

## ПРЕОДОЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА Е ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ДИАГНОСТИКИ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР-РВ

*Бабенко А. С.<sup>1</sup>, Давыдов В. В.<sup>1</sup>, Жаворонок С. В.<sup>1</sup>,  
Марчук С. И.<sup>1</sup>, Борисовец Д. С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

<sup>2</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского  
Минск, Беларусь

*labmdbt@gmail.com, davidovvv@bsmu.by*

*zhavoronok.s@mail.ru, Marchuk\_s@mail.ru*

*Публикация посвящена дизайну и оптимизации ОТ-ПЦР-РВ тест-системы для выявления вируса гепатита Е в образцах биологического материала с использованием олигонуклеотидов, содержащих вырождения для преодоления генетического полиморфизма генома вируса гепатита Е. Авторами разработана ОТ-ПЦР-РВ тест-система обладающей высокой специфичностью в отношении выявления РНК вируса гепатита Е.*

**Ключевые слова:** *генетический полиморфизм, вирус гепатита Е. ОТ-ПЦР-РВ, тест-система.*

## OVERCOMING GENETIC POLYMORPHISM OF HEPATITIS E VIRUS RNA TO IMPROVE THE QUALITY OF DIAGNOSTICS BY REVERSE TRANSCRIPTIONAL REAL TIME PCR

*Babenka A.S.<sup>1</sup>, Davydov V.V.<sup>1</sup>, Zhavoronok S.V.<sup>1</sup>, Marchuk S.I.<sup>1</sup>, Borisovets D.S.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University,

<sup>2</sup>Institute of Experimental Veterinary Medicine. S. N. Vyshellesskiy  
Minsk, Belarus

*The publication is devoted to the design and optimization of an RT-PCR test system for detecting hepatitis E virus in biological samples using oligonucleotides containing degeneration to overcome the genetic polymorphism of the hepatitis E virus genome. The authors have developed an RT-PCR test system with high specificity in relation to the detection of RNA of the hepatitis E virus.*

**Key words:** *genetic polymorphism, hepatitis E virus, RT-PCR, test system/*

**Введение.** Вирус гепатита Е (ВГЕ) способен вызывать как острые, так и хронические гепатиты. В большинстве случаев, инфекция протекает практически бессимптомно и проходит без осложнений, однако, согласно данным ВОЗ ежегодно фиксируется более 20 000 000 случаев этого заболевания. Порядка 15-20% случаев протекает с выраженной симптоматикой и часть из них приводит к летальному исходу. В количественном выражении ВГЕ несет ответственность за десятки тысяч смертей по всему миру. Учитывая достаточно большое число способов передачи его от животных человеку и от человека к человеку, специалисты не могут пренебречь угрозой ВГЕ. Например, в общей популяции смертность от гепатита Е колеблется от 0,1% до 4%, а среди женщин в третьем триместре беременности может составлять 10-50% [1, 2].

Наиболее эффективным методом выявления ВГЕ считается ОТ-ПЦР-РВ со специфическими праймерами и зондами к консервативным областям генома вируса. В тоже время, высокая степень полиморфизма генома ВГЕ делает сложной рутинную диагностику, оставляя ложноотрицательными порядка 50% всех анализируемых образцов. На серьезность проблемы указывает и наличие упоминания о ней непосредственно в инструкциях к диагностическим наборам (Instructions for Use RealStar®HEV RT-PCR Kit 2.0, Altona Diagnostics, Germany). Одним из возможных вариантов решения проблемы является конструирование и оптимизация ОТ-ПЦР-РВ тест-системы использующей праймеры и зонды с вырождениями, способными полностью или, что более вероятно, частично компенсировать полиморфизм генома ВГЕ и повысить качество диагностики [3, 4].

В связи с этим **целью** настоящей работы является дизайн и оптимизация ОТ-ПЦР-РВ тест-системы для выявления РНК ВГЕ в образцах биологического материала человека и др. млекопитающих, использующей олигонуклеотиды с вырождениями.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены образцы каловых масс, цельной крови, мочи и желчи, полученные от пациентов с установленным диагнозом гепатита (n = 80). Пациенты у которых был подтвержден вирусный гепатит типа А, В или С исключались из исследования. Также исследовали образцы каловых масс и желчи домашних свиней (n = 48), каловых масс диких кабанов (n=24) и кроликов (n=12; содержались в виварии). Образцы были забраны и подготовлены в течение периода 2017 – 2021 гг. Выбор генетических локусов и анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ (3 генотиптип), полученных из GenBank (525 отсеквенированных последовательностей генома) выполняли с помощью программного обеспечения Ugene v.1.31.1 (UniPro, Россия). Дизайн и анализ пригодности олигонуклеотидных праймеров для проведения ОТ-ПЦР-РВ осуществляли при помощи on-line сервисов Primer3 и OligoAnalyzer3.1.

