

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО СУБТИПИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА А.

¹Гребенникова Т. В., ¹Латышев О. Е., ²Фесенко Е. Е., ³Норкина С. Н., ¹Алипер Т. И.

¹ ФГУ «НИИ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва,

³ НПП «Авивак», Москва

Резюме

Вирусы гриппа имеют широкий спектр хозяев, включая птиц, человека и животных, поэтому разработка молекулярных методик, позволяющих не только детектировать с высокой чувствительностью, но и типировать вирусы гриппа А приобретают актуальное значение. Ранее, сотрудниками ФГУ «НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ совместно с лабораторией биологических микрочипов института молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН был разработан олигонуклеотидный микрочип (биочип) с трехмерными гелевыми элементами, содержащий набор дискриминирующих олигонуклеотидных зондов для молекулярного типирования вируса гриппа А. Данный микрочип позволяет идентифицировать 15 подтипов гена гемагглютинин (НА) и 2 подтипа гена нейраминидазы (NA) [6].

В работе продемонстрирована возможность идентификации эпидемических подтипов вируса при анализе суспензии внутренних органов погибших при эпизоотии птиц (H5N1). Продемонстрирована возможность идентификации подтипа пандемического вируса H1N1. Биочип был с успехом использован в тестировании панели, Всемирной Организации Здравоохранения в рамках программы External Quality Assessment program (EQAP) 2010 г. Оптимизация условий использования данного биочипа для практического использования является необходимым компонентом в разработке нового молекулярного метода определения и типирования вируса гриппа А в биологических образцах.

Введение

Грипп вирусное заболевание, которое вызывает сезонные эпидемии, пандемии и эпизоотии с различным уровнем смертности. Наиболее широко в природе распространен вирус гриппа А, потому что он может заражать человека, млекопитающих и птиц. Вирус гриппа А очень изменчив и имеет множество подтипов, которые выделяют по двум вирусным белкам: гемагглютинину (НА) и нейраминидазе (NA). Известно 16 антигенных подтипов НА (H1-H16) и 9 подтипов NA (N1-N9). Геномом вируса состоит из 8 сегментов, следовательно, различные вирусы могут обмениваться этими сегментами и образовывать

новые варианты. Различные комбинации HA и NA способны привести к появлению высоковирулентных вирусов, вызывающих высокий процент смертности как у млекопитающих и птиц, так и у людей. В 20 веке отмечены четыре пандемии: 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) и 1977 (H1N1), причем две (1957 и 1968 гг.) были обусловлены новыми вирусами, которые появились в результате обмена генов вирусов гриппа птиц и человека [1].

Грипп является природно-очаговым заболеванием, другими словами, какие-то штаммы вируса гриппа всегда будут циркулировать в природных очагах. Вирус сохраняется в воде долгое время (6-8 месяцев), а водно-фекальный путь инфицирования является основным механизмом распространения этого вируса. Главное направление борьбы с гриппом – локализация очагов и меры по предотвращению распространения вируса. Следовательно, важную роль играет наличие надежных средств диагностики гриппа. В диагностике гриппа существует два направления: определения самого вируса и определение антител к вирусу. Антитела к вирусу определяют иммунологическими методами. Вирус можно определять вирусологическими и молекулярными методами. Молекулярные методы диагностики являются самыми современными, чувствительными и специфичными для определения вируса гриппа А без предварительного культивирования. Эти методы рекомендованы Всемирной Организации Здравоохранения и Международным Эпидемиологическим Бюро как лабораторные тесты для определения вируса гриппа в биологических образцах и постановки диагноза.

Применение технологии ДНК микрочипов, позволяющее проводить многопараметрический анализ генетического материала, представляется весьма перспективным для анализа вирусных подтипов. Тем не менее, большинство из предложенных в настоящее время подходов, использующих технологию олигонуклеотидных микрочипов, выявляют подтипы, циркулирующие преимущественно в человеческой популяции [2,3,7], и подтип H5N1 [5]. Микрочип, разработанный Lodes et al. [4], охватывает почти все подтипы и отличается высокой надежностью. Однако трудоемкость проведения анализа, значительная стоимость ДНК-микрочипов высокой плотности и сканирующего оборудования существенно ограничивают возможности его применения.

