

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Марданлы С.С.¹, Марданлы С.Г.¹, Казаков А.А.², Дёмкин В.В.², Затевалов А.М.³, Миронов А.Ю.^{3,4}

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 7 ТИПА

¹ЗАО «Эколаб», Электрогорск, 142530. Россия;

²ФГБУ «Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия;

³ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Разработана ПЦР-тест-система для детекции ДНК вируса герпеса человека 7 типа. Поиск и отбор консервативных участков проведён, сравнивая полногеномные нуклеотидные последовательности ВГЧ-7. В качестве мишени для амплификации выбран дублированный в геномах ВГЧ-7 фрагмент. Отработка работоспособности тест-систем проведена на синтетической матрице и клиническом материале. Разработанная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью и показала хорошую эффективность выявления ДНК ВГЧ-7 в клиническом материале.

Ключевые слова: ПЦР-тест-система; ВГЧ-7; ВГЧ7; ПЦР; молекулярно-генетический анализ.

Для цитирования: Марданлы С.С., Марданлы С.Г., Казаков А.А., Демкин В.В., Затевалов А.М., Миронов А.Ю. Разработка ПЦР-тест-системы для детекции вируса герпеса человека 7 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11): 658-662. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-658-662>

Для корреспонденции: Затевалов Александр Михайлович, гл. науч. сотр. лаб. диагностики и профилактики инфекционных заболеваний: e-mail: zatevalov@gabrich.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 27.09.2022

Опубликовано 00.11.2022

Mardanly S.S.¹, Mardanly S.G.¹, Kazakov A.A.², Demkin V.V.², Zatevalov A.M.³, Mironov A.Yu.^{3,4}

DEVELOPMENT OF A PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF HUMAN HERPES VIRUS TYPE 7

¹CJSC «Ekolab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²Federal State Budgetary Institution "Institute of Molecular Genetics, National Research Center "Kurchatov Institute", 123182, Moscow, Russia;

³G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology of the Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

⁴Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

A PCR assay has been developed to identify the DNA of the human herpes virus type 7. The search and selection of conserved regions was carried out by comparing the whole genome nucleotide sequences of HHV-7. A fragment duplicated in the HHV-7 genomes was chosen as a target for amplification. The performance of the assay was tested on a synthetic matrix and clinical samples. The developed assay has high sensitivity and specificity and showed good efficiency in detecting HHV-7 DNA in clinical samples.

Key words: PCR assay; HHV-7; HHV7; PCR; molecular genetic analysis.

For citation: Mardanly S.S., Mardanly S.G., Kazakov A.A., Demkin V.V., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu. Development of a PCR assay for the detection of human herpes virus type 7. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (11): 658-662 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-11-658-662>

For correspondence: Zatevalov A.M., Chief Researcher, Laboratory for Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases; e-mail: zatevalov@gabrich.ru

Information about authors:

Mardanly S.S., <https://orcid.org/0000-0002-4440-6075>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Kazakov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5559-6003>;

Demkin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3408-6100>;

Zatevalov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 17.08.2022

Accepted 27.09.2022

Published 14.11.2022

Введение. Вирусы герпеса человека (ВГЧ), образующие достаточно многочисленное семейство и вызывающие различные заболевания, после первичного инфицирования могут персистировать в латентной форме и реактивироваться при снижении иммунитета или вследствие других причин. Изученность их встречаемости в популяции, возможных взаимосвязей в ходе инфицирования и персистенции, факторов риска и взаимораспределения в органах и тканях инфицированных пациентов остается недостаточной [1].

Герпесвирусы человека 7 типа (ВГЧ-7) относятся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus* [1;3]. Среди герпесвирусов человека ВГЧ-7 наиболее близок к вирусу герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6), который также относится к розеоловирусам, то есть вирусам, вызывающим розеола у детей [1].

Геномные структуры (коллинеарность) ВГЧ-7 и ВГЧ-6 схожи, но гомология между геномами незначительная, и геном ВГЧ-7 приблизительно на 10% короче. Вирусы обладают антигенным родством, что приводит к кросс-реактивности в серологических реакциях [4]. В отличие от ВГЧ-6, у которого выявляют 2 генетических варианта А и В, внутривидовая вариабельность ВГЧ-7 менее выражена, генетические варианты у ВГЧ-7 в настоящее время не выделяют.

