

2. Freeze– thaw injury: evidence for double strand breaks in Escherichia coli DNA / N. Grecz , T. L. Hammer, C. J. Robnett, M. D. Long // Biochemical and biophysical research communications. – 1980. – Т.93. №4. – P. 1110–1113.
3. Wood, A. B– 184 Purifying High– Quality Genomic DNA From Frozen Blood Samples Stored up to 1.5 Years at – 20°C / A. Wood, Y. Wang, // *Clinical Chemistry*. (2024).
4. The effects of different storage conditions and repeated freeze/thaw cycles on the concentration, purity and integrity of genomic DNA / M.Safarikova , A. Kubena, V. Frankova [et.al]// *Folia Biologica*. – 2021. – Т.67. №1. – P.10–15.
5. ДНК– Технология. (2024). *Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА– НК/ПРОБА– НК– ПЛЮС*, 270– 6.

Сведения об авторах

Д.М. Нечаева* – студент
 А.Е. Карякина – студент
 А.Е. Кейних – студент
 В.М. Симарзина – аспирант
 Д.О. Корнилов – аспирант, ординатор
 П.Г. Аминева – врач– медицинский микробиолог
 Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор
 Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.M. Nechaeva* – Student
 A.E. Kariakina – Student
 A.E. Keinikh – Student
 V.M. Simarzina – Postgraduate student
 D.O. Kornilov – Postgraduate student
 P.G. Amineva – Medical Microbiologist
 E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor
 D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

dinechaeva13@yandex.ru

УДК 614.4

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ НОРОВИРУСА GI И GII В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Патрушева Анастасия Константиновна, Чалапа Владислав Игоревич, Итани Тарек Мохамедович

Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научно– исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Норовирусы являются распространённой причиной небактериального гастроэнтерита, преобладающими геногруппами являются GII и GI. Из существующих методов детекции возбудителя приемлемые операционные характеристики демонстрирует лишь полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР– РВ). В то же время разработка подобных тест– систем затруднена ввиду генетической изменчивости возбудителя, при этом ранее были описаны сложности в подборе олигонуклеотидов для детекции норовируса GI. **Цель исследования** – усовершенствовать мультиплексную тест– систему на основе ПЦР в режиме реального времени для детекции норовирусов GI и GII. **Материал и методы.** Для экспериментальной части исследования использовались образцы фекалий больных гастроэнтеритом (n=150), включая образцы с положительными результатами ПЦР– теста на норовирус GI (n=16) и GII (n=59). В качестве эталона сравнения использовалась тест– система АмплиСенс® Norovirus GI/GII– FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). **Результаты.** При тестировании экспериментального метода было получено по одному ложноположительному и ложноотрицательному результату, таким образом, чувствительность и специфичность экспериментального метода составила 99,74%. **Выводы.** Было осуществлено усовершенствование метода обнаружения норовирусов GI и GII с помощью ПЦР в реальном времени с учетом известных технических сложностей разработки тест– системы для детекции норовируса GI. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест– системой показали хорошие операционные характеристики.

Ключевые слова: норовирус GI, норовирус GII, мультиплексна ПЦР– РВ.

DEVELOPMENT OF A NOROVIRUS GENOGROUP I AND II QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY

Patrusheva Anastasiya Konstantinovna, Chalapa Vladislav Igorevich, Itani Tarek Mohamedovich
Federal Budgetary Institution of Science «Federal Scientific Research Institute of Viral Infections
«Virome» Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing
Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Noroviruses are a common cause of non-bacterial gastroenteritis, with genogroups GII and GI being the most prevalent. Among existing detection methods, only real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) demonstrates acceptable operational characteristics. However, the genetic variability of the pathogen makes the development of such test systems challenging, and previous studies have reported difficulties in selecting primers and probes for the detection of norovirus GI. **The aim of the study** is to improve a multiplex RT-PCR-based test system for the detection of noroviruses GI and GII. **Material and methods.** For the experimental part of the study, fecal samples from patients with gastroenteritis (n=150) were used, including samples with positive PCR results for norovirus GI (n=16) and GII (n=59). The AmpliSens® Norovirus GI/GII-FL (FBIS CRIE of Rospotrebnadzor, Moscow) assay was used as gold standard. **Results.** Testing of the experimental method has shown one false-positive and one false-negative result, resulting in a sensitivity and specificity of the experimental method of 99.74%. **Conclusions.** The method for detecting noroviruses GI and GII using RT-PCR was improved, considering the known technical challenges in developing a test system for norovirus GI detection. The results of studies on a limited sample with the experimental test system showed good operational characteristics.

Keywords: norovirus GI, norovirus GII, multiplex qPCR assay.

