

УДК616.928.8:616-07(675)

В.Г.Дедков<sup>1,2</sup>, М.В.Сафонова<sup>1</sup>, С.А.Боднев<sup>3</sup>, А.С.Кабанов<sup>3</sup>, В.А.Сафронов<sup>4</sup>, А.А.Лопатин<sup>4</sup>, В.Е.Куклев<sup>4</sup>, Д.В.Уткин<sup>4</sup>, В.В.Малеев<sup>1</sup>, Г.А.Шипулин<sup>1</sup>

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ «АМПЛИСЕНС EBOV (ZAIRE)-FL» ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РНК ВИРУСА ЭБОЛА ЗАИР

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБГУ «Научно-исследовательский институт медицины труда РАН», Москва, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

С учетом опыта практического применения системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» в условиях мобильной лаборатории СПЭБ проведено ее усовершенствование с целью сокращения времени проведения исследования и повышения предела аналитической чувствительности. Осуществленная модификация позволила увеличить значение аналитической чувствительности системы до уровня 200 копий в мл, что в 10 раз выше предыдущего показателя аналитической чувствительности, составлявшей  $2 \cdot 10^3$  копий в 1 мл. Кроме того, удалось сократить время проведения исследования до 1 ч 25 мин, что на 25 % меньше времени, необходимого для проведения исследования по стандартной программе. Модификация диагностической системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» будет способствовать совершенствованию надзорных мероприятий по пресечению распространения вируса Эбола Заир в Западной Африке и недопущению его завоза на территорию Российской Федерации.

*Ключевые слова:* Вирус Эбола Заир, лихорадка Эбола, ОТ-ПЦР в реальном времени.

V.G.Dedkov, M.V.Safonova, S.A.Bodnev, A.S.Kabanov, V.A.Safronov, A.A.Lopatin, V.E.Kuklev, D.V.Utkin, V.V.Maleev, G.A.Shipulin

## Improvement of Diagnostic System in a Real-Time RT-PCR “AmpliSens EBOV (ZAIRE)-FL” Format for Zaire ebolavirus RNA Detection

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>RAS Research Institute of Occupational Medicine, Moscow, Russian Federation; <sup>3</sup>State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation; <sup>4</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Taking into consideration experience in utilization of “AmpliSens EBOV (ZAIRE)-FL” in the setting of SAET mobile laboratory complex, carried out has been the improvement of the panel with a view to elapsed time reduction and analytical sensitivity enhancement. It provides for the analytical sensitivity increase up to 200 copies per ml, which is 10 times higher than the previous measurement, that accounted for  $2 \cdot 10^3$  copies per ml. The timing of the assay has been reduced up to 1 h 25 min, which is 25 % less than the time needed for the standard study. Modification of “AmpliSens EBOV (ZAIRE)-FL” panel benefits to the enhancement of epidemiological surveillance activities intended to stop the spread of Zaire ebolavirus in West Africa and prevent its importation into the Russian Federation.

*Key words:* Ebola virus Zaire, Ebola fever, real-time RT-PCR.

Прошло уже более года с момента начала эпидемии лихорадки Эбола, возникшей в Западной Африке и охватившей сначала Гвинею, затем Либерию и Сьерра Леоне [3]. За это время общее количество зарегистрированных случаев составило, по данным на 26.08.15 г., 28041 случай, 11302 из которых закончились смертельным исходом [2]. Эпидемия 2014–2015 гг. является самой крупной с момента знакомства человечества с вирусами Эбола в 1976 г. и многократно превосходит совокупное количество случаев болезни, зарегистрированных в ходе 22 предшествующих вспышек.

Беспрецедентный масштаб эпидемии и угроза дальнейшего распространения лихорадки Эбола, вызванной вирусом Эбола Заир, в том числе и за пределы Африканского континента, вынудили мировое сообщество предпринять значительные усилия по локализации и ликвидации этой смертельно опасной

болезни. С большим трудом распространение вируса удалось локализовать и прекратить в Либерии, а затем практически свести к нулю и в Сьерра-Леоне. Однако в Гвинейской Республике все еще регистрируются новые случаи болезни. Наличие такого «эпидемического хвоста» обусловлено рядом природных и социальных факторов, к которым следует отнести обширную территорию, наличие труднодоступных районов, скученность населения, проживающего в городах, низкий уровень экономического развития страны и, как следствие, плохо развитую систему здравоохранения и чрезвычайно низкий уровень санитарно-эпидемического благополучия населения.

