

А. А. Мухина, Г. А. Шипулин, А. Г. Боковой, Е. Э. Евреинова, О. Ю. Шипулина

ДИАГНОСТИКА РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Центральный НИИ эпидемиологии Минздрава РФ, ЦКБ Медицинского центра Управления делами Президента РФ, НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, Москва

Предложен метод ПЦР-диагностики ротавирусной инфекции у детей в сравнении с другими диагностическими подходами. Мишенью ПЦР-анализа был выбран наиболее консервативный участок неструктурного гена NSP4 ротавируса. Оптимизация методов выделения РНК ротавирусов из клинического материала (10–20% фекальные экстракты и слюна) позволили достичь высокой аналитической чувствительности методики. Был исследован клинический материал от 124 детей с острыми кишечными расстройствами в сравнении с другими лабораторными методами диагностики. Показано, что использование ПЦР повышает частоту выявления ротавирусного гастроэнтерита по сравнению с РЛА на 38%, а по сравнению с ИФА на 9%. В 52,6% случаев ротавирусного гастроэнтерита методом ПЦР РНК ротавируса была обнаружена не только в фекалиях, но и в слюне. При обследовании клинического материала от детей из контрольной группы РНК ротавируса ни в фекалиях, ни в слюне не обнаружена.

Ключевые слова: ротавирус, ПЦР, дети, слюна.

A method for PCR diagnosis of rotavirus infection in children is proposed and compared with other diagnostic approaches. The most conservative site of rotavirus nonstructural gene NSP4 was selected as PCR target. Optimization of methods for isolation of rotavirus RNA from clinical material (10–20% fecal extracts and saliva) helped attain high analytical sensitivity of the method. Clinical samples from 124 children with acute enteric disorders was examined by PCR and the results were compared with the findings of other laboratory diagnostic methods. PCR detected rotavirus gastroenteritis 38% more often than latex agglutination test and 9% more often than enzyme immunoassay. PCR detected rotavirus RNA in both feces and saliva in 52.6% cases with rotavirus gastroenteritis. PCR analysis of clinical material from controls detected no rotavirus RNA either in feces or saliva.

Key words: rotavirus, PCR, children, saliva

Одной из наиболее распространенных инфекционных патологий детского возраста являются кишечные инфекции. Большинство случаев острых кишечных инфекций (ОКИ) до сих пор остаются нерасшифрованными. В течение последних 5 лет в Москве регистрируется до 70% кишечных инфекций неустановленной этиологии [4]. В ряде иссле-

дований, проведенных как в нашей стране, так и за рубежом показано, что ведущее место в этиологической структуре инфекционных гастроэнтеритов занимают ротавирусы. В 1999 г. в Москве на долю ротавирусной инфекции (РВИ) приходилось до 56,6% случаев кишечных инфекций установленной этиологии [4]. По данным зарубежных авторов [1],

12, 15] более 73% случаев всех острых кишечных инфекций у детей может быть обусловлено РВИ.

В настоящее время для диагностики РВИ чаще других применяются такие методы детекции антигена ротавируса, как ИФА с моно- и поликлональными антителами к ротавирусу группы А и РЛА. Данные лабораторные методы используются как для слежения за эпидемическим процессом, так и для диагностики РВИ в условиях стационара. В ряде случаев с их помощью удается установить ротавирусную природу заболевания, но в большинстве вспышек и спорадических случаев ОКИ этиологические агенты так и остаются неустановленными [4]. Неизвестна также истинная доля РВИ в структуре нерасшифрованных ОКИ, хотя данные зарубежных авторов указывают на то, что она может быть недооцененной в связи с относительно низкой чувствительностью используемых методов лабораторного анализа [11].

Кроме того, не осуществляется необходимый контроль за обсемененностью водопроводных, сточных и грунтовых вод ротавирусами. Одна из главных причин этого состоит в неэффективности современных подходов к выявлению ротавируса в объектах окружающей среды. В то время как инфицирующая доза ротавируса может быть гораздо ниже 10^4 вирусных частиц/мл, чувствительность ИФА с моно- и поликлональными антителами к ротавирусу составляет всего лишь 10^7 – 10^8 вирусных частиц/мл, а РЛА — 10^9 вирусных частиц/мл [2, 5, 8, 15]. Специфичность данных тест-систем также ограничена наиболее распространенной группой А ротавируса, кроме того, на территории России выявлены случаи РВИ, вызванные ротавирусами группы С и не исключена циркуляция ротавирусов групп В [3].

