

ва, И.В. Самородская, О.М. Драпкина // Профилактическая медицина. – 2024. – №27(4). – С. 82–88. <https://doi.org/10.17116/profmed20242704182>

5. Нечай, С.В. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2024 году / С.В. Нечай // Доклад – 2025. – № 12. – С. 40-41, 81-82.

6. Баканов, И.С. Эпидемиологические особенности и совершенствование профилактики острых респираторных инфекций у военнослужащих / И.С. Баканов, И.В. Федорова, Д.Ю. Клименков // Военная медицина. – 2025. – № 3(76). – С. 121–129.

7. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека // Государственный доклад. – М., 2025. – 424 с.

**Жаворонок С.В.¹, Бабенко А.С.², Давыдов В.В.¹,
Задора И.С.¹, Борисовец Д.С.³, Сурикова Н.А.⁴,
Колядко М.Г.², Карпуть И.А.⁵, Крылова Н.Г.⁶,
Грушевская Г.В.⁷, Чакуков Р.Ф.⁸,
Васьковцев Е.В.⁹, Баюр Н.Г.⁴,
Шафранская Е.А.¹, Пашенко Е.В.¹,
Криштафович О.П.¹**

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА Е В РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь

²РНПЦ «Кардиология», г. Минск, Беларусь

³Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, г. Минск, Беларусь

⁴УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», г. Минск, Беларусь

⁵УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь

⁶УО «Белорусский государственный аграрно-технический университет», г. Минск, Беларусь

⁷Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

⁸ООО «Умные ДНК Технологии», г. Минск, Беларусь

⁹УО «Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка», г. Минск, Беларусь

Введение. В Республике Беларусь выявлены автохтонные и завозные случаи вируса гепатита Е (ВГЕ). Эндемичным геновариантом ВГЕ для

Беларуси является генотип 3. Геном ВГЕ изолятов, полученных из организма человека и животных, обладают значительным генетическим полиморфизмом и кластеризуются с референсными последовательностями 3с, 3i, 3f, 3g и 3га субгенотипов ВГЕ. Штамм ВГЕ 1-го генотипа, был выделен из организма пациента в результате завоза из гиперэндемичной по ВГЕ территории. Латентный характер течения ВГЕ, спорадический характер заболеваемости острыми формами, составляющей 0,01-0,07 на 100 тыс. населения, и отсутствие зарегистрированных в установленном порядке средств диагностики предопределило неверное (ложное) представление у медицинских работников о ВГЕ, как экзотическом заболевании. Распространенность иммунологических маркеров перенесенного ГЕ у условно здорового населения составляет 7,3%, а в группе мужчин старше 64 лет достигает 12,9%, что свидетельствует о скрытом эпидемическом процессе ГЕ и гипозндемичности по ВГЕ территории Республики Беларусь [1].

Специалисты в области лабораторной клинической диагностики инфекционных заболеваний выделяют четыре основные глобальные проблемы отрасли, решение которых в значительной степени повысит эффективность современной медицины. Наряду с главным требованием к методам анализа – чувствительностью, выделяют время проведения анализа и стоимость анализа. В контексте собственно вирусных инфекций не меньшую роль отводят и способности метода к быстрой адаптации при выявлении новых возбудителей или изменчивости уже известных [2]. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (CDC), решение проблемы адаптивности метода зависит от ряда условий, среди которых быстрое получение данных о новом или измененном патогене, включая секвенирование его генома, а также формирование банков данных зараженного биологического материала и баз данных последовательностей ДНК/РНК. При этом «узким горлышком» называют этап разработки и валидации способа диагностики, который даже при ускоренной регуляции для экстренных ситуаций и использовании классического подхода ПЦР-РВ может занимать от 3 месяцев до года [3].

В последние годы все больше внимания уделяют использованию технологии нанобиосенсоров в лабораторной диагностике. Первые значимые успехи достигнуты в том числе бла-

годаря стимуляции отрасли во время пандемии, вызванной коронавирусом. В 2021 году группа французских исследователей успешно апробировала технологию биосенсоров, направленную на распознавание антигенов COVID19 в биологических образцах [4], что позднее позволило успешно завершить клинические испытания – NCT04367142 (2024 год). Позже в США была проведена аналогичная работа, однако биосенсоры использовались для выявления ряда вирусных антигенов для интеграции «домашний» анализатор (point of care) [5]. В настоящее время апробация разработки в клинике еще не завершена – NCT06548841. Самым известным и квалифицированным в клинике успехом внедрения технологии наносенсоров является Cobas Eplex System, система для in vitro (FDA) диагностики ряда вирусных и бактериальных патогенов, разработанная одним из подразделений международной компании Roche. Внедренная в практику более 10 лет назад технология является гибридной и использует сенсорные технологии для детекции результатов ПЦР [6].