ВГЧ 6 и 7-го типа дети заражаются в младенческом возрасте или в раннем детстве, после чего вирусы персистируют в организме пожизненно [5]. Первичная инфекция сопровождается неспецифическим лихорадочным заболеванием или проявляется как синдром розеола [6]. После первичной инфекции ВГЧ-6 вирус остается персистирующим или латентным с множественной локализацией в мононуклеарных клетках периферической крови, в слюнных железах, центральной нервной системе. У иммунокомпрометированных лиц реактивация ВГЧ-6 сопровождается лихорадкой, энцефалитом, сыпью, отторжением трансплантированных органов [7, 8].

ВГЧ 7 типа – лимфотропный вирус, генетически тесно связанный с ВГЧ-6 [9]. ВГЧ-7 вызывает розеола у детей реже, чем ВГЧ-6. Заражение ВГЧ-7 происходит позднее, но клиническая картина неотличима от заражения ВГЧ-6. Заражение ВГЧ-6 и ВГЧ-7 могут вести к тяжёлым неврологическим осложнениям, включая энцефалит и синдром Гийена-Барре [10].

ВГЧ-7 обладает избирательным тропизмом только к CD⁺ Т-лимфоцитам. ВГЧ-7 выявляют в лимфоидной ткани, слюнных железах, миндалинах, печени, почках, лёгких, кожных покровах. После проникновения ВГЧ-7 в организм через кровь или дыхательные пути, о механизмах развития заболевания имеется мало сведений. Предполагается, что очагами латентной инфекции ВГЧ-7 являются CD₄⁺ Т-лимфоциты [9].

Наибольшую опасность ВГЧ-7, как и другие розеоловирусы, представляет его реактивация, которая может вызвать серьёзные заболевания у иммунокомпрометированных лиц. К этой категории лиц относятся реципиенты трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, реципиенты паренхиматозных органов, а также пациенты с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) [10, 11].

Вышеперечисленное диктует необходимость разработки диагностических методов (систем) для индикации и идентификации розеоловирусов в клиническом материале.

Цель исследования – разработка тест-системы для выявления ВГЧ 7 типа методом ПЦР.

Материал и методы. Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проведён с использованием сетевого сервиса Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), выбор участков, пригодных для подбора амплификационных мишеней проведён с использованием авторской программы [12], анализ специфичности праймирования *in silico* проведён с использованием сетевого сервиса PRIMER BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Выделение ДНК из клинического материала проводили с использованием наборов Рибопреп (Интерлабсервис, Россия). ДНК элюировали в 100 мкл 0,1 М Трис-ЭДТА буфер (рН 8,3). В ПЦР брали 5 мкл. Амплификацию проводили в 30 мкл раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl рН – 8,3, 22 мМ (NH₄)₂SO₄, 3,5 мМ MgCl₂, 0,05% Tween 20, 100 мкМ dNTP, 2,5 ЕД Таq-ДНК полимеразы. Режим амплификации: 40 циклов 95° 10 с, 60° 20 с, 72° 10 секунд. Праймеры и искусственную матрицу синтезировали в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия), зонды в ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия). В качестве положительного контроля использована синтетическая одонитевая ДНК, воспроизводящая последовательность ампликона. ПЦР проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США).

Для получения аналитических характеристик готовили линейку десятикратных разведений искусственной матрицы в диапазоне концентраций 10⁸ – 10 ГЭ/мкл. В буфер для разведения добавляли препараты ДНК, выделенной из крови человека, для максимального приближения к условиям клинических исследований.

Результаты. В данной работе исследовали присутствие вирусов герпеса человека ВГЧ-6 и ВГЧ-7, которые, также как и цитомегаловирус, ВГЧ-5, относятся к бета-герпесвирусам, а также вируса Эпштейн-Барра (ВЭБ, семейство гамма-герпесвирусов) в клинических образцах. Для этих целей определяли наличие специфической вирусной ДНК в предоставленных пробах слюны и сыворотки пациентов при помощи ПЦР в режиме реального времени.

В первом эксперименте 10 образцов слюны, ПЦР-положительных на ДНК ВГЧ-6, были дополнительно проанализированы при помощи качественной ПЦР в реальном времени для определения ВГЧ-7. В 4-х из десяти случаев (40,0%) при тестировании была обнаружена ДНК ВГЧ-7, что свидетельствует о возможной персистенции у значительной части пациентов обоих вирусов.