Вопросы диагностики и эпидемиологии РВИ не исчерпываются приведенными выше проблемами. Например, предполагается, но остается экспериментально недоказанной персистенция ротавирусов на слизистых верхних дыхательных путей, а также возможность воздушно-капельного пути передачи ротавирусов [1].

Следовательно, крайне актуальной является разработка таких лабораторных методов, которые позволяли бы выявить ротавирусы разной групповой принадлежности в дозе, равной или ниже инфицирующей. На сегодняшний день наиболее перспективным подходом к прямому выявлению вирусных, как в клиническом материале, так и в объектах окружающей среды, является метод ПЦР. Метод основан на амплификации нуклеиновых кислот *in vitro* с помощью двух олигонуклеотидных затравок — праймеров, специфически распознающих нуклеотидные последовательности ДНК или РНК микроорганизмов. Многолетний опыт применения этого метода для диагностики инфекционных заболеваний свидетельствует о его высокой специфичности и аналитической чувствительности, превосходящей на несколько порядков аналогичные показатели для других прямых методов.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы явилась разработка и апробация на клиническом материале методики ПЦР-диагностики РВИ

в сравнении с другими подходами к выявлению данной инфекции.

Материалы и методы

В период сезонного подъема заболеваемости РВИ (с ноября 1998 г. по февраль 1999 г.) было обследовано 124 ребенка, находившегося на стационарном лечении в инфекционном боксированном отделении ЦКБ МЦ УДП РФ с диагнозом острой кишечной инфекции различной этиологии. Контрольную группу составили 17 здоровых детей, посещающих детские учреждения, и 34 детей, госпитализированного в стационар по поводу неинфекционных интеркуррентных заболеваний.

С целью определения этиологического фактора ОКИ у детей с кишечными расстройствами проводились бактериологический анализ кала на патогенные бактерии кишечной группы и серологическое исследование крови на наличие антител к возбудителям дизентерии, сальмонеллеза, кишечной формы иерсиниоза.

Для определения аналитической специфичности методики ПЦР использовали следующие штаммы: ротавируса человека WA, ротавируса обезьян SA-11, ротавируса свиней и крупного рогатого скота, респираторных вирусов (аденовирусы серогрупп 5 и 7; вирусы гриппа А) и энтеровирусов (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio 1, 11, 111). Все перечисленные штаммы были любезно предоставлены ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Ротавирусный антиген выявляли в РЛА на латексе, а также с помощью ИФА. Реакцию агглютинации проводили на наборах "Rotalex" ("Orion Diagnostica", Финляндия). Для проведения ИФА была использована иммуноферментная моноклональная тест-система для обнаружения антигенов ротавирусов группы А "Рота-анализ" ("Биоиммуноген", Москва).

Электрофоретический анализ 10–20% фекальных экстрактов в полиакриламидном геле проводился по стандартной методике [3, 13].

Выделение РНК проводилось из 10–20% фекальных экстрактов 2 методами — аффинной сорбцией на силикагеле с предшествующим лизисом пробы раствором 4 М гуанидинтиоционата [6] и методом одношаговой фенолхлороформной экстракции [10]. Для выделения РНК ротавирусов из проб слюны, кроме перечисленных методов, применялись кипячение слюны и обработка слюны ионно-обменной смолой Chelex-100 [9, 14]. Для того чтобы избежать ложноотрицательных результатов, к исследуемой пробе добавляли специально сконструированный внутренний контрольный образец (ВКО) РНК, который проходил все этапы выделения, обратной транскрипции и ПЦР, являясь надежным маркером качества проведенных манипуляций.

Реакции обратной транскрипции и ПЦР проводились с использованием коммерческих наборов "Реверта" и "Амплиценс-200", производимых ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ, со специфическими праймерами, разработанными нами.

Детекция продуктов амплификации проводилась электрофорезом в 2% агарозном геле. Размер

фрагмента генома ротавируса, амплифицированного с помощью внешних праймеров — 282 п.н., а с парой внутренних праймеров — 150 п.н.

