Давыдов В.В.¹, Бабенко А.С.¹, Жаворонок С.В.¹, Марчук С.И.¹, Борисовец Д.С.², Зновец Т.В.³

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь

³ 3-я городская клиническая больница имени Е.В. Клумова, Минск, Беларусь

Davydov V.¹, Babenko A.¹, Zhavoronok S.¹, Marchuk S.¹, Borisovets D.², Znovets T.³

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellessky, Minsk, Belarus

³ 3rd City Clinical Hospital named after E.V. Klumov, Minsk, Belarus

Новая тест-система для выявления РНК вируса гепатита Е методом ПЦР в режиме реального времени

A Novel RT-QPCR Based Approach for Detection
of Human Hepatitis E Virus in Biological Samples

Резюме

Цель. Разработка новой тест-системы для выявления РНК вируса гепатита Е в различных типах биологического материала.

Материалы и методы. В исследовании использовались образцы биологического материала, включающие цельную кровь, плазму и сыворотку крови, мочу, желчь и фекалии, от 97 пациентов, 79 свиней, 28 диких кабанов, 40 оленей, 359 кроликов, из панели положительных и отрицательных образцов, подготовленной в течение 2017–2021 гг. Выбор потенциальных репликонов и анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ (3-й тип), полученных из GenBank, выполняли с помощью программного обеспечения MEGA X. Дизайн и анализ пригодности олигонуклеотидных праймеров для проведения ПЦР-РВ осуществляли с помощью on-line сервисов Primer3 и OligoAnalyzer3.1.

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. Расчетная специфичность для 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 66,7%, в то время как применение коммерческого набора RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0 позволило обнаружить РНК ВГЕ в 50% образцов, а гнездовой ПЦР – 40%. Из всех положительных образцов, полученных с помощью гнездовой ПЦР, коммерческим набором было подтверждено 75%, тогда как 83% подтверждений было получено с помощью разработанного ОТ-ПЦР-РВ.

Заключение. Внесенные изменения в последовательности праймеров и зонда увеличили аналитическую специфичность разработанной нами тест-системы.

Ключевые слова: вирусный гепатит Е, ПЦР в режиме реального времени, тест-система.

Abstract

Purpose. To develop a new test system for the detection of hepatitis E virus (HEV) RNA in various types of biological samples.

Materials and methods. In the study, there were used the whole blood, plasma and serum, urine, bile and feces from 97 patients, 79 domestic pigs, 28 wild boars, 40 deer, 359 rabbits from the panel of positive and negative samples prepared during the period 2017-2021. The selection of potential replicons and analysis of the nucleotide sequences of HEV (genotype 3) obtained from GenBank were performed using the MEGA X software. The design and analysis of the suitability of oligonucleotide primers for RT-PCR were performed using the online services Primer3 and OligoAnalyzer3.1.

Results. As a result of the design of oligonucleotide primers and the modification of certain sites by degeneracy, a set of candidates was obtained, including forward / reverse primers and a probe, which had a significantly higher specificity for the studied HEV sequences. The calculated specificity for detection of the whole genome sequences selected for the study was 490/525 (93.3% $\pm$ 0.42 p < 0.001). When using the test system developed by us, HEV was detected in 66.7%, while the use of the commercial kit "RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0" let to detect HEV RNA in 50% of the samples and nested PCR – in 40%. Of all positive samples obtained by the nested PCR, 75% were confirmed by the commercial kit, and 83% of the confirmations were obtained using the developed test system.

Conclusion. Thus, our changes in the sequence of primers and probe increased the analytical specificity of the test system we developed.

Keywords: Viral hepatitis E, real-time PCR, test system.

■ ВВЕДЕНИЕ

Гепатит является глобальной проблемой здравоохранения большинства стран мира. Обычно он развивается как следствие вирусных инфекций, однако и другие неинфекционные причины, такие как аутоиммунные заболевания, токсины, алкоголь и лекарства, также могут приводить к гепатиту [1]. К настоящему времени известно 5 основных типов вирусных гепатитов, называемых гепатитами A, B, C, D, E. Вирус гепатита E (ВГЕ) является этиологическим агентом инфекции гепатита E (ГЕ) – одной из ведущих причин острого и хронического воспаления печени. Буква «Е» в названии болезни означает связь с эпидемиями и энтеральным путем передачи. Это одноцепочечный РНК-вирус с позитивной полярностью, относящийся к виду *Orthohepevirus A* рода *Orthohepevirus* семейства *Hepeviridae*.