Во втором эксперименте было использовано 20 образцов слюны и 10 образцов сыворотки, положительных в исследовании на ВГЧ-6. 15 из 20 (75%) образцов слюны и только один из 10 образцов (10%) сыворотки показали присутствие ВГЧ-7, позволяя предположить схожий профиль выявляемости данных вирусов в слюне пациентов и существование возможных различий по их обнаружению в крови при клиническом проявлении инфекции.

В третьей подборке были собраны 10 проб слюны, положительных на ВЭБ, которые также были проверены в исследовании на ВГЧ7 и показали присутствие только 1-й (10%) положительной пробы, предполагая достаточно редкую персистенцию ВГЧ-7 и ВЭБ в противоположность ВГЧ-6.

Подбор последовательностей праймеров. Праймеры подбирали на основании анализа полногеномных последовательностей ВГЧ-7, имеющихся в базе нуклеотидных последовательностей GenBank на 14.01. 2022 г. В качестве референс последовательности выбрана последовательность ВГЧ-7 AF037218.1. В аннотации к данной последовательности указано, что фрагмент с координатами 1..10034 представлен в геноме как повторяющаяся последовательность. После выравнивания этого фрагмента с использованием BLAST выяснилось, что копии данного фрагмента не у всех ВГЧ-7 представлены полноценно. В частности, в последовательности U43400.1 одна из копий встречалась в усечённом виде – недоставало 4-х тыс. нуклеотидов. Исходя из этого, для дальнейшего анализа выбран фрагмент с координатами 3990-9720, который присутствовал во всех 3-х имеющихся в базе данных полногеномных последовательностях ВГЧ-7. В результате последующего анализа внутривидовой вариабельности и температурных профилей плавления фрагмента 3990-9720 при использовании собственной оригинальной программы выбрано 2 участка, которые положены в основу разработки 2-х альтернативных систем праймеров: HV7IT+HV7JBr и HV7NA+HV7NIr.

Оценка специфичности работы праймеров. Результаты *in silico* анализа специфичности подобранных праймеров представлены в табл. 1.

Праймеры обладают 100% гомологией и с последовательностями ВГЧ-7, при отсутствии какой-либо гомологии с другими вирусами и организмами.

Поскольку разрабатываемая тест-система предназначена для клинической лабораторной диагностики образцов, полученных от человека, содержащих большое количество ДНК хозяина, то остается риск формирования неспецифических продуктов. Для оценки этого риска проведена эмпирическая оценка специфичности работы праймеров на отрицательных образцах ДНК человека. С каждой парой праймеров проведён анализ 4-х образцов ДНК человека, с доказанным отсутствием ВГЧ-7. Результаты постановки ПЦР представлены на рис. 1, а, б.

На отрицательных образцах, т. е. в отсутствии специфической матрицы, при наличии высокой концентрации ДНК человека возможно образование неспецифических продуктов на поздних циклах амплификации. При этом для системы праймеров HV7IT+HV7JBr пересечение порога амплификации *Ct* происходит на более поздних циклах (29-31), а для системы HV7NA+HV7NIr — на более ранних (26-30). Наименьший уровень неспецифичности показала система HV7IT+HV7JBr, для которой разработан Taqman-зонд. Работа системы с зондом на линейке разведений положительной матрицы продемонстрирована на рис.2.

Значения *Ct*, полученные на разных разведениях матрицы и аналитические характеристики системы, рассчитанные на этом основании, приведены в табл. 2 и 3.

Разработанная тест-система использована для изучения распространения ВГЧ-7 в слюне пациентов, положительных на ВГЧ-6 или вирус Эпштейн-Барра (ВЭБ). Проанализировано 30 образцов слюны, ПЦР-положительных на ДНК ВГЧ-6. В 19 из 30 образцов слюны (63,3%) при тестировании обнаружена ДНК ВГЧ-7, что свидетельствует о совместной персистенции обоих вирусов у значительной части пациентов.