Разработанный в представленной работе гелевый микрочип позволяет быстро и технологично детектировать и типировать вирус гриппа А. При этом анализ на микрочипе соответствует 17 ПЦР реакциям.

Цель настоящего исследования: работа по оптимизации условий проведения ПЦР для дальнейшего типирования вируса гриппа А в клиническом материале от диких и домашних птиц, а также нового пандемического штамма H1N1.

Материалы и методы.

Вирусы гриппа предварительно культивировали в 10-дневных куриных эмбрионах. 200 мкл аллантоисной жидкости, было использовано для выделения РНК.

Подготовку полевых образцов осуществляли следующим образом: частицы внутренних органов погибших птиц замораживали в жидком азоте. После доставки в лабораторию образцы размораживали, гомогенизировали и готовили 10% суспензию на фосфатно-солевом буфере. 200 мкл суспензии использовали для выделения РНК с помощью TRI[®] Reagent (Sigma, Saint Louis, MO) согласно методике производителя.

Полимеразную цепную реакцию проводили как в тонкостенных пробирках объемом 0,2 мл, так и в среднестенных объемом 0,6 мл на амплификаторах Mastercycler classic (Eppendorf, Германия) и Терцик (ДНК-технология, Россия). Полученные фрагменты ПЦР вырезали из геля и выделяли с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (Fermentas, DNA Extraction Kit, Литва).

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ DNASTAR V.3.12 («Lasergen Inc.», США) и программы BioEdit 7.0.1 Построение филогенетических дендрограмм осуществляли на основе алгоритма: “ближайшего соседа” в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 1000-кратным ресэмплингом (MEGA 3.0).

Регистрацию результатов гибридизации осуществляли на универсальном аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (ИМБ РАН, Россия). Интерпретацию результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «ImaGeWare», входящего в состав комплекса.

Результаты и обсуждение

Технологически, анализ происходит следующим образом: с использованием разработанных универсальных олигонуклеотидных праймеров, специфичных генам гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А, получают амплификаты на матрице РНК вирусов гриппа А подтипов H1-N15, и N1 и N2 методом гнездовой ОТ-ПЦР. После этого проводится гибридизация нуклеиновых кислот на микрочипе, который содержит

набор олигонуклеотидных зондов, специфичных к каждому из подтипов.

Первоначально ОТ-ПЦР для гибридизации на микрочипе осуществляли в 3 стадии, по классической схеме. На первой стадии проводили синтез кДНК в 20 мкл, с использованием 25 Ед. M-MLV обратной транскриптазы, 20 Ед. RNaseIN, 100 нМ Random праймера и 5 мкл образца вирусной РНК. Реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение 30 минут, затем 3 минуты при 94°C. На второй стадии осуществляли амплификацию участков НА и NA сегментов с использованием разработанного набора из 2 пар праймеров. В состав реакционной смеси (общим объемом 25мкл) входили 2,4 мМ MgCl₂, 80 мМ KCl, 16 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 0,2 мМ каждого dNTPs, 0,25 Ед. Taq ДНК полимеразы, 100 нМ каждого из праймеров и 5 мкл кДНК. Температурный режим был: 31 цикл со следующим температурно-временным профилем: 94°C - 20 сек, 58°C - 30 сек, 72°C - 45 сек. В завершение, смесь инкубировали 5 минут при 72°C. Продукты амплификации выявляли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Пробы, в которых обнаруживали специфические полосы, соответствующие специфическим продуктам размером 600 и 650 пар нуклеотидов, использовали в качестве матрицы для второй стадии.

Для проведения второй стадии использовали разработанный набор из 2 пар внутренних праймеров с получением продуктов амплификации длиной 300 и 390 оснований, соответственно. Обратные праймеры для 2-й стадии на 5'-конце содержали флуоресцентную метку IMD-504. С целью получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно меченных фрагментов обратные праймеры добавляли в десятикратном избытке по отношению к прямым. Реакционная смесь (25мкл) содержала 70 мМ Tris-HCl, pH 8,6, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTPs, 0,25 Ед. Taq ДНК полимеразы, праймеры в концентрации от 10 до 100 нМ и 1 мкл матрицы, полученной на первой стадии. Для проведения реакции использовали следующие температурно-временные условия: 94 °C -3 мин, 35 циклов (94 °C - 20 сек, 58 °C - 30 сек, 72 °C – 30 сек), 72°C – 3 мин.