ВВЕДЕНИЕ

Норовирусы признаны одной из ключевых причин развития небактериальных гастроэнтеритов среди людей всех возрастов по всему миру, представляя серьезную угрозу для общественного здоровья. Они часто становятся причиной вспышек инфекции в медицинских учреждениях, школах, детских садах и других организованных коллективах [1]. Геном норовирусов представлен одноцепочечной РНК и структурно состоит из трех открытых рамок считывания (ORF): ORF1 кодирует неструктурные белки, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), в то время как ORF2 и ORF3 отвечают за синтез основных структурных белков — капсидного белка VP1 и второстепенного белка VP2 соответственно. Норовирусы отличаются высокой генетической изменчивостью и разнообразием за счет механизма рекомбинации [2]. На сегодняшний день норовирусы классифицированы на 10 геногрупп (GI–GX), из которых наиболее значимыми для человека являются геногруппы GI и GII, вызывая большинство случаев норовирусной инфекции (НВИ) [3]. Из-за сложностей культивирования норовирусов *in vitro* зарегистрированная вакцина против НВИ отсутствует. В совокупности с высокой контагиозностью возбудителя, множественными путями передачи инфекции и длительным выделением вируса из организма после заражения, существует необходимость совершенствования мер эпидемиологического надзора за НВИ, в частности методов лабораторной диагностики норовирусов. Наиболее распространенным методом обнаружения возбудителей вирусной природы в настоящее время является полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР–РВ), которая признана золотым стандартом в том числе для обнаружения РНК норовирусов [3]. В геноме норовирусов целевой последовательностью для их выявления является участок на стыке ORF1 и ORF2, который является консервативным и при этом имеет достаточные различия между разными геногруппами, что позволяет создавать мультиплексные тест-системы для идентификации норовирусов GI и GII, подбирая праймеры и зонды к данному участку генома [4].

Цель исследования — усовершенствовать мультиплексную тест-систему на основе ПЦР в режиме реального времени для детекции норовирусов GI и GII.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн праймеров и зонда для детекции норовирусов GI подробно описан в предыдущем исследовании [5]. Характерной особенностью зонда, вошедшего в состав разработанной тест-системы, является наличие в структуре LNA (locked nucleic acid). Праймеры и зонд для детекции норовирусов GII описаны ранее [6]. В процессе дизайна олигонуклеотидных последовательностей для GI осуществляли проверку возможности образования димеров с праймерами и зондами для обнаружения норовирусов GII с помощью

программы UGENE v.44.0 (Унипро, Новосибирск), а также онлайн– сервиса OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., США), чтобы убедиться в возможности проведения мультиплексного анализа. Характеристика олигонуклеотидов, вошедших в состав мультиплексной тест– системы приведена в таблице (Таблица 1).

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры и гидролизующиеся зонды для тест– системы обнаружения норовирусов типа GI и GII с помощью ПЦР– РВ

№	Гено– группа	Праймеры и зонды	Последовательность (5' → 3')	Длина
1	GI	Nq1F	CCATGTTYCGCTGGATGC	18
2		Nq1R	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	23
3		Nq1P	FAM– TGTG <u>G</u> RCAGGAGAYC <u>G</u> CRATCT– BHQ1	22
1	GII	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	26
2		COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	21
3		RING2– TP	HEX– TGGGAGGGCGATCGCAATCT– BHQ1	20

Примечание: М – А или С; R – А или G; Y – С или Т; нижнее подчеркивание – LNA.

Экспериментальная часть исследования выполнена на базе лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора. Для отладки мультиплексной ПЦР тест– системы были использованы образцы РНК, выделенные из образцов клинического материала (фекалии), полученных от больных острой кишечной инфекцией (ОКИ) – жителей Свердловской области, в которых обнаруживалась РНК норовирусов GI и GII методом ПЦР– РВ, либо был выявлен антиген норовируса методом ИФА. Упомянутые образцы первично исследовались в медицинских организациях по месту обращения больных и направлялись для дальнейшего исследования в Виром. Процесс пробоподготовки и обратной транскрипции описан ранее [5]. В качестве сравнительного эталона использовали набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® Norovirus GI/GII– FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix– HS (ЗАО «Евроген», Россия). Программа амплификации включала предварительный нагрев при 95°C в течение 5 минут и далее 45 циклов амплификации с денатурацией при 95 °C в течение 15 секунд и отжигом/элонгацией в течение 1 минуты, совмещенной с детекцией флуоресценции. В работе использовался детектирующий амплификатор DTPRime– 4M1 (ООО «ДНК– технология», Россия).