Правительством Российской Федерации принято решение об оказании помощи в ликвидации эпидемии Гвинейской Республике. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации направи-

ла в Гвинейскую Республику мобильную лабораторию Специальной противоэпидемической бригады (СПЭБ), укомплектованную специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Также для работы в составе СПЭБ привлекались сотрудники других организаций, входящих в структуру Роспотребнадзора. Более полугода лаборатория СПЭБ осуществляла свою деятельность в госпитале Донка (г. Конакри), где открыт крупнейший госпиталь для больных лихорадкой Эбола.

Одним из критически важных факторов, позволивших нашим специалистам успешно осуществлять свою миссию, стало наличие диагностической системы в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса Эбола Заир «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl». Система разработана в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в рамках осуществления мероприятий по предотвращению распространения лихорадки Эбола на территории Российской Федерации и зарегистрирована в качестве изделия медицинского назначения (рег. уд. № РЗН 2014/2036 от 16.10.2014) [1]. Хорошие аналитические характеристики данной системы обеспечили ее успешное применение не только в рамках деятельности СПЭБ в Республике Гвинея, но и на территории Российской Федерации при тестировании образцов биологического материала, прибывших на территорию нашей страны из неблагополучных регионов с подозрением на лихорадку Эбола.

При проектировании данной тест-системы мы ориентировались на ее применение на территории Российской Федерации. Кроме того, в момент разработки олигонуклеотидных праймеров и зонда еще отсутствовали сиквенсы изолятов текущей вспышки. Поэтому дизайн осуществляли на основании сиквенсов, опубликованных ранее, в надежде на консервативность региона, выбранного в качестве мишени для амплификации. В силу вышеперечисленных обстоятельств нами принято решение выбрать в качестве мишени для амплификации фрагмент гена полимеразы (L-ген) длиной 372 н.т. (позиции 13997–14368 н.т. референсного сиквенса EBOV, номер доступа в Gen Bank NCBI – HQ613402). Выбор таргетного фрагмента такой протяженности не является оптимальным с точки зрения проведения реакции ОТ-ПЦР в реальном времени, однако предоставляет возможность проверить результат исследования методом капиллярного секвенирования, что является важной опцией в случае возникновения спорной ситуации.

Как показало время, опасения оказались не беспочвенными. Применение большинства диагностических систем, разработанных ранее для детекции вируса Эбола Заир, оказалось невозможным в силу наличия замен в областях посадки праймеров и зондов у изолятов, циркулирующих в Западной Африке [4]. К счастью, выбор таргетной области системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» оказался удачным, что подтверждено как анализом сиквенсов изолятов текущей вспышки, появившимися в международной базе Gen Bank NCBI, так и практическими результатами тестирования на реальных клинических образцах от

больных лихорадкой Эбола.

В ходе изучения опыта практического применения системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» в условиях мобильной лаборатории и с учетом специфики условий окружающей среды, в которой осуществляет свою деятельность СПЭБ, проведено ее усовершенствование с целью сокращения времени проведения исследования и повышения предела аналитической чувствительности.

## Материалы и методы

Мишень, используемую в диагностической системе «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» (консервативный фрагмент первичной нуклеотидной последовательности гена полимеразы длиной 372 н.т.), укоротили до 168 н.т. (позиции 13997–14165 н.т. референсного сиквенса EBOV, номер доступа в GenBank NCBI – HQ613402).

С этой целью выбрали новый обратный олигонуклеотидный праймер EBOV-shr (5'-AGCTGCGGTTATYCTGCAAG-3', позиции 14146–14165 н.т. референсного сиквенса EBOV, номер доступа в GenBank NCBI – HQ613402). Выбор сделали на основании выравнивания всех представленных в GenBank NCBI первичных нуклеотидных последовательностей вируса Эбола Заир. Выравнивание провели с помощью пакета программ BioEdit 7.2.5 software package (Ibis Biosciences).