В другой независимой подборке, состоящей из 10 проб слюны, положительных на ВЭБ, исследование на ВГЧ-7 выявило только 1 (10%) положительную пробу,

Таблица 1

Специфичность праймеров в «Primer Blast»

Номер последовательности	Организм	Длина продукта	HV7IT	HV7JBr
KF558370.1	Human herpesvirus-7	92
KF558370.1	Human herpesvirus-7	92
AF037218.1	Human herpesvirus-7	92
AF037218.1	Human herpesvirus-7	92
U43400.1	Human herpesvirus-7	92
U43400.1	Human herpesvirus-7	92
KF558370.1	Human herpesvirus-7	98
KF558370.1	Human herpesvirus-7	98
AF037218.1	Human herpesvirus-7	98
AF037218.1	Human herpesvirus-7	98
U43400.1	Human herpesvirus-7	98
U43400.1	Human herpesvirus-7	98

Примечание. Точками обозначены гомологичные позиции.

Таблица 2

Значения Ct на разных разведениях матрицы

Разведение матрицы	Концентрация матрицы копий/мкл	Повторность				Ct средняя
		1	2	3	4	
-12	60	35,66	-	35,42	-	35,5
-11	600	32,87	-	33,03	33,27	33,1
-10	6000	29,72	29,83	29,33	29,5	29,6
-9	60000	26,22	26,48	26,14	26,43	26,3
-8	600000	23,19	23,16	23,01	23,04	23,1

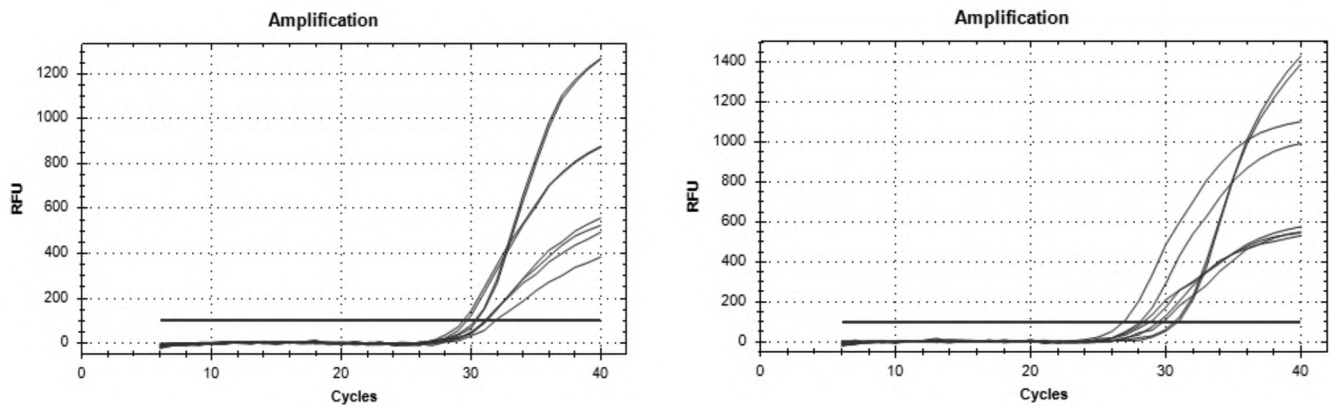
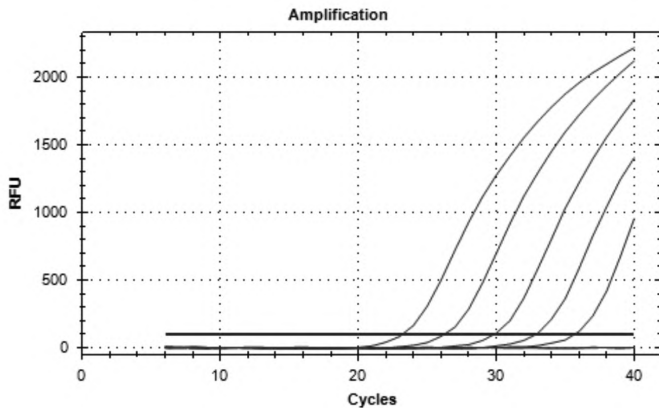


Рис. 1. Кривые амплификации, полученные с использованием систем праймеров. а – HV7IT+HV7JBr; б – HV7NA+HV7NIr.

Таблица 3

**Аналитические характеристики тест-системы
 HV7IT+HV7JBr+pbHV7IY**



Показатель	Значение
E (%)	103,6
M (Ct)	-3,158
R	0,99
R ²	0,998
LOD (Копий/реакцию)	60

Примечание. E – эффективность ПЦР, M – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R² – коэффициент детерминации, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности [15].

Рис. 2. Работа системы HV7IT+HV7JBr+pbHV7IY на положительной матрице. Линейка разведений 10⁻⁸-10⁻¹².