Исследование проводилось в рамках государственного задания (регистрационный номер № 123051100045–0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием эталонной тест– системы было исследовано 150 образцов от пациентов, среди которых обнаружены положительные образцы на норовирус GI (n=16) и GII (n=59), а также отрицательные образцы (n=75). Полученная панель контрольных образцов была использована для тестирования экспериментального метода, по итогам которого выявлено по одному ложноположительному и ложноотрицательному результату на норовирус GII. Таким образом, чувствительность и специфичность разработанного экспериментального метода составила по 99,74%.

Ранее на основании скрининга больных гастроэнтеритом нами была получена оценка распространенности норовирусов в популяции жителей города Екатеринбург, которая составила 13%. Принимая данное значение за априорную распространенность норовирусов среди больных гастроэнтеритом, прогностичность положительного результата для экспериментального метода составляет 97,7% (95%ДИ 89,5–99,7).

ОБСУЖДЕНИЕ

НВИ является широко распространённым заболеванием и значимой угрозой для общественного здоровья, а его диагностика и расследование вспышек требует применения ПЦР– РВ [3]. Хотя норовирус GI в целом является относительно редким возбудителем, в

отдельных исследованиях его доля среди случаев НВИ составляет 42% [7]. Как было показано ранее, разработка метода обнаружения норовируса GI в ПЦР–РВ значительно осложнена высокой генетической изменчивостью данного возбудителя [3].

Разработанный метод показал преимущества в сравнении с использованной эталонной тест–системой («золотым стандартом»). Так, он отличается меньшим средним значением C_t , что соответствует почти десятикратно меньшему значению предела обнаружения (при значении threshold value 27 и 30 соответственно). Кроме того, представленный протокол требует вдвое меньшего объема раствора кДНК по сравнению с эталонной тест–системой (5 мкл вместо 10 мкл).

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Во–первых, поскольку геновариант норовируса GI встречается гораздо реже чем GII, имеющаяся в нашем распоряжении выборка положительных образцов для данного возбудителя в настоящий момент невелика и будет расширена в дальнейшем для уточнения чувствительности предлагаемого метода. Во–вторых, метод, использованный в качестве эталонного, сам по себе основан на амплификации нуклеиновых кислот, а не на прямом обнаружении возбудителя методом культивирования, что связано с проблемой отсутствия технологий воспроизводства норовирусов на клеточных линиях. В–третьих, на данном этапе проведения исследования не оценивался предел обнаружения из–за отсутствия в распоряжении положительного контрольного образца с известным содержанием эквивалентов генома возбудителей

ВЫВОДЫ

Метод обнаружения норовирусов GI и GII с применением ПЦР в режиме реального времени оптимизирован с учетом известных технических сложностей разработки тест–системы для детекции данного возбудителя. Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР–РВ. Результаты тестовых испытаний экспериментальной тест–системы показали хорошие операционные характеристики.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta–analysis on 6 years of research from 2015 to 2020 / M. Farahmand, M. Moghoofoei, A. Dorost [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2021. – Vol. 32, № 1. – P. e2237.
2. Vakulenko Y.A. Patterns and Temporal Dynamics of Natural Recombination in Noroviruses / Vakulenko Y.A., Orlov A.V., Lukashev A.N // *Viruses*. 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 372.
3. Redesigned Duplex RT–qPCR for the Detection of GI and GII Human Noroviruses / Liu D., Zhang Z., Wu Q. [et al.] // *Engineering*. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 442–448.
4. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus / J. Vinjé // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 373–381.
5. Патрушева, А. К. Разработка метода обнаружения норовируса GI в полимеразной цепной реакции в реальном времени / А. К. Патрушева, В. И. Чалапа, Т. М. Итани. – Текст: электронный // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Сборник статей IX Международной научно–практической конференции молодых ученых и студентов, 17–18 апреля 2024 г. Т. 2. – Екатеринбург, 2024. – С. 71–75.
6. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses / Cannon J.L., Barclay L., Collins N.R. [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. 2017. – Vol. 55, № 7. – P. 2208–2221.
7. Молекулярно–генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека на территории Свердловской области за 2022 год / Р. О. Быков, Т. М. Итани, В. И. Чалапа [и др.]. – Текст электронный. // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: сборник статей VIII Международной научно–практической конференции молодых учёных и студентов, Екатеринбург, 19–20 апреля 2023 г. – Екатеринбург: УГМУ, 2023. – С. 1921–1926.

Сведения об авторах

А.К. Патрушева* – младший научный сотрудник

В.И. Чалапа – младший научный сотрудник

Т.М. Итани – старший научный сотрудник

Information about the authors

A.K. Patrusheva – Researcher

V.I. Chalapa – Researcher

T.M. Itani – Senior Researcher

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

patrusheva_ak@niivrom.ru