В качестве референсного метода использовали коммерческий набор реагентов «HEV RT-PCR Kit 2.0» (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия), а также «in house» гнездовую ПЦР с праймерами доступными в литературных источниках. Для проведения ОТ-ПЦР-РВ с разработанными праймерами использовали реагенты производства ОДО «Праймтех» (Беларусь) а также использовали приборы ДТ-322 (ДНК-Технология, РФ), CFX96, CFX96touch и CFX connect (Bio-Rad, США).

**Результаты.** В результате дизайна олигонуклеотидных праймеров и модификации определенных сайтов вырождениями был получен комплект кандидатов, включающий прямой/обратный праймеры и зонд, которые обладали существенно более высокой специфичностью в отношении изучаемых последовательностей ВГЕ. Комплект праймеров ориентированных на ОРС2/ОРС3 (локусы генома ВГЕ), используемых в коммерческих наборах при проведении ОТ-ПЦР-РВ: Прямой 5' – GGTGGTTTCTGGGGTGAC – 3', специфичность 50,7%; Обратный 5' – AGGGGTTGGTTGGATGAA – 3', специфичность 98,1%; зонд 5' – FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB – 3', специфичность 93,1%. Оптимизированный комплект праймеров, используемых

для проведения ПЦР-РВ, и их специфичность относительно изученных 525 выровненных полногеномных последовательностей ВГЕ: прямой 5' – GCRGTGGTTTCTGGGGTG – 3', специфичность 98,3%; обратный 5' – AAGGGGTTGGTTGGATGA – 3', специфичность 98,1%; зонд 5' – FAM-GGYTGATTCYCAGCCCTT-BHQ1 – 3', специфичность 96,4%.

Расчетная специфичность детекции выбранных для изучения полногеномных последовательностей составила 490/525 (93,3%±0,42 p<0,001).

При использовании разработанного нами набора реагентов для ОТ-ПЦР-РВ РНК ВГЕ была выявлена в 60% случаев. Референсный метод («RealStar®\_HEV\_RT-PCR\_Kit\_2.0») позволил выявить РНК ВГЕ в 50% образцов. Второй референсный метод (гнездовая ПЦР) позволил выявить РНК ВГЕ) в 40% случаев. Из всех положительных образцов, полученных при помощи гнездовой ПЦР, коммерческим набором было подтверждено 75% и 83% подтверждений было получено с помощью разработанного ОТ-ПЦР-РВ. Таким образом, внесенные изменения в последовательности праймеров и зонда увеличили аналитическую специфичность разработанной нами тест-системы.

### Список литературы

1. Yeboah, R. Sero-molecular epidemiology of hepatitis E virus in pigs and human contacts in Ghana / R. Yeboah, A. A. Sylverken, M. Owusu, P. El-Duah, V. Burimuah, Y. Frimpong, J. Lamptey, I. Eckerle, B. Meyer, C. Antwi, O. Agbenyaga, R. Folitse, B. Emikpe, S. K. Oppong, Y. Adu-Sarkodie, C. Drosten // *One Health Outlook*. – 2021. – V. 3. – P. 13.
2. Weekly epidemiological record. – Режим доступа: [www.who.int/wer/2015/wer9018.pdf?ua=1](http://www.who.int/wer/2015/wer9018.pdf?ua=1).
3. Kozyra, I. Genetic Diversity and Epidemiological Significance of Wild Boar HEV-3 Strains Circulating in Poland / I. Kozyra, E. Bigoraj, A. Jabłoński, K. Politi, A. Rzeżutka // *Viruses*. – 2021. – V. 13. – P. 1176.
4. Hriskova, K. Epidemiology of Hepatitis E in 2017 in Bavaria, Germany / K. Hriskova, D. Marosevic, A. Belting, J. J. Wenzel, A. Carl, K. Katz // *Food Environ Virol*. – 2021. – doi: 10.1007/s12560-021-09474-0. Online ahead of print.