ВГЕ – небольшой икосаэдрический вирус без оболочки диаметром 27–34 нм [2]. Он содержит одноцепочечный геном с положительной смысловой РНК размером 7,2 kb. ВГЕ является квазиоболочечным вирусом, поскольку существует в двух вариантах. В крови вирион ВГЕ заключен в экзосомальные мембраны клетки хозяина, а как «голая» частица выделяется из желчи и кала [3]. Геном ВГЕ содержит 3 открытые рамки считывания (ОРС). ОРС1 кодирует неструктурные белки, в том числе вирусную полимеразу, ОРС2 – белки капсида, а ОРС3 – небольшой ассоциированный с цитоскелетом белок, участвующий в секреции вириона за счет своей потенциальной активности в работе ионного канала [4]. ОРС2 и ОРС3 частично перекрываются на 5'-конце.

Известно, что 8 генотипов ВГЕ (ВГЕ-1 – ВГЕ-8) инфицируют млекопитающих и классифицируются на основе различий в последовательности ОРС2. Все выявленные генотипы ВГЕ относятся к одному серотипу [5]. ВГЕ-1 и ВГЕ-2 являются патогеном только человека и причиной эпидемических вспышек в эндемичных районах Африки, Америки и Азии [6]. ВГЕ-3 и ВГЕ-4 инфицируют животных, но также могут передаваться человеку, вызывая зоонозные инфекции. Географически ВГЕ-3 вызывает спорадические случаи во всем мире, включая Республику Беларусь [7]. ВГЕ-4 преобладает в Юго-Восточной Азии. ВГЕ-5 и ВГЕ-6 заражают в основном диких кабанов. ВГЕ-7 – это недавно открытый генотип, который был идентифицирован в Объединенных Арабских Эмиратах. Считается, что ВГЕ-7 заражает в первую очередь одногорбых верблюдов, поскольку впервые был обнаружен в фекалиях этих животных. Однако такая же последовательность генома вируса была выделена из фекалий пациента с острым гепатитом, что позволяет предположить, что ВГЕ-7 может инфицировать как человека, так и верблюдов. Похожим образом ВГЕ-8 был идентифицирован у двугорбых верблюдов в Китае, но на сегодняшний день вирусные последовательности ВГЕ-8 у людей обнаружены не были.

В более чем 90% случаев ВГЕ-инфекция протекает бессимптомно и проходит без лечения. Однако в иных случаях ВГЕ сопровождается типичными симптомами острого гепатита, такими как желтуха, тошнота, рвота и гепатоспленомегалия, а также повышенной активностью трансаминаз сыворотки крови, отражающей поражение печени [8]. Кроме того, хроническая ВГЕ-инфекция, которая наиболее часто вызывается ВГЕ-3, была обнаружена у пациентов с сопутствующими заболеваниями, включая хронические заболевания печени, гематологические злокачественные новообразования, а также иммунодефицитные состояния.

Во время эпидемий фульминантный гепатит Е непропорционально часто возникает у беременных в 3-м триместре. В то время как в общей популяции смертность от гепатита Е колеблется от 0,1 до 4%, среди женщин в 3-м триместре при беременности она может составлять от 10 до 50% [8]. Точный механизм, ответственный за непропорционально высокую смертность среди беременных женщин, не изучен, однако есть предположение, что это вызвано возможностью репликации ВГЕ в мезенхимальных стромальных клетках эндометрия [10]. Причины смерти беременных включают молниеносную печеночную недостаточность и акушерские осложнения, в том числе обильное кровотечение. ВГЕ-инфекция, вызванная вирусом 1-го генотипа, во время беременности также обуславливает неблагоприятные исходы для плода, включая выкидыш, преждевременные роды и мертворождение [11].

