НИИ гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии РЦГЭиОЗ

Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда», 5-6.12.2024

Секция «Эпидемиологическое слежение за инфекционными и паразитарными болезнями»

К вопросу об оптимизации молекулярного надзора за парвовирусной B19 инфекцией в разных странах

Антипова А.Ю., Хоанг М., Железнова Н.В., Малина Е.А., Лаврентьева И.Н.

ВВЕДЕНИЕ:

Для надзора за парвовирусной B19 инфекцией предложены протоколы секвенирования локуса NS1-VP1u протяженностью до 1000 нт.

Цель работы: изучение праймеров из протоколов, опубликованных в литературе, для секвенирования NS1-VP1u локуса генома B19V с целью молекулярного надзора.

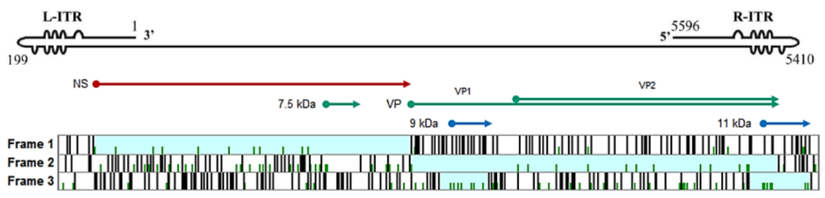

Рис. 1. Схема генома B19V [6, 7]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

Исследовали 31 образец тотальной ДНК с вирусной нагрузкой ≥10^4 МЕ ДНК B19V /мл в пяти протоколах гнездовой или полугнездовой ПЦР (табл.1): все пробы с внешней парой, и отрицательные в первом раунде – со второй парой праймеров. Праймеры оценивали в программе SystemViewer (https://github.com/NavolotskiyD/SystemViewer.git): три были модифицированы для большего соответствия матрице.

ПЦР: Термостат ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Использовали 25 мкл смеси: PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), прямой и обратный праймеры по 1 мкл/реакция 10 пмоль/мкл (Синтол, Россия), матрица ДНК 3 мкл. Оценивали результаты методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием при загрузке 1 мкл пробы.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ: MegaBACE 1000 Sequencing System (GE Healthcare / Amersham Biosciences, USA) с использованием реактивов: BrilliantDye™ Terminator, v 3.1., полимер NimaPOP 7, набор D-Pure™ для очистки продктов секвенирующей реакции (NimaGen, Netherlands).

Анализ хроматограмм выполнен в программе Chromas 2.3 «TechnelysiumPtyLtd» (Австралия) и визуально.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: ресурс BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) и программа MEGA 7.0.

Табл. 1. Список праймеров

Ис-точ-ник	Название праймера	Последовательность 5'-3'	Положение	ПЦР+
[1]	ParvoB19 2F2*	CCCGCGCTCTAGTACGCCCA		48% (15/31)
	ParvoB19 2R2*	TTGCGGGGGCCCAGCTTGTA		
[2]	NSsfwd	GCAATGGCCATTGCTAAAAGTG	1447–1468	42% (13/31)
	Nsorev*	TTTGYAATCCAGACAGGTAAGC	2431–2410	
[3]	E1855f	CACTATGAAAACTGGGCAA	1855 - 1873	0
	B19-R1	GGGAACTTCCGGCAAACTTCCTTG	2588 -2611	
	E1863f	AAACTGGGCAATAAACTACAC	1863 - 1883	48% (15/31)
	B19-R2	GTAGTCTTTTACTACTTGTGCTTG	2525 - 2548	
[4]	E1855f	CACTATGAAAACTGGGCAA	1855 - 1873	19% (6/31)
	e2960r	ACAATTCTTCATCTGCTAC	2960 - 2978	
	e1863f	AAACTGGGCAATAAACTACAC	1863 - 1883	61% (17/28)
	e2953r	CTTCATCTGCTACCGTCCAA	2953 - 2972	
[5]	PVB-1	CACTATGAAAACTGGGCAATAAAC	1747 - 1770	35% (11/31)
	B19SR	CCAGGCTTGTGTAAGTCTTC	2691 - 2672	
	PVB-3	ATAAACTACACTTTTGATTTCCCTG	1765 - 1789	35% (7/20)
	B19SR	CCAGGCTTGTGTAAGTCTTC	2691 - 2672	

* Праймер отличается от опубликованного

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

На примере ограниченного числа проб были испытаны праймеры для секвенирования локуса NS1-VP1u генома B19V из пяти протоколов. В протоколах [1, 3] применение гнездового ПЦР оказалось нецелесообразным. Лучшие результаты (74%, 23/31) получены для варианта гнездового ПЦР [4] (табл.1).

Для некоторых праймеров длина последовательности оказалась короче планируемой из-за наличия шпильки в матрице ДНК.

Табл. 2. Результаты ПЦР

Число протоколов ПЦР+	5	4	3	2	1	0	Всего
Количество проб, абс. число	5	8	5	1	6	6	31
Доля образцов, %	16,1	25,8	16,1	3,2	19,4	19,4	100

Рис. 2. Филогенетичские связи полученных последовательностей: метод Neighbor-joining, bootstrap анализ для 500 повторов.

На Северо-Западе России циркулируют изоляты генотипа 1A, линии 1A2 и 1A1 (рис. 2). GenBank accession no.: PP755159, PP755157, PP734593, PP755158, PQ120388, PP734595, PP734596, PP734597, PP104511, PP129631, PP129632, PP658206, PP203225.

Для создания алгоритма молекулярно-генетического анализа штаммов B19V исследование в данном направлении следует продолжить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Хамитова И.В.,и др. ЖМЭИ. 2018. Т. 95, №6. С. 55-61. doi: 10.36233/0372-9311-2018-6-55-61 https://microbiol.elpub.ru/jour/article/view/329

2. Hokynar K.,et al. Journal of General Virology (2000), 81, 1017–1025. https://www.researchgate.net/publication/12591360_Integrity_and_full_coding_sequence_of_B19_virus_DNA_persisting_in_human_synovial_tissue

3. Hübschen Ju.M., et al. , J. of clinical microbiology, 2009; 47(11):3735–3738. doi:10.1128/JCM.01201-09 https://jcm.asm.org/content/jcm/47/11/3735.full.pdf

4. Servant, et al. 2002;76(18):9124-34. doi: 10.1128/jvi.76.18.9124-9134. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12186896/

5. Candotti D.,et al. J.of virology, 2004; 78(22). https://doi.org/10.1128/jvi.78.22.12169-12178.2004

6. Guan W., et al. J. of virology, 2009;83 (18):9541–9553. doi:10.1128/JVI.00702-09 https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2738243/pdf/0702-09.pdf

7. Bua G., et al. PLoS ONE 2016; 11(2): e0148547. doi:10.1371/journal. pone.0148547

Переписка: anti130403@mail.ru