Оценку температуры плавления праймера рассчитывали при помощи программы Oligonucleotide Properties Calculator [6].

Реакцию ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл РНК-пробы, 1 мкл праймера rt\_EBOV-f (5 пмоль/мкл), 1 мкл праймера rt\_EBOV-rsh (5 пмоль/мкл), 1 мкл зонда EBOV\_prb (5 пмоль/мкл), 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ, АмплиСенс, Россия), 5 мкл смеси RT-PCR mix2 FEP/FRT (АмплиСенс, Россия), 0,25 мкл MMLV-ревертазы (АмплиСенс, Россия), 0,25 мкл RTG-mix2 (АмплиСенс, Россия) и 0,5 мкл TaqF полимеразы (АмплиСенс, Россия). Реакцию осуществляли в приборе RotorGene 6000 (Qiagen, Germany). Структура праймера rt\_EBOV-f и зонда EBOV\_prb не претерпели изменений [1].

Амплификацию проводили в следующем режиме: 50 °С – 15 мин, 95 °С – 15 мин, далее 45 циклов 95 °С – 10 с, 55 °С – 20 с. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась при 55 °С по каналу Yellow.

Специфичность диагностической системы оценивали с помощью кДНК из высокотитражных культур 23 видов вирусов, принадлежащих к 10 различным семействам, а также 30 образцов клинического материала (плазма) от клинически здоровых людей [1].

С целью оценки аналитической чувствительности готовили с десятикратным шагом разведения положительного контрольного образца (ПКО) известной концентрации. Для получения разведений использовали плазму крови здоровых доноров. Полученные образцы выделяли с помощью набо-

ра для экстракции нуклеиновых кислот Рибо-преп (АмплиСенс, Россия) согласно рекомендациям производителя и исследовали с помощью обычной и модифицированной диагностических систем для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный.

Сравнительное тестирование осуществляли на выборке из 21 клинического образца (сыворотка, кровь, моча, буккальный соскоб) от пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «лихорадка Эбола». РНК выделяли с помощью набора Рибо-преп (АмплиСенс, Россия) согласно рекомендациям производителя и тестировали модифицированной системой «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl». Реакцию проводили на одном приборе, в реакцию брали одинаковое количество РНК.

### Результаты и обсуждение

Анализ показал 100 % идентичность структур праймеров и зонда первичным нуклеотидным последовательностям изолятов из Западной Африки (текущая эпидемия) [4], а также изолятов из ДРК, полученных в 2014 г. [5]. Короткий размер таргетной области позволил модифицировать программу амплификации, исключив из нее стадию элонгации при 72 °С.

Замена обратного праймера в системе «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» также позволила сократить размер таргетного фрагмента более чем в два раза, что привело к увеличению порога чувствительности с  $2 \cdot 10^3$  ГЭ (копий ПКО) в 1 мл до  $2 \cdot 10^2$  ГЭ, что в 10 раз выше, чем до проведения модификации. В результате исследования специфичности системы ложноположительных результатов не зафиксировано.

Сравнительный анализ данных, полученных при тестировании клинических образцов от больных лихорадкой Эбола, выявил сдвиг порогового значения  $\Delta Ct = 4 \pm 2,2$  цикла, где  $\Delta Ct = (Ct_{\text{станд}} - Ct_{\text{мод}})$ . Диагностическая чувствительность модифицированной системы также возросла в 8–10 раз, что соотносится с результатами оценки изменения аналитической чувствительности после модификации. Кроме того, время проведения анализа составило 1 ч 25 мин, что на 35 мин меньше, чем при проведении анализа с помощью стандартной системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl».

Таким образом, проведенная модификация диагностической системы «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl» позволила добиться существенных улучшений аналитических характеристик и снижения сроков проведения анализа, что способствует совершенствованию надзорных мероприятий по пресечению распространения вируса Эбола Заир в Западной Африке и недопущению его завоза на территорию Российской Федерации.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедков В.Г., Сафонова М.В., Десяткин А.А., Долгова А.С., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Агафонов А.П., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Разработка диагностической системы в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса Эбола

Заир. *Эпидемиол. инф. бол. Акт. вопр.* 2015; 2:26–32.

2. Ebola situation report. 26 August 2015. <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-26-august-2015> (дата обращения 02.09.2015).

3. Faye Ous., Bolle P., Heleze E., Faye Oum., Loucoubar Ch., Magassouba N., Soropogui B., Keita S., Gakou T., Bah I., Koivogui L., Sall A., Cauchemez S. Chains of transmission and control of Ebola virus disease in Conakry, Guinea, in 2014: an observational study. *Lancet Inf. Dis.* 2015; 15(3):320–6.

4. Gire K.S., Goba A., Andersen G.K., Sealfon R.S.G., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga Ch.B., Malboeuf J.Q., Gladden A.D., Schaffner S.F., Jiang Y.X., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnies M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheiffelin J.S., Lander E.S., Happi Ch., Gevao S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Humarr Khan S., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014; 345(6202):1369–72.

5. Maganga G.D., Kapetshi J., Berthet N., Kebela Ilunga B., Kabange F., Mbala Kingebeni P., Mondonge V., Muyembe J.J., Bertherat E., Briand S., Cabore J., Epelboin A., Formenty P., Kobinger G., González-Angulo L., Labouba I., Manuguerra J.C., Okwo-Bele J.M., Dye C., Leroy E.M. Ebola virus disease in the Democratic Republic of Congo. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(22):2083–91.

6. Oligonucleotide Properties Calculator. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> (дата обращения 02.09.2015).

### References

1. Dedkov V.G., Safonova M.V., Devyatkin A.A., Dolgova A.S., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. [Development of diagnostic real-time RT-PCR system for Ebola virus Zaire RNA detection]. *Epidemiol. Infekt. Bol. Aktual. Vopr.* 2015; 2:26–32.

2. Ebola situation report. 26 August 2015 [cited 02 Sep 2015]. Available from: <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-26-august-2015>.

3. Faye Ous., Bolle P., Heleze E., Faye Oum., Loucoubar Ch., Magassouba N., Soropogui B., Keita S., Gakou T., Bah I., Koivogui L., Sall A., Cauchemez S. Chains of transmission and control of Ebola virus disease in Conakry, Guinea, in 2014: an observational study. *Lancet Inf. Dis.* 2015; 15(3):320–6.

4. Gire K.S., Goba A., Andersen G.K., Sealfon R.S.G., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga Ch.B., Malboeuf J.Q., Gladden A.D., Schaffner S.F., Jiang Y.X., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnies M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheiffelin J.S., Lander E.S., Happi Ch., Gevao S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Humarr Khan S., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014; 345(6202):1369–72.

5. Maganga G.D., Kapetshi J., Berthet N., Kebela Ilunga B., Kabange F., Mbala Kingebeni P., Mondonge V., Muyembe J.J., Bertherat E., Briand S., Cabore J., Epelboin A., Formenty P., Kobinger G., González-Angulo L., Labouba I., Manuguerra J.C., Okwo-Bele J.M., Dye C., Leroy E.M. Ebola virus disease in the Democratic Republic of Congo. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(22):2083–91.

6. Oligonucleotide Properties Calculator. [cited 02 Sep 2015]. Available from: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>.

### Authors:

Dedkov V.G. Central Research Institute of Epidemiology; 3-a, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. RAS Research Institute of Occupational Medicine; Moscow, Russian Federation. E-mail: info@pcr.ru

Safonova M.V., Maleev V.V., Shipulin G.A. Central Research Institute of Epidemiology. 3-a, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. E-mail: info@pcr.ru

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

Safonov V.A., Lopatin A.A., Kuklev V.E., Utkin D.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

### Об авторах:

Дедков В.Г. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии; Российская Федерация, Москва, ул. Новогиреевская 3-а. Научно-исследовательский институт медицины труда РАН; Российская Федерация, Москва. E-mail: vgdedkov@yandex.ru

Сафонова М.В., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, Москва, ул. Новогиреевская 3-а. E-mail: info@pcr.ru

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

Сафронов В.А., Лопатин А.А., Куклев В.Е., Уткин Д.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 17.08.15.