На данном этапе развития технологии существует возможность использования ДНК наносенсоров без дополнительного увеличения стартового числа копий генома патогена в образце, что повышает специфичность анализа по сравнению с классическими подходами, основанными на классической ПЦР и ПЦР-РВ, а также изотермической амплификации. Наряду с этим очень важной особенностью сенсоров является возможность использования сравнительно коротких детектирующих зондов для гибридизации с молекулярными мишенями в образцах биологического материала. Это позволяет проводить анализ вариабельных геномов вирусов эффективнее, включая РНК вирусы после этапа обратной транскрипции [7, 8].

В рамках настоящего исследования осуществлено моделирование диагностической системы на основе технологии ДНК-наносенсоров. Модель ВГЕ – вариабельного РНК вируса, имеющего множество генотипов и субтипов, выбрана как наиболее сложная для данной цели.

Цель исследования – изучить генетическое разнообразие популяции вируса гепатита E (ВГЕ), в том числе эндемичных для территории Республики Беларусь, разработать методы выявления РНК ВГЕ в различных биологических средах с использованием электрохимической технологии ДНК-наносенсоров.

Материал и методы. Для первичного скрининга пациентов с диагнозом ВГЕ проводили исследование банка сывороток крови пациентов с симптомами поражения печени ИФА на анти-ВГЕ IgM и -IgG. Собран банк образцов биологического материала пациентов, проходящих лечение на базе Учреждения здравоохранения "Городская клиническая инфекционная больница" г. Минска в период 01.01.2025 – 30.11.2025 и имеющих признаки острых и хронических заболеваний печени, всего – 220 человек (плазма крови), 4 образца мочи. Собран банк образцов биологического материала от животных, потенциальных носителей ВГЕ: 31 образец экстракта кала (кролики, крысы), 11 образцов сточных вод из свиноферм. Также проанализирован банк сывороток крови, включающий 190 образцов, собранный в предыдущие годы.

Экстракты кала готовили путем добавления 2 мл физраствора к 1,0 грамму кала в 15 миллилитровых полиэтиленовых центрифужных пробирках, гомогенизации с помощью вертекс, центрифугирования при 3 тыс. об./мин. 30 минут и отбора для ПЦР прозрачного надосадка. Определение антител к иммуноглобулинам класса М и класса G (анти-ВГЕ) проводили с использованием фотометра «Витязь Ф300ТП» (ОАО «Витязь», Беларусь) и наборов реагентов «ИФА-анти-ВГЕ-IgG человека», «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» для определения антител классов М и G в сыворотке крови людей (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», ТУ ВУ 100185093.094-2023 и ТУ ВУ 100185093.093-2023 соответственно) согласно инструкции производителя. Для определения иммуноглобулинов класса М и G в крови диких и домашних животных вместо конъюгата, имеющегося в наборе, использовали раствор универсального конъюгата – белка А стафилококка, конъюгированного с пероксидазой хрена. Выделение общей фракции РНК проводили из образцов фекалий свиней, кроликов и крыс, образцов сточных вод и образцов цельной крови и фекалий пациентов, проходящих лечение на базе ГКИБ г. Минска и имеющих симптомы заболеваний печени, с использованием набора реагентов АРТ-РНК (Артбиотех, Беларусь) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов ArtMMLV Total (Артбиотех, Беларусь) согласно инструкции производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием набора реагентов «HEV RT-PCR Kit 2.0» (RealStar®,

Altona Diagnostics GmbH, Германия), а также «HEV PCR» (Институт экспериментальной ветеринарии, Республика Беларусь) в соответствии с протоколами производителей. Применялись амплификаторы для проведения ПЦР в режиме реального времени ДТ-322 («ДНК-Технология», РФ), CFX 96 Touch и CFX Connect (Bio-Rad, США).