ВГЕ-1 и ВГЕ-2 передаются фекально-оральным путем, ВГЕ-3 и ВГЕ-4 – при прямом контакте с больными животными, при употреблении в пищу мяса и печени инфицированных диких и домашних животных, не прошедших достаточную термическую обработку, а также продуктов питания, изготовленных из них [12]. Термическая обработка ВГЕ в культуре клеток при 90 °С в течение 1 мин или при 70 °С в течение 10 мин полностью инактивирует патоген [13]. Однако результаты, полученные Barnaud E. и др. [14], показывают, что ВГЕ относительно стабилен в пищевых продуктах и для полной инактивации ВГЕ в свиной печени требуется термическая обработка при 70 °С в течение как минимум 20 мин.

Случайная передача ВГЕ-инфекции при переливании крови была зарегистрирована в нескольких странах, включая Японию, Великобританию, Францию, Данию и Саудовскую Аравию. Изучение донорской плазмы показало, что 0,012% шведских и 0,022% немецких доноров были ВГЕ-РНК-положительными [15]. Угроза, которую представляет передача ВГЕ-3 как от продуктов крови, так и от донорских органов, привела к введению в Великобритании всеобщего скрининга для снижения риска передачи ВГЕ [16].

Регистрация числа случаев гепатита Е в развитых странах, таких как страны Европы, Япония и США, дает лишь ограниченную информацию о распространенности инфекции ВГЕ среди населения. Течение инфекции ВГЕ-3 или ВГЕ-4 преимущественно бессимптомное, поэтому надежные эпидемиологические данные о распространенности ВГЕ могут быть собраны только путем определения антител, специфичных к ВГЕ. В этом отношении следует учитывать, что ВГЕ не всегда диагностируется как причина гепатита. Расчетная заболеваемость ВГЕ в репрезентативной выборке из общей популяции жителей Германии составляет 0,39% (95% ДИ 0,36–0,42) [17].

На основании клинических проявлений и результатов биохимических исследований крови и мочи можно только распознать начало и стадию ВГЕ-инфекции. Постановка диагноза ГЕ требует оптимального сочетания серологических и молекулярно-генетических методов, основанных на технологии амплификации нуклеиновых кислот, как для подтверждения инфекции, так и для мониторинга реакции на лечение у хронически инфицированных пациентов. С учетом относительно короткого периода виремии ВГЕ, который не всегда сопровождается появлением симптомов, постановка диагноза гепатита Е является непростой задачей. В качестве основных инструментов диагностики ВГЕ образцы сыворотки используются для обнаружения РНК ВГЕ и специфических антител против белка вирусного капсида (ОРС2). 2 серологических маркера являются доступными для выявления (рис. 1): 1-й – это иммуноглобулин класса М (IgM) к ВГЕ, который указывает на острую фазу инфекции; 2-й – IgG к ВГЕ, который свидетельствует о текущей инфекции, в том случае если выявляется вместе с анти-ВГЕ IgM, или прошлом контакте с вирусом (анамнестические антитела), когда он обнаруживается отдельно.

Серологические тесты выявления анти-ВГЕ IgM и IgG относительно просты в выполнении и менее дороги, чем тесты выявления РНК. Однако доступные диагностические тест-системы разных производителей отличаются по аналитическим характеристикам с точки зрения чувствительности и специфичности. На основании многих исследований коммерческие тесты ИФА демонстрируют очевидные расхождения в результатах, несмотря на использование для анализа одних и тех же образцов биологического материала [18]. Кроме того, результаты ИФА могут быть противоречивыми и неубедительными из-за перекрестной реактивности с другими вирусами, например с цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна – Барр [19].

Выявление РНК ВГЕ в сыворотке (плазме) крови, моче, желчи и стуле является единственным диагностическим тестом для верификации диагноза, когда серологическое исследование трудно интерпретировать

Рис. 1. Диагностические маркеры гепатита Е [20]

Fig. 1. Diagnostic markers of hepatitis E [20]

у пациентов с ослабленным иммунитетом. Он незаменим при выявлении ВГЕ в продуктах питания и объектах окружающей среды, а также для генотипирования образцов вируса при эпидемиологических исследованиях.