Результаты и обсуждение

Выбор праймеров для ПЦР. Несмотря на то что геном ротавируса отличается крайне выраженной вариабельностью, нам удалось найти наиболее консервативный участок гена NSP4, к которому и была подобрана пара праймеров. Однако даже выбранные участки гена NSP4 у ряда изолятов ротавирусов содержали нуклеотидные замены, мешающие распознаванию праймерами РНК этих изолятов. В связи с этим структура предложенных нами праймеров была задана так, чтобы наиболее вариабельные позиции содержали два наиболее часто встречающихся нуклеотида. В случае, когда в одном положении равновероятно встречались более двух нуклеотидов, канонический нуклеотид заменили на дезоксирибозимонифосфат. Выбранные праймеры имели следующую нуклеотидную последовательность: Rota-1 5'-gga-atg-gcg-tat-ttt-cca-tat-ati-gci-tct-g-3', Rota-2 5'-gtt-caa-ttt-cac-g(a/t)g-tigt(t/c)a-(g/a)tt-tit-caa-tca-t-3' и фланкировали фрагмент гена NSP4 со 126-го по 408-е положение относительно нуклеотидной последовательности гена NSP4 ротавируса группы А, штамм WA (изолят с номером AF093199 в базе данных GeneBank).

Аналогичным образом была подобрана пара "внутренних" праймеров для проведения второй стадии ПЦР ("nested"-PCR). Их последовательности соответствовали: Rota-in1 5'-gca-taa-agg-(t/g)tc-aat-tcc-aac-iat-g-3', Rota-in2 5'-caa-tca-tct-cca-(g/c)ct-gac-gtc-tca-t-3' и ограничивали фрагмент гена NSP4 со 173-го по 382-е положение относительно нуклеотидной последовательности изолята AF093199. Двухстадийная ПЦР была использована при определении концентрации РНК ротавирусов в культуральной жидкости методом лимитирующих разведений [16].

Также, используя выровненные нуклеотидные последовательности гена NSP4, был предложен олигонуклеотид (R1) для инициации реакции обратной транскрипции — 5'-caa-cct-gtt-caa-ttt-cac-gag-tag-3'.

Оптимизация реакции обратной транскрипции и ПЦР. В ходе этого этапа работы было показано, что чувствительность ПЦР повышалась приблизительно в 10 раз при использовании в качестве затравки специфического праймера R1 по сравнению со случайными гексамерными праймерами. Было также установлено, что эффективность выделения РНК и последующей обратной транскрипции составляет в среднем 30% от начального количества РНК ротавируса, взятой в выделение.

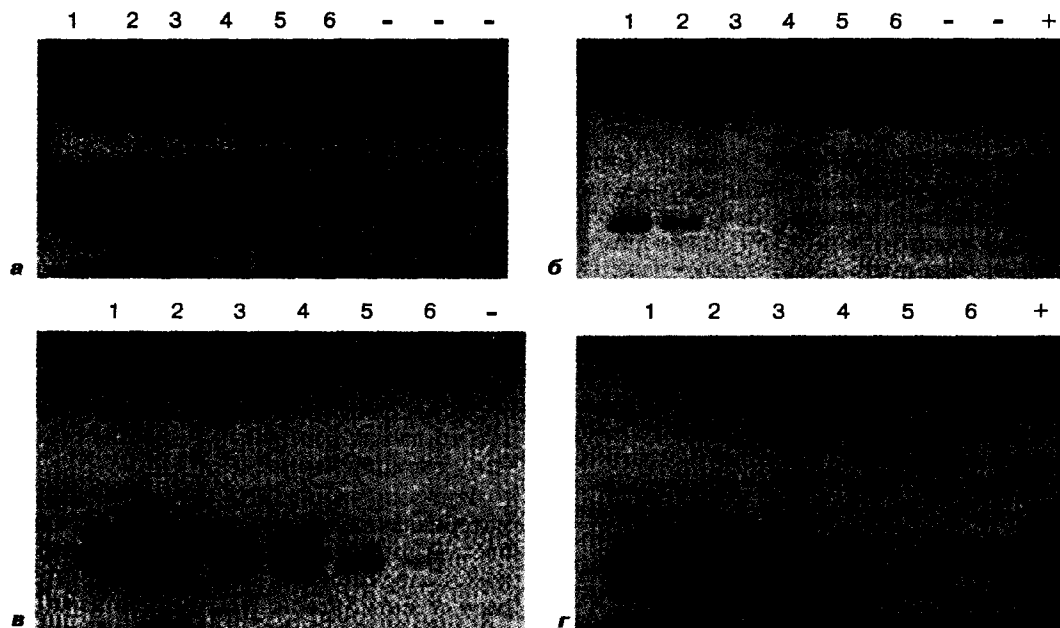
После оптимизации условий ПЦР была выбрана методика выделения РНК ротавируса из различных биологических сред — фекальных экстрактов, слюны и воды.

