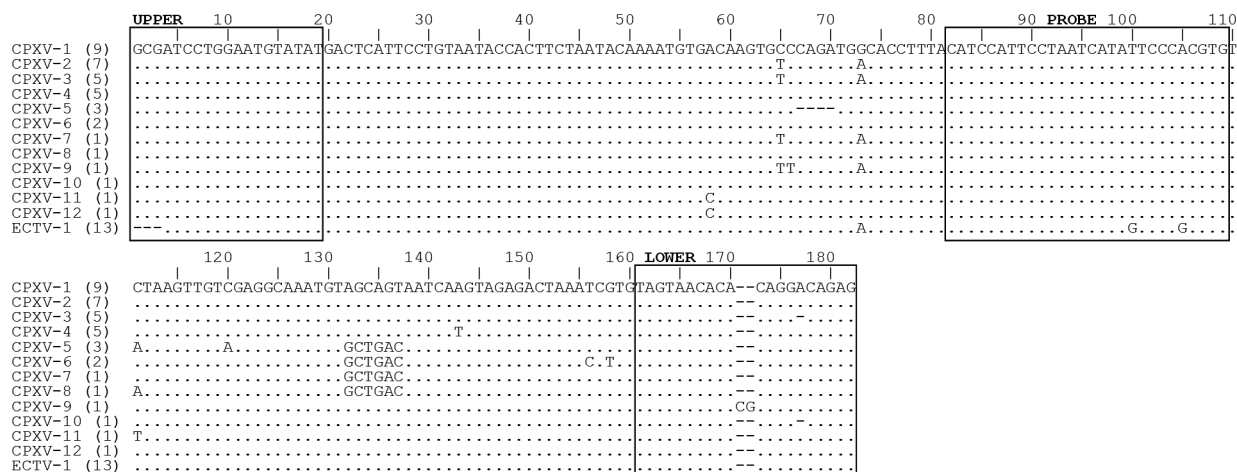


Рис. 2. Сравнение нуклеотидной последовательности ОПТ EVM001 ВЭ штамм Moscow с соответствующими районами геномов ортопоксвирусов. Элайнмент на основе 13 штаммов выполнен с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor. Штаммы одного вида с полностью идентичными нуклеотидными последовательностями рассматриваемого сегмента представлены однократно с указанием в скобках количества таких штаммов. Идентичные нуклеотиды в сравниваемых последовательностях вирусных геномов по отношению к последовательности ОПТ EVM001 ВЭ штамм Moscow обозначены точками. Рамками отмечены области, комплементарные олигонуклеотидным праймерам и гибридизационному зонду для видоспецифичной детекции ДНК ВЭ. Цифры сверху нуклеотидной последовательности обозначают положение нуклеотидов в анализируемом сегменте ДНК. Обозначения штаммов: ECTV-1 (KJ563295.1, JQ410350.1, AF012825.2, KJ563295.1, JQ410350.1, AY102991.1, AY102989.1, AY102988.1, AY102987.1, AF012825.2, AJ277112.1, AJ277111.1), CPXV-1 (HQ407377.1). UPPER, ECTV_EVM001_upper; PROBE, ECTV_EVM001_probe; LOWER, ECTV_EVM001_lower.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baxby D., Bennett M., Getty B. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br. J. Dermatol.* 1994; 131(5):598-607.
2. Blackford S., Roberts D.L., Thomas P.D. Cowpox infection causing a generalized eruption in a patient with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1993; 129(5):628-9.
3. Carroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., Nakazawa Y., Czerny C.P., Tryland M., Kolodziejek J., Nowotny N., Olsen-Rasmussen M., Khristova M., Govil D., Karem K., Damon I.K., Meyer H. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* 2011; 6(8):e23086. DOI: 10.1371/journal.pone.0023086.
4. Duraffour S., Mertens B., Meyer H., van den Oord J.J., Mitera T., Matthys P., Snoeck R., Andrei G. Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals. *PLoS One.* 2013; 8(2):e55808. DOI: 10.1371/journal.pone.0055808.
5. Gavrilo E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49:37-40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
6. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173(2):535-9. DOI: 10.1111/bjd.13700.
7. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261-3. DOI: 10.3201/eid2112.150621.
8. Maksyutov R.A., Gavrilo E.V., Meyer H., Shchelkunov S.N. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Virol. Methods.* 2015; 175:163-9.
9. Maksyutov R.A., Gavrilo E.V., Shchelkunov S.N. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2016; 236:215-20. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.07.024.
10. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R. Cowpox virus

transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781-4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.

11. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37):16262-7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
12. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
13. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilo E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2):163-9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.05.002.
14. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308-13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.
15. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153-6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.

Authors:

Maksyutov R.A. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Максютов Р.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

Поступила 03.08.16.