Обнаружение РНК признается золотым стандартом диагностики ВГЕ. Оптимальным методом выявления РНК ВГЕ считается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Он является высокочувствительным и доступным с точки зрения наличия оборудования для его проведения. В то же время зарегистрированный в Республике Беларусь коммерческий набор для проведения этого исследования HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona, Германия) является недоступным большинству лабораторий из-за высокой стоимости. Вместе с тем существует практика использования аналогичных тест-систем, разработанных в рамках национальных систем лабораторной диагностики (in-house) [21].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка нового набора реагентов отечественного производства, имеющего более высокую специфичность в отношении выявления возбудителя гепатита Е, с его использованием для расширения спектра диагностических возможностей лабораторий при выявлении РНК ВГЕ из образцов биологического материала и импортозамещения коммерческого аналога.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались образцы биологического материала, включающие цельную кровь, плазму и сыворотку крови, мочу, желчь и фекалии, от 97 пациентов, 79 свиней, 28 диких кабанов, 40 оленей, 359 кроликов, из панели положительных и отрицательных образцов, подготовленной в течение 2017–2021 гг.

Выбор потенциальных репликонов и анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ-3, полученных из GenBank [22], выполняли с помощью программного обеспечения MEGA X [23]. Дизайн и анализ пригодности олигонуклеотидных праймеров для проведения ПЦР-РВ осуществляли с помощью on-line сервисов Primer3 [24] и OligoAnalyzer3.1 [25].

В исследовании применялись 2 независимых референсных метода выявления РНК вируса гепатита Е в различных образцах биологического материала, включая мочу, кал, цельную кровь, сыворотку, плазму и желчь. В обоих случаях для выделения РНК вируса использовали набор реагентов РНК Viral RNA+DNA Preparation Kit – Column Kit (Jena Bioscience GmbH, Германия). В процессе выделения учитывались рекомендации инструкции производителя набора.

1-й метод основан на ПЦР в режиме реального времени и реализовывался с использованием набора реагентов HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия). 2-й метод основан на классической ПЦР и разделении продуктов амплификации в агарозном геле [26]. Для повышения чувствительности в данном методе использован принцип гнездовой (nested) ПЦР.

Для выделения РНК вируса гепатита Е в рамках разработки и оптимизации in-house ПЦР-тест-системы использовали набор реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. Синтез кДНК проводили отдельно с ПЦР-РВ с использованием случайных гексамеров и набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. На 1 реакцию обратной транскрипции использовали 10 мкл раствора общей фракции РНК после выделения. Контроль целостности выделенной РНК, а также нормировка концентраций не проводились ввиду высокой гетерогенности типов образцов, малого выхода РНК и относительно высокой стабильности вирусной РНК.

Для проведения реакции использовали реагенты производства ОДО «Праймтех», Беларусь, – «PrimeTaq ДНК-полимераза, с буферами» и «Смесь дНТП (dNTPs) для ПЦР, 10х». Наборы олигонуклеотидов, используемых в качестве прямых и обратных праймеров и зонда с метками 5'-FAM- OLIGO –BHQ1 – 3' для проведения ПЦР-РВ, были изготовлены ОДО «Праймтех», Беларусь, по индивидуальному заказу. Применялись приборы ДТ-322 («ДНК-Технология», РФ), CFX96, CFX96touch и CFX connect (Bio-Rad, США).

Оптимизацию ПЦР проводили с использованием обобщенного образца кДНК, полученного путем смешивания 10 позитивных образцов на основании данных референсных методов. Обобщенный образец добавляли в состав реакционных смесей с использованием 2 разных комплектов олигонуклеотидов в равных объемах. Выбор оптимальной температуры отжига/элонгации ПЦР-РВ проводили с использованием температурного градиента 56,0–66,0 °С с точками 56,0; 56,7; 58,0; 60,0; 62,4;

64,3; 65,5 °С. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Реакционные смеси содержали: хлорид магния (концентрация 2 ммоль/л), смесь 4 дезоксинуклеотидтрифосфатов (концентрация каждого 0,1 ммоль/л), олигонуклеотиды, включая зонд для ПЦР-РВ (концентрация 500 нмоль/л), 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95 °С – 2 мин, затем 50 циклов: +95 °С – 5 с, температурный градиент – 55 с. Детекция осуществлялась по каналу FAM после каждого цикла амплификации.