Фекальные экстракты. Сравнение эффективности выделения РНК методом аффинной сорбции РНК на силикагеле [6] и методом одношаговой фенолхлороформной экстракции [10] проводилось на 40 фекальных экстрактах. В результате был сделан

вывод, что наиболее оптимальным методом является метод аффинной сорбции, который менее опасен в плане развития контаминации от пробы к пробе. Среди всех исследованных образцов фекалий, давших положительный либо отрицательный результат в ПЦР (достоверность отрицательного результата оценивалась по наличию на электрофореграмме полосы ВКО), была отобрана группа из 10 образцов, в которых ВКО воспроизводимо давал отрицательные результаты в ПЦР. Данное явление, по-видимому, было вызвано снижением аналитической чувствительности за счет ингибирования ПЦР, поскольку после добавления ко всем исследуемым образцам культуральной среды с высоким содержанием вирусных частиц (около 10^9) только 6 образцов дали ожидаемый положительный результат, тогда как остальные 4 образца были по-прежнему отрицательными.

Ингибирование ПЦР при анализе клинического материала представляется наиболее серьезной проблемой этого метода. Фекалии являются материалом, содержащим в высокой концентрации самые разные ингибиторы ПЦР. Ранее нами было показано, что добавление сыворотки, богатой альбуминами, к образцам с высоким содержанием ингибиторов ПЦР, повышает эффективность ПЦР. В литературе также недавно был предложен аналогичный способ, позволяющий существенно снизить содержание ингибиторов ПЦР в препаратах ДНК и РНК, получаемых методом сорбции по R. Voort и соавт. [7]. Было показано, что добавление к лизирующему буферу α -казеина снижает концентрацию ингибиторов в элюате. Учитывая эти данные, ко всем 10 образцам, содержащим ингибиторы, мы добавили сыворотку крови (в соотношении 1:1), не содержащую РНК ротавирусов. В результате во всех 10 образцах ВКО оказался положительным, и в 2 пробах из 10 была обнаружена РНК ротавирусов.

Слюна. Для выбора оптимального метода выделения РНК из образцов слюны были использованы следующие методы: аффинная сорбция РНК на силикагеле, одношаговая фенолхлороформная экстракция, кипячение слюны и обработка слюны ионно-обменной смолой Chelex-100 [6, 9, 10, 15]. Результаты представлены на рисунке 6, откуда видно, что кипячение слюны и методика сорбции белков Chelex-100 являются низкочувствительными методами выделения РНК. В связи с этим предпочтительнее использовать другие методы выделения РНК из слюны — аффинную сорбцию РНК на силикагеле и одношаговую фенолхлороформную экстракцию. Данные методы обладают практически одинаковой эффективностью. Но необходимо учитывать, что при использовании одношаговой фенолхлороформной экстракции вирусная РНК на всех этапах выделения находится в растворенном состоянии, следовательно, риск контаминации от пробы к пробе для этого метода выше, чем для метода аффинной сорбции на силикагеле. В связи с этим использование последнего метода для ПЦР-детекции ротавируса, находящегося в клиническом материале в очень высокой концентрации, более целесообразно.



Сравнительный анализ методов выделения РНК ротавируса из слюны.

а — кипячение слюны, б — обработка слюны ионно-обменной смолой Chelex-100, в — фенолхлороформная экстракция, г — аффинная сорбция на силикагеле. 1—6 — 10-кратное титрование к ДНК ротавируса штамма SA-11, "—" — отрицательный, "+" — положительный контрольный образец.