В процессе работы первая и вторая стадии были объединены. При этом ОТ-ПЦР проводили в одной пробирке. В результате проводили синтез кДНК и амплификацию участков НА и NA сегментов с использованием разработанного набора из 2 пар праймеров. В состав реакционной смеси (общим объемом 25мкл) входили 2,4 мМ MgCl₂, 80 мМ KCl, 16 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 0,2 мМ каждого dNTPs, 0,25 Ед. Taq ДНК полимеразы, 25 Ед. M-MLV обратной транскриптазы, 20 Ед. RNaseIN, 100 нМ каждого из праймеров и 5 мкл образца вирусной РНК. Реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение 30 минут, затем после 3 минутной денатурации при 94°C следовал 31 цикл со

следующим температурно-временным профилем: 94°C - 20 сек, 58°C - 30 сек, 72°C - 45 сек. В завершение, смесь инкубировали 5 минут при 72°C. Продукты амплификации выявляли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Пробы, в которых обнаруживали специфические полосы, соответствующие специфическим продуктам размером 600 и 650 пар нуклеотидов, использовали в качестве матрицы для второй стадии. Реамплификацию проводили как описано ранее.

Необходимо отметить, что только в случае получения достаточного количества одноцепочечных флуоресцентно меченых фрагментов генов NA и HA и обнаружения методом гель-электрофореза фрагментов соответствующей длины, продукт амплификации гибридизовали на биочипе.

Гибридизация на биочипе полученных флуоресцентно меченных фрагментов генов NA и HA исследуемого подтипа приводила к образованию стабильных гибридизационных комплексов, обладающих высокой энергией связи, в гелевом элементе, содержащем олигонуклеотид, последовательность которого была комплементарна последовательности гибридизуемого фрагмента гена. В тоже время, в ячейках, соответствующих иным подтипам, образовывались нестабильные комплексы с низкой энергией связи вследствие отсутствия комплементарности последовательностей иммобилизованных подтип-специфических олигонуклеотидов и гибридизуемого исследуемого фрагмента. Таким образом, флуоресцентный сигнал регистрировали только в тех ячейках биочипа, где образовывались стабильные гибридизационные комплексы.

Для интерпретации полученных результатов приведем схему гелевого микрочипа (рисунок 1) [6].

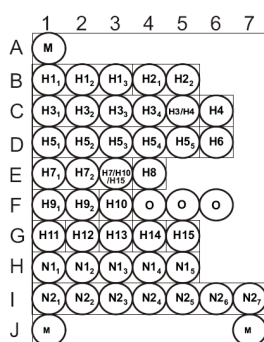
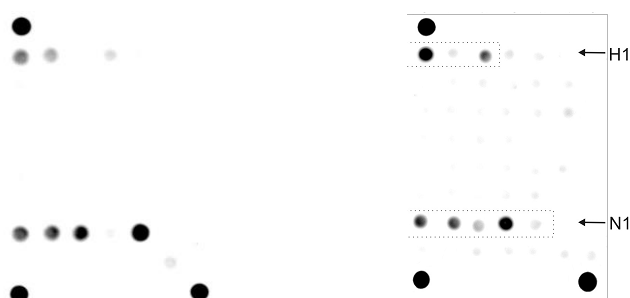


Рисунок 6. Схема микрочипа для типирования вируса гриппа А

Как видно из рисунка, в 41 ячейке иммобилизованы индивидуальные олигонуклеотидные зонды; 6 ячеек являются контрольными.

Для подтверждения специфичности разработанного микрочипа были проведены лабораторные испытания, протестированы 2 слепых панели, состоящие из референтных образцов различных подтипов вируса гриппа А. Специфичность разработанного

микрочипа была полностью подтверждена. Интересный результат получен при сравнении эпидемических штаммов H1N1 и пандемического вируса H1N1, (А/ Москва/ H1N1/2009 и А/ Калифорния/H1N1/2009). Наглядное различие продемонстрировано на рисунке 2.