Диагностическую чувствительность и специфичность определяли с использованием методики построения кривых оперативных характеристик (ROC-кривых) с помощью компьютерной программы для сбора и статистической обработки биомедицинских данных MedCalc 19.

Полученные результаты обрабатывали с применением методов вариационной статистики. Для качественных переменных определяли абсолютную частоту на 100 исследований и относительную частоту (%) от общего числа случаев в исследуемой группе. Оценку достоверности разности сравниваемых величин проводили на основании величины критерия Стьюдента (t), для чего рассчитывали частоту встречаемости признака, средние значения и значения ошибки репрезентативности. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее консервативной областью последовательности генома ВГЕ является область перекрытия двух рамок считывания генетической информации – ORC2 и ORC3 [27]. Проанализированы 525 полногеномных последовательностей ВГЕ, в том числе все референсные, рекомендованные Smith D.B. и соавторами для 3-го генотипа [28], из более чем 800, имеющихся в базе NCBI. В том числе 67 изолятов, полученных из организма домашних свиней, 20 – из организма дикого кабана, 3 – из организма мангуста, 238 – из организма человека и 197 – из клеточной культуры. На основании проведенного анализа в качестве целевой для репликона, используемого для разработки ПЦР-РВ, был выбран участок длиной 73 н. о., имеющий локализацию с 5259 по 5332 в соответствии с нумерацией позиций нуклеотидов по штамму ВГЕ Burma (код доступа в базе данных GenBank M73218). Выбранные последовательности были проверены на наличие гомологии в геноме человека, других млекопитающих и микроорганизмов с помощью сервиса NCBI Blast. Совпадений вне генома ВГЕ, за исключением искусственных рекомбинантных конструкций и предикторов, выявлено не было.

В доступной литературе содержится информация об использовании этого участка генома в рамках дизайна праймеров для использования в ПЦР-РВ [29]. В то же время проведенные нами исследования указывают на недостаточную специфичность используемых праймеров. При визуальном сравнении последовательностей праймеров и выровненных полногеномных последовательностей генома вируса нами установлено, что 239 из 525, т. е. только $45,5 \pm 0,29\%$, последовательностей могут быть детектированы данным комплектом олигонуклеотидов (табл. 1).

В результате внесенных правок в последовательности олигонуклеотидов, в том числе путем включения в последовательность вырожденных

участков и незначительного смещения по длине последовательности к 5'-концу, был получен комплект кандидатов, включающий прямой/обратный праймеры и зонд, которые обладали существенно более высокой специфичностью в отношении изучаемых последовательностей ВГЕ. Расчетная специфичность для детекции выбранных для изучения полногеномных последовательностей составила 490/525 (93,3±0,42%, $p<0,001$). Таким образом, внесенные изменения в последовательности увеличили аналитическую специфичность праймеров более чем в 2 раза (табл. 2).

При изучении одного и того же образца биологического материала, являющегося смесью нескольких положительных проб от разных пациентов и животных, с помощью 3 разных наборов, включающих разные праймеры, получены результаты, представленные на рис. 2.

На основании анализа запуска 3 реакций установлено, что ПЦР-РВ с использованием набора реагентов in-house с набором оптимизированных праймеров (табл. 2) имеет наименьший показатель цикла амплификации, составляющий 24,1, что свидетельствует о более высокой

Таблица 1

Комплект праймеров, ориентированных на OPC2/OPC3, используемых в коммерческих наборах при проведении ПЦР-РВ, и их специфичность относительно изученных 525 выровненных полногеномных последовательностей ВГЕ [30]

Тип	Последовательность и метки	Специфичность, %
Прямой	5' – GGTGGTTTCTGGGGTGAC – 3'	50,7±0,31
Зонд	5' – FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB – 3'	93,1±0,42
Обратный	5' – AGGGGTTGGTTGGATGAA – 3'	98,1 ±0,43

Table 1

A set of ORF2 / ORF3-oriented primers used in commercial kits for RT-PCR, and their specificity relative to the studied 525 aligned genome-wide HEV sequences [30]