Таблица 4

Сравнение выявляемости ВГЧ-7 и ВГЧ-6 с результатами, полученными для клинических образцов

№	Образцы слюны положительные ВГЧ7/ВГЧ6	Образцы сыворотки положительные ВГЧ7/ВГЧ6	Образцы слюны положительные ВГЧ7/ВЭБ
1	4/10 – 40%		
2	15/20 – 75%	1/10 – 10%	
3			1/10 – 10%

что предполагает достаточно редкую совместную персистенцию ВГЧ-7 и ВЭБ в противоположность ВГЧ-6.

Шесть положительных проб слюны в тестах с разработанной тест-системой на ВГЧ-7, повторно исследованы методом ПЦР в реальном времени на наличие вирусной ДНК с использованием альтернативной тест-системы на выявление ВГЧ 6 и 7 типов, производства ООО «Нанодиагностика». Подтверждено наличие ДНК ВГЧ 6 и 7 типов.

На основании полученных данных можно предположить, что ВГЧ6 и ВГЧ-7, относящиеся к одной и той же бета-группе герпесвирусов, могут иметь сходную картину распределения в слюне инфицированных пациентов. Сравнение выявляемости ВГЧ-7 и ВГЧ-6 с результатами, полученными для образцов, содержащих ДНК ВЭБ, указывает на меньшую вероятность такой корреляции (табл. 4).

Полученные результаты могут свидетельствовать о необходимости более детального исследования распределения ВГЧ-6 и ВГЧ-7 в пробах пациентов, предполагающих присутствие герпесвирусной инфекции. Клинические проявления при возможной реактивации данных герпесвирусов также требуют дополнительного изучения.

Заключение. Разработана отечественная ПЦР тест-система, которая позволяет эффективно детектировать ДНК ВГЧ-7 в клинических образцах.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4-10, 12, 13
см. REFERENCES)

1. Марданлы С.С., Марданлы С.Г. Вирус герпеса седьмого типа. Обзор литературы. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2021.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. 3-е изд., исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
11. Контаров Н.А., Круглов И.В., Маркушин С.Г., Погарская И.В., Ртищев А.А., Юминова Н.В. и др. Актуальные проблемы современной вирусологии. Коллективная монография. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2021.
13. Дёмкин В.В. Использование табличного редактора Excel для анализа выровненных нуклеотидных последовательностей. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2010; 3: 40-1.

REFERENCES

1. Mardany S.S., Mardany S.G. Herpes virus type seven. literature review. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarnotekhnologicheskii universitet; 2021. (in Russian)
2. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S.F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596-601.
3. Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook for Students of Medical Universities [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., eds. 3rd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
4. Caserta M.T. 207 – Human Herpesviruses 6 and 7 (Roseola, Exanthem Subitum). Sarah S. Long, Charles G. Prober, Marc Fischer, eds. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 4th ed. Elsevier. 2018; 1081-8e4. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00207-3.
5. Hall C.B., Long C.E., Schnabel K.C., Caserta M.T., McIntyre K.M., Costanzo M.A. et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Eng. J. Med.* 1994; 331: 432-8.
6. Braun D.K., Dominguez G., Pellett P.E. Human herpesvirus 6. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 521-67.
7. Caserta M.T., Mock D.J., Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 829-33.
8. Yoshikawa T., Asano Y., Ihira M., Suzuki K., Ohashi M., Suga S. et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 847-53.
9. Frenkel N., Schirmer E.C., Wyatt L.S., Katsafanas G., Roffman E., Danovich R.M., June C.H. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1990; 87(2):748-52.
10. Schwartz K.L., Richardson S.E., Ward K.N., Donaldson C., MacGregor D., Banwell B. et al. Delayed primary HHV-7 infection and neurologic disease. *Pediatrics*. 2014; 133(6):e1541-7.
11. Kontarov N.A., Kруглов I.V., Markushin S.G., Pogarskaya I.V., Rtishchev A.A., Yuminova N.V. et al. Current problems of modern virology. Orekhovo-Zuevo: Gosudarstvennyi gumanitarnotekhnologicheskii universitet; 2021. (in Russian)
12. Demkin V.V. Using the Excel Spreadsheet Editor to Analyze Aligned Nucleotide Sequences. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya, virusologiya*. 2010; (3):40. (in Russian)
13. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009 Apr; 55(4): 611-22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.