Гибридизационные одноцепочечные зонды для распознавания кДНК, полученных из образцов РНК ВГЕ, разрабатывали на основании полногеномных последовательностей РНК ВГЕ с использованием бесплатного программного пакета Ugene v. 50.0 (Unipro, РФ) и встроенных алгоритмов выравнивания MUSCLE и ClustalW. Использовали последовательности РНК ВГЕ (не менее 80% от общей длины геномной РНК), депонированные в международной онлайн базе данных NCBI / Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) в период 2020-2025 гг. Выявление ВГЕ в образцах проводили на оборудовании Sens6 (Умные ДНК Технологии, Минск, Беларусь).

Результаты исследования. Выбраны, выравнены и проанализированы 54 полногеномные последовательности РНК вируса гепатита Е (ВГЕ), депонированные в базе NCBI за период 2020-2025 гг., включая по регионам: Америка – 4, Европа – 16, Австралия и Океания – 8, Азия – 12, Африка – 14. Проведено сравнение с изолятами, выявленными на территории РБ. Обозначены общие и регион-специфичные области РНК ВГЕ, удовлетворяющие требованиям для дизайна специфических зондов (ПЦР-РВ, EIS-секвенирование). Осуществлен дизайн специфических олигонуклеотидов для гибридизационного распознавания кДНК ВГЕ с использованием технологии ДНК-сенсоров. Проведен анализ наличия антител IgM и IgG к ВГЕ методом ИФА, антитела IgM и IgG выявлены у 2 пациентов, только антитела IgG выявлены в 16 образцах. Методом ПЦР-РВ выявлена РНК ВГЕ у 6 пациентов, а также в 1 образце сточных вод, в 1 образце экскрементов свиньи. С использованием технологии ДНК-сенсоров распознано 2 из 2 включенных в тестовое исследование ПЦР-позитивных образца ВГЕ. Ложнопозитивные сработки ДНК-сенсоров не зарегистрированы.

Заключение. Технология ДНК-наносенсоров обладает высоким потенциалом в качестве диагностического метода для выявления генома

патогенов или их мутантных вариантов без дополнительного увеличения стартового числа копий генома в образце, что дает возможность ее использования в полевых условиях. Технология представляется перспективным направлением для выявления не только РНК ВГЕ, а также в перспективе для улучшения генодиагностики широкого спектра различных заболеваний и состояний.

Список литературы:

1. Молекулярно-эпидемиологическое исследование случаев острого гепатита Е в Беларуси / В. В. Давыдов, С. В. Жаворонок, Т. В. Зновец, В. М. Цыркунов, А. С. Бабенко, С. И. Марчук, Е. Л. Гасич, Т. П. Новик, Г. И. Алаторцева, М. И. Михайлов, В. В. Зверев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99, № 6. – С. 625–636.
2. Chaibun T., Karunaitas S., Ngamdee T. и др. Highly sensitive and specific electrochemical biosensor for direct detection of hepatitis C virus RNA in clinical samples using DNA strand displacement // Scientific Reports. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 23792.
3. CDC, Division of Laboratory Systems. Challenges for Diagnostic Test Developers [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/laboratory-systems/php/white-paper/challenges-diagnostic-test-developers.html> (дата обращения: 10.06.2025).
4. Szunerits S., Pagneux Q., Swaidan A., Mishyn V. и др. The role of the surface ligand on the performance of electrochemical SARS-CoV-2 antigen biosensors // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2022. – Т. 414, № 1. – С. 103–113.
5. Burrow D.T., Heggstad J.T., Kinnamon D.S., Chilkoti A. Engineering Innovative Interfaces for Point-of-Care Diagnostics // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2023. – № 101718.
6. Liborio M.P., Harris P.N.A., Ravi C., Irwin A.D. Getting Up to Speed: Rapid Pathogen and Antimicrobial Resistance Diagnostics in Sepsis // Microorganisms. – 2024. – Т. 12, № 9. – С. 1824.
7. Solyanikova V.V., Gorbenko D.A., Zryacheva V.V., Shtro A.A. Multicomponent DNA Nanomachines for Amplification-Free Viral RNA Detection // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26, № 8. – С. 3652.
8. Lin W., Ding T., He D., Zhang N. и др. DNA Logic-Integrated Quantum Nanosensor for MicroRNA Diagnostics // JACS Au. – 2025. – Т. 5, № 5. – С. 2123–2134.