(а) Пандемический H1N1 2009 г (б) Эпидемический штамм H1N1

Рисунок 2. Гибридизационные картины, полученные при анализе референтных штаммов А/ Калифорния/H1N1/2009 (а) и Эпидемический штамм H1N1 (б)

Аналитическая чувствительность составила 10^3 ЭИД₅₀/мл.

После оптимизации условий, было проверено более 200 образцов РНК, выделенных из клоакальных смывов и органов, полученных от диких и домашних птиц в 2005-2009 в различных областях РФ. Необходимо заметить, что ряд образцов были получены от птиц без клинических признаков заболевания. Анализ показал, что чувствительность микрочипов позволяет определять тип вируса гриппа А у птиц без предварительного культивирования только в период эпизоотий.

В 2010 г. была протестирована панель, присланная Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в рамках программы External Quality Assessment program (EQAP). Международные организации, в том числе и ВОЗ уделяют большое внимание исследованию подтипа вируса H5N1. Это объясняется тем, что данный подтип циркулирует в различных видах птиц водного и околородного комплекса, может заражать человека и в 2005 г. продемонстрировал высокую вирулентность. Поэтому в панели была вложена РНК. Выделенная из подтипов H5N1 различных лет и различных генетических клониров. С использованием микрочипов удалось выявить все вирусы H5N1, как современного генотипа, так и генотипа 2005 г. Так, в Новосибирске, в 2005 году циркулировал генотип 2.2, тогда как в 2008 г. вирус, выделенный в Приморье, был уже генотипа 2.3.2. На рисунке 2 они имеют гибридизационные картины, показывающие, что это подтип H5N1, но различных генотипов.



(а) A/chicken/Novosibirsk/64/05 (H5N1)
Genotype 2. 2.

(б) A/chicken/Primorje/1/08 (H5N1)
Genotype 2. 3. 2.

Рисунок 3. Гибридизационные картины, полученные при анализе референтных штаммов A/chicken/Novosibirsk/64/05 (H5N1) (а) и A/chicken/Primorje/1/08 (H5N1) (б)

Заключение

Оптимизированы условия для использования ранее разработанного гелевого микрочипа для быстрого и технологичного детектирования и типирования вируса гриппа А в образцах от птиц. При этом анализ на микрочипе соответствует 17 ПЦР реакциям. Аналитическая чувствительность составляет 10^3 ЭИД₅₀/мл. Методика микрочипов позволяет быстро и технологично типировать вирус гриппа А различных подтипов, в образцах от птиц. При этом, определять тип вируса гриппа А у птиц без предварительного культивирования с использованием микрочипа можно только в период эпизоотий. При мониторинге и определении носительства вируса у птиц, вирус можно типировать после предварительного культивирования как на куриных эмбрионах, так и в культуре клеток MDCK.

Литература.

1. Львов Д. К., Ямникова С. С., Забережный А. Д., Гребенникова Т. В. – Межпопуляционные взаимодействия в системе: вирусы гриппа А – животные – человек// Вопросы вирусологии. – 2005. - 50(4). – С. 4-11.
2. Kessler N., Ferraris O., Palmer K., Marsh W., Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. //J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol.42. – P. 2173-85.

3. Li J., Chen S., Evans D.H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR //J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 696-704.
4. Lodes MJ, Suci D, Elliott M, Stover AG, Ross M, Caraballo M, Dix K, Crye J, Webby RJ, Lyon WJ, Danley DL, McShea A. Use of semiconductor-based oligonucleotide microarrays for influenza A virus subtype identification and sequencing //J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 1209-18.
5. Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, Smith CB, Cox NJ, Kuchta RD, Rowlen KL Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. //J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 2863-71.
6. Fesenko E.E., Kireyev D.E., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V., L'vov D.K., Zasedatelev A.S. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus // Influenza and other respiratory viruses. – 2007. – Vol. 1. – P. 121-129.
7. Wang Z, Daum LT, Vora GJ, Metzgar D, Walter EA, Canas LC, Malanoski AP, Lin B, Stenger DA Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. //Emerg. Infect. Dis. - 2006. – Vol. 12. – P. 638-646.