Type	Sequence	Specificity, %
Forward	5' – GGTGGTTTCTGGGGTGAC – 3'	50.7±0.31
Probe	5' – FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB – 3'	93.1±0.42
Reverse	5' – AGGGGTTGGTTGGATGAA – 3'	98.1 ±0.43

Таблица 2

Оптимизированный комплект праймеров, используемых для проведения ПЦР-РВ, и их специфичность относительно изученных 525 выровненных полногеномных последовательностей ВГЕ

Тип	Последовательность и метки	Специфичность, %
Прямой	5' – GCRGTGGTTTCTGGGGTG – 3'	98,3±0,43, $p<0,001$
Зонд	5' – FAM- GGYTGATTTCYAGCCCTT- BHQ1 – 3'	96,4±0,43, $p<0,05$
Обратный	5' – AAGGGGTTGGTTGGATGA – 3'	98,1±0,43, $p=0$

Table 2

Optimized set of primers used for RT-PCR and their specificity relative to the studied 525 aligned genome-wide HEV sequences

Type	Sequence	Specificity, %
Forward	5' – GCRGTGGTTTCTGGGGTG – 3'	98.3±0.43, $p<0.001$
Probe	5' – FAM- GGYTGATTTCYAGCCCTT- BHQ1 – 3'	96.4±0.43, $p<0.05$
Reverse	5' – AAGGGGTTGGTTGGATGA – 3'	98.1±0.43, $p=0$

Рис. 2. Результаты запусков ПЦР-РВ для выявления РНК ВГЕ в обобщенном образце с использованием разных наборов реагентов: А – набор HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия) со встроенными праймерами неизвестной последовательности; В – in-house набор реагентов с использованием стандартных праймеров (табл. 1); С – in-house набор реагентов с использованием оптимизированных праймеров (табл. 2)

Fig. 2. Results of RT-PCR runs for detecting HEV RNA in a generalized sample using different reagent kits: A - HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Germany) with embedded primers of unknown sequence; B - "in house" set of reagents using standard primers (Table 1); C - "in house" set of reagents using optimized primers (Table 2)

эффективности реакции и, как следствие, более высокой ее чувствительности, и явилось критерием его выбора для дальнейших исследований.

В целях определения диагностической надежности метода, реализуемого с применением разработанного экспериментального набора реагентов, была проведена сравнительная оценка с двумя референсными системами для выявления РНК ВГЕ (рис. 3, табл. 3).

Рис. 3. Электрофореграмма результатов гнездовой ПЦР: 1–25 – номера образцов (табл. 3); М – дорожка маркера молекулярного веса

Fig. 3. Electropherogram of the nested PCR results: 1–25 – sample numbers (Table 3), M – molecular weight marker lane

Таблица 3

Результаты выявления РНК ВГЕ в различных образцах биологического материала, полученного от человека и животных, разными наборами для проведения ПЦР-PB

№ образца	Тип образца	Гнездовая ПЦР	RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0	in-house ВГЕ
1	Кал пациента	+	+	+
2	Кал пациента	–	–	+
3	Свиная желчь	+	–	–
4	Кровь пациента	–	+	–
5	Сыворотка пациента	+	+	+
6	Сыворотка пациента	+	+	+
7	Моча пациента	–	–	+
8	Кал пациента	–	+	+
9	Моча пациента	–	–	–
10	Моча пациента	+	+	+
11	Кал пациента	–	+	+
12	Кал пациента	+	+	+
13	Сыворотка пациента	–	–	–
14	Свиная желчь	–	–	–
15	Свиная желчь	–	–	–
16	Свиная желчь	+	–	+
17	Свиная желчь	+	+	+
18	Желчь пациента	–	+	+
19	Кровь пациента	–	–	+
20	Кровь пациента	–	–	–
21	Плазма пациента	+	+	+
22	Плазма пациента	+	–	+
23	Сыворотка пациента	+	+	+
24	Кровь пациента	–	–	+

Окончание таблицы 3

№ образца	Тип образца	Гнездовая ПЦР	RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0	in-house ВГЕ
25	Кровь пациента	–	+	+
26	Кал дикого кабана	–	–	–
27	Кал дикого кабана	–	–	–
28	Кал дикого кабана	–	+	+
29	Кал дикого кабана	+	+	+
30	Кал дикого кабана	–	–	–