Специфичность методики. Теоретическая специфичность предложенных праймеров была изучена с помощью компьютерных систем FASTA и BLAST on line. В результате этой работы была показана гомология выбранных олигонуклеотидов только с генами NSP4 ротавирусов человека и животных и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других групп бактерий, вирусов и последовательностями эукариот.

Аналитическая специфичность разработанной методики. Для проверки аналитической специфичности разработанной методики проводили реакцию на РНК, выделенной из ротавирусов человека и животных, а также на штаммах энтеровирусов, вирусах гриппа, аденовирусов. При работе на клиническом материале от здоровых детей, а также детей, перенесших сальмонеллез, шигеллез и кишечную форму иерсиниоза, не было отмечено ложноположительных результатов, поэтому можно предположить отсутствие перекрестных реакций с кишечной микрофлорой и возбудителями данных заболеваний.

Таблица 1

Аналитическая чувствительность иммуноферментного выявления ротавирусного антигена (Бионммуноген, Москва) и методики ПЦР-детекции РНК ротавируса

Материал	Аналитическая чувствительность (копии РНК ротавируса в 100 мкл пробы)	
	ПЦР	ИФА
Фекалии	$2,4 \cdot 10^5$	10^7
Фекалии + плазма (1:1)	$2,4 \cdot 10^4$	$10^6 - 10^7$
Слюна	$2,4 \cdot 10^3$	Не тестировалась

Чувствительность методики. Для определения аналитической чувствительности разработанной методики была произведена количественная оценка содержания РНК ротавирусов в культуральной жидкости штамма SA-11 с использованием метода лимитирующих разведений [16]; в результате было определено, что в 1 мл имеющейся в нашем распоряжении вирусной суспензии содержится около $2,3 \cdot 10^{10}$ копий РНК ротавирусов. Сравнительную оценку чувствительности методики ПЦР на разном клиническом материале проводили с помощью 10-кратного титрования кДНК, полученной в результате выделения РНК из данного клинического материала с последующей ее реверсией. Также были сопоставлены результаты экспериментов по определению чувствительности методов ПЦР и ИФА на разном клиническом материале (табл. 1). Таким образом, было показано, что аналитическая чувствительность разработанной нами методики ПЦР превосходит чувствительность ИФА на 2—3 порядка. В исследованиях зарубежных авторов получены аналогичные данные по чувствительности методики ПЦР — от 10^3 до 10^5 вирусных частиц в 1 мл пробы фекальных экстрактов, что во многом зависело от выбора специфических праймеров и методов детекции продуктов ПЦР, используемых в той или иной работе [8, 10].

Апробация разработанной нами методики проводилась на клиническом материале от детей (фекалии и слюна) в сравнении с другими методами лабораторной диагностики РВИ. Было обследовано 124 ребенка с острыми кишечными расстройствами. Комплекс лабораторных методов диагностики, таких как ИФА, РЛА, электрофорез в ПААГ, позволил выявить ротавирус и диагности-

ровать ротавирусный гастроэнтерит (РВГЭ) у 80 (64,5%) из 124 детей. Методика ПЦР была апробирована на клиническом материале, полученном от всех 124 детей с кишечными расстройствами. Положительные результаты ПЦР-анализа были выявлены у всех 80 детей с диагнозом РВГЭ и ни у кого из группы с кишечными расстройствами неустановленной этиологии. Таким образом, чувствительность и специфичность ПЦР на клиническом материале составила 100%. Использование ПЦР в нашем исследовании позволило повысить частоту выявления РВГЭ по сравнению с РЛА на 38%, а по сравнению с ИФА на 9% (табл. 2). В настоящее время нами проводится выяснение причин возникновения ложноотрицательных результатов ИФА. Скорее всего, эти данные объясняются высокой аналитической чувствительностью разработанного варианта методики ПЦР, превосходящей чувствительность ИФА в 100—1000 раз.

Кроме фекальных экстрактов, методом ПЦР была обследована слюна от 57 детей с кишечными расстройствами ротавирусной этиологии. В результате РНК ротавируса была выявлена у 30 (52,6%) из 57 обследованных детей с диагнозом РВГЭ в остром периоде заболевания. Обнаружение РНК ротавируса в слюне методом ПЦР в остром периоде заболевания и в периоде реконвалесценции показывает, что в течение болезни больной ребенок выделяет в окружающую среду ротавирус не только с фекалиями, но и со слюной, что заставляет по-новому взглянуть на санитарно-эпидемиологический режим в детских инфекционных отделениях. При обследовании клинического материала от детей из контрольной группы методом ПЦР ротавирус ни в фекалиях, ни в слюне не обнаружен.

Таким образом, нами была разработана методика для выявления РНК ротавирусов в фекалиях и в слюне. Оптимизация методов выделения РНК ротавирусов из клинического материала позволила достичь высокой аналитической чувствительности методики — 10^5 и 10^4 копий вирусной РНК в 1 мл для фекалий и слюны соответственно. Аналитическая чувствительность ПЦР-диагностики ротавирусной инфекции в фекалиях превышает в 100—1000 раз чувствительность ИФА — наиболее чувствительного на сегодняшний день лабораторного метода детекции данной инфекции.

На клиническом материале показано, что использование ПЦР повышает частоту выявления РВГЭ на 38% по сравнению с использованием РЛА и на 9% по сравнению с ИФА (см. табл. 2).

Применение разработанной нами методики для выявления РНК ротавирусов в различных биоло-

Таблица 2

Частота выявления РВГЭ различными методами диагностики

Метод диагностики	ОКИ не ротавирусной этиологии (n = 44)	РВГЭ (n = 80)	Контрольная группа (n = 51)
РЛА	2/40	41/66 (62%)	Не тестировалась
ИФА	0/44	73/80 (91%)	0/51
ПЦР (фекалии)	0/44	80/80 (100%)	0/51
ПЦР (слюна)	0/36	30/57 (53%)	0/14

Примечание. В числителе — случаи выявления, в знаменателе — количество тестируемых.

гических средах позволяет проводить дальнейшие исследования по нескольким направлениям как клинического, так и эпидемиологического характера. Представляется возможным на более широком клиническом материале уточнить этиологическую структуру ОКИ за счет увеличения доли РВГЭ. Кроме того, разработанный нами подход позволяет более детально определить локализацию ротавируса в случае длительной персистенции, а также исследовать механизмы передачи возбудителя РВИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боковой А. Г., Карпович Л. Г., Евреинова Е. Э. // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2000. — № 4. — С. 23.
2. Букринская А. Г., Грачева И. М., Васильева В. И. Ротавирусная инфекция. — М., 1989.
3. Епифанова Н. В. Анализ электрофоретипов РНК ротавирусов человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1997.
4. Информ. бюлл. ЦГСЭН г. Москвы. — 1999.
5. Покровский В. И. Руководство по эпидемиологии инфекционных заболеваний. — М., 1993. — Т. 2. — С. 120—127.
6. Boom R., Sol C., Salimans M. // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 495—503.
7. Boom R., Sol C., Beld M. // Ibid. — 1999. — Vol. 37, N 3. — P. 615—619.
8. Buesa J., Colomina J., Raga J. // Res. Virol. — 1996. — Vol. 147. — P. 353—361.
9. Chen M., Andes Sonnerborg, Bo Johansson et al. // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35, N 4. — P. 973—975.
10. Chomczynski P., Sacchi N. // Analyt. Biochem. — 1999. — Vol. 162. — P. 156—159.
11. Dennehy P., Hartin M., Nelson S. M. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, N 6. — P. 1977—1979.
12. Husain M., Seth P., Broor S. // Arch. Virol. — 1995. — Vol. 140. — P. 1225—1233.
13. Laemmli U. R. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680.
14. Maitto J., Saarela M., Satu A. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36, N 1. — P. 157—160.
15. Mesa F., Lajo A., Alonso F. et al. // Enferm. Infect. Microbiol. Clin. — 1996. — Vol. 14, N 2. — P. 106—110.
16. Rodrigo A. G., Goracke P. C. et al. // Aids Res. Hum. Retrovirus. — 1997. — Vol. 13, N 9. — P. 737—742.

Поступила 16.04.01