

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-196

**ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР И ТЕХНОЛОГИЙ NGS
ДЛЯ МОНИТОРИНГА ШИРОКОГО СПЕКТРА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ**

**APPLICATION OF MULTIPLEX PCR AND NGS TECHNOLOGIES FOR IDENTIFICATION
OF A WIDE RANGE OF VIRAL PATHOGENS**

М. И. Надтока^{1,2}, А. В. Пересадина¹, А. Ю. Бухарина¹, М. Р. Аглетдинов^{1,5},
Г. В. Роев^{1,3}, К. Ф. Хафизов¹, В. Г. Акимкин¹

¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный

M. I. Nadтока^{1,2}, A. V. Peresadina¹, A. Y. Bukharina¹, M. R. Agletdinov^{1,5}, G. V. Roev^{1,3}, K. F. Khafizov¹, V. G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

²Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ maximnadтока@gmail.com

Аннотация

Сегодня мало у кого остались сомнения в значимости проведения надзора за вирусными патогенами, вызывающими заболеваемость населения. Интеграция технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) в сферу диагностики вирусных инфекций позволила идентифицировать вирусы на основе анализа геномных последовательностей. Мы разработали методику идентификации широкого спектра вирусных патогенов при помощи мультиплексной ПЦР в сочетании с NGS.

Abstract

Nowadays there are no doubts on the importance of surveillance of viral pathogens that cause infections in our population. The integration of next-generation sequencing (NGS) into the viral infection diagnostics has made it possible to identify viruses precisely based on their genomic sequences. We have developed a technique for identification of a wide range of viruses using multiplex PCR combined with NGS.

Вирусы представляют собой одни из наиболее распространенных и филогенетически разнообразных биологических объектов на нашей планете. Как следствие, вирусные инфекции занимают лидирующие позиции среди ведущих причин смертности населения по всему миру. Несмотря на то что нам известно множество представителей вирусов, способных вызвать заболевание у человека, основное внимание в контексте лабораторной диагностики уделяется вирусам, обладающим пандемическим потенциалом, в частности вирусам гриппа или бета-коронавирусам (SARS, MERS, SARS-CoV-2). Несомненно, вспышки инфекций, вызванные данными патогенами, оставили наиболее заметный след в новейшей истории и безусловно заслуживают пристального внимания. Однако в постковидную эпоху устройство эпидемиологического надзора преобразилось, и сегодняшние тренды нацелены не только на надзор за потенциально пандемическими возбудителями инфекций, но и на постоянное отслеживание разнообразия циркулирующих патогенов.

Проведение такого мониторинга стало возможным благодаря активному внедрению технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) в область диагностики вирусных инфекций. В отличие от традиционных молекулярно-генетических методов, несомненно обладающих массой преимуществ, технологии NGS позволяют получать огромные объемы генетических данных, что, в свою очередь, открывает путь не только к точной идентификации вируса, но и к детальному изучению его свойств.

Существует несколько подходов к секвенированию вирусных патогенов, из которых наиболее часто используемым является ампликонное секвенирование. Преимущество данного подхода заключается в генерации огромного количества специфичных прочтений и сведению неспецифичных, таких как прочтения фрагментов генома человека, к минимуму, что достигается за счет предварительной ПЦР-амплификации фрагментов вирусных геномов. К тому же, придерживаясь такого подхода к секвенированию, становится возможно использовать

мультиплексные праймерные панели. Формат мультиплекс подразумевает объединение множества пар праймеров для амплификации разных мишеней в одной или нескольких пробирках. В рамках диагностики вирусных инфекций такой подход позволяет проводить одновременную амплификацию фрагментов геномов разных вирусов сразу для множества образцов, а его совокупное использование с технологиями NGS дает возможность произвести их анализ с исключительной точностью.

Нами разработана мультиплексная праймерная панель для амплификации и секвенирования коротких консервативных участков геномов 28 вирусных патогенов, в основном являющихся возбудителями респираторных заболеваний. Эта панель позволяет идентифицировать такие патогены, как вирусы гриппа, альфа- и бета-коронавирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, пареховирусы, вирусы парагриппа, метапневмовирусы, бокавирусы, аденовирусы, вирусы ветряной оспы, цитомегаловирус и вирус Эпштейна — Барр. Праймеры в составе панели имеют на 5'-конце модификацию, представляющую собой адаптерную последовательность Nextera, что позволяет практически незамедлительно перейти к этапу баркодирования при подготовке ДНК-библиотек для секвенирования. Таким образом, использование разработанной панели не только существенно сокращает время пробоподготовки и ее стоимость, но и делает возможной точную идентификацию широкого спектра вирусов.

С помощью данной мультиплексной панели нами были исследованы две группы клинических образцов, где первая группа была представлена образцами ($n = 300$), прошедшими тестирование на SARS-CoV-2 с отрицательным результатом. Вторая группа состояла из образцов ($n = 200$), проанализированных при помощи тест-системы для одновременного выявления нескольких патогенов.

Мы провели секвенирование части успешно прошедших амплификацию образцов из первой группы ($n = 60$), в результате чего было установлено, что 50 % образцов содержали вирус Эпштейна — Барр; 22 % были представлены вирусом гриппа А (H3N2); в 11 % образцов идентифицирован респираторно-синцитиальный вирус человека подтипа В; 5,5 % образцов содержали вирус гриппа А (H1N1), аденовирус человека с генотипом В и метапневмовирус человека с генотипом А. По итогам исследования 131 образца из второй группы нами получены следующие результаты: 44 % образцов содержали вирус Эпштейна — Барр; в 32 % образцов обнаружен аденовирус человека с генотипом В; по 7 % пришлось на аденовирус человека с генотипом С и SARS-CoV-2; 3 % образцов содержали вирус парагриппа человека с серотипом 3; в 2 % образцов обнаружен вирус гриппа В, респираторно-синцитиальный вирус человека подтипа В и вирус гриппа А (H3N2).