Table 3
Results of detecting HEV RNA in various samples of biological material obtained from humans and animals with different kits for RT-PCR

Sample No.	Sample type	Nested PCR	RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0	in-house HEV
1	Patient's feces	+	+	+
2	Patient's feces	–	–	+
3	Pork bile	+	–	–
4	Patient's blood	–	+	–
5	Patient's serum	+	+	+
6	Patient's serum	+	+	+
7	Patient's urine	–	–	+
8	Patient's feces	–	+	+
9	Patient's urine	–	–	–
10	Patient's urine	+	+	+
11	Patient's feces	–	+	+
12	Patient's feces	+	+	+
13	Patient's serum	–	–	–
14	Pork bile	–	–	–
15	Pork bile	–	–	–
16	Pork bile	+	–	+
17	Pork bile	+	+	+
18	Pork bile	–	+	+
19	Patient's blood	–	–	+
20	Patient's blood	–	–	–
21	Patient plasma	+	+	+
22	Patient plasma	+	–	+
23	Patient serum	+	+	+
24	Patient's blood	–	–	+
25	Patient's blood	–	+	+
26	Wild boar feces	–	–	–
27	Wild boar feces	–	–	–
28	Wild boar feces	–	+	+
29	Wild boar feces	+	+	+
30	Wild boar feces	–	–	–

Таблица 4
Показатели ROC-анализа результатов сравнительной оценки диагностической чувствительности наборов для проведения ПЦР-РВ

Анализируемая переменная	RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0	in-house ПЦР-РВ ВГЕ
Классификационная переменная	Гнездовая ПЦР	
Объем выборки	30	
Положительная группа	12 (40,00%)	
Отрицательная группа	18 (60,00%)	
Площадь под кривой ROC (AUC)	0,708	0,708
Среднеквадратическая ошибка (Делонг и др. 1988)	0,0868	0,0736
z-статистика	2,401	2,832
Уровень значимости р	0,0164 (p<0,05)	0,0046 (p<0,01)
Чувствительность	75,00	91,67
Специфичность	66,67	50,00

Table 4**Indicators of ROC analysis of the results of comparative assessment of the diagnostic sensitivity of kits for RT-PCR**

Analyzed variable	RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0	«In house» Real-time PCR HEV
Classification variable	Nested PCR	
Sample size 30	30	
Positive group	12 (40.00%)	
Negative group	18 (60.00%)	
Area under the ROC (AUC)	0.708	0.708
Root mean square error (Delong et al. 1988)	0.0868	0.0736
z-stat	2.401	2.832
Significance level p	0.0164 (p < 0.05)	0.0046 (p < 0.01)
Sensitivity	75.00	91.67
Specificity	66.67	50.00

При использовании новой, разработанной нами тест-системы in-house ПЦР-РВ ВГЕ в 20 образцах из 30 исследованных (66,7%) была выявлена РНК ВГЕ, в то время как применение коммерческого набора RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0 позволило выявить РНК ВГЕ в 15 образцах из 30 исследованных (50%). При проведении анализа методом гнездовой

Рис. 4. ROC-кривая сравнения диагностической чувствительности и специфичности моделей выявления ПЦР-РВ в сравнении с гнездовой ПЦР

Fig. 4. ROC-curve of comparison of the diagnostic sensitivity and specificity of the models for detecting RT-PCR in comparison with nested PCR

ПЦР положительными на РНК ВГЕ были лишь 12 образцов из 30 исследованных (40%). Из 12 положительных образцов, полученных с помощью гнездовой ПЦР, коммерческим набором было подтверждено 9 (75%), и 10 (83%) подтверждений было получено новым in-house ПЦР-РВ ВГЕ набором реагентов. Результаты ROC-анализа исследуемых моделей представлены в табл. 4 и на рис. 4.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный в ходе исследования набор реагентов для выявления РНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени обладает более высокой чувствительностью в отношении диагностики ВГЕ, чем коммерческий набор реагентов RealStar®_HEV_RT-PCR_Kit_2.0, зарегистрированный в Республике Беларусь. Новый набор в полной мере состоит из компонентов, произведенных в Республике Беларусь, и является существенно более дешевым аналогом. Дальнейшие исследования, необходимые для совершенствования конструкции и эффективности использования разработанного набора, позволят завершить работу по его регистрации и улучшить эффективность отечественных лабораторий по выявлению РНК ВГЕ в биологическом материале, полученном от человека и животных, а также в образцах из пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, статистическая обработка, написание текста – Давыдов В.В.; постановка эксперимента – Бабенко А.С., Марчук С.И.; концепция, редактирование и сбор материала – Жаворонок С.В.; сбор материала – Борисовец Д.С., Зновец Т.В.

Authors' contribution: concept and design of the study, statistical processing, text writing – Davydov V.; experimental setup – Babenko A., Marchuk S.; concept, editing and collection of material – Zhavoronok S.; collection of material – Borisovets D., Znovets T.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO (2020) *Hepatitis E*. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/.
2. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M., Savinov A.P., Poleschuk V.F. (1983) Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, vol. 20, pp. 23–31.
3. Feng Z., Hensley L., McKnight K.L., Hu F., Madden V., Ping L., Jeong S.H., Walker C., Lanford R.E., Lemon S.M. (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, vol. 496, pp. 367–371.
4. Ding Q., Heller B., Capuccino J.M., Song B., Nimgaonkar I., Hrebikova G., Contreras J.E., Ploss A. (2017) Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 114, pp. 1147–1152.
5. Emerson S.U., Clemente-Casares P., Moiduddin N., Arankalle V.A., Torian U. (2006) Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol*, vol. 87, pp. 697–704.
6. Labrique A.B., Thomas D.L., Stoszek S.K., Nelson K.E. (1999) Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiol Rev*, vol. 21, pp. 162–179.
7. Zhavoronok S.V., Davydov V.V., Gasich E.L., Anisko L.A., Marchuk S.I. (2020) Genetic Diversity of Hepatitis E Virus in the Republic of Belarus. *Gut Gastroenterol*, vol. 3(2), pp. 001–005.
8. Aggarwal R. (2013) Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, pp. 24–33.
9. WHO (2015) Hepatitis E vaccine: position paper. *Weekly epidemiological record*, vol. 18, no 90, pp. 185–200. Available at: <https://www.who.int/wer/2015/wer9018.pdf?ua=1>.

10. El-Mokhtar M.A. (2020) Evidence of the Extrahepatic Replication of Hepatitis E Virus in Human Endometrial Stromal Cells. *Pathogens*, vol. 9, no 4, p. 295.
11. Khuroo M.S, Kamili S. (2006) Association of severity of hepatitis E virus infection in the mother and vertically transmitted infection in the fetus. *JK Pract.*, vol. 13, pp. 70–74.
12. Davydov V.V., ZHavoronok S.V., Krasochko P.A., Borisovets D.S., Prokopenkova T.M. (2020) Virus gepatita E – novyj pishchevoj patogen v Belarusi [The hepatitis E virus is a new food pathogen in Belarus]. *Healthcare*, no 6, pp. 19–25.
13. Tanaka T., Takahashi M., Kusano E., Okamoto H. (2007) Development and evaluation of an efficient cell-culture system for hepatitis E virus. *J Gen Virol*, vol. 88, pp. 903–911.
14. Barnaud E., Sophie Rogée S., Garry P., Rose N., Pavio N. (2012) Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol*, vol. 278, p. 5153.
15. Baylis S.A., Gärtner T., Nick S., Overmyr J., Blümel J. (2012) Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States. *Vox Sang*, vol. 103, pp. 89–90.
16. SaBTO (2016) Recommendations from the expert advisory committee on the Safety of Blood, Tissues and Organs on measures to protect patients from acquiring hepatitis E virus via transfusion or transplantation. Available at: <http://hospital.blood.co.uk/media/28794/sabto-recommendations-nov-2016.pdf>.
17. Faber M.S., Wenzel J.J., Jilg W., Thamm M., Höhle M., Stark K. (2012) Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg Infect Dis*, vol. 18, pp. 1654–1657.
18. Pas S.D., Streefkerk R.H., Pronk M., de Man R.A., Beersma M.F. (2013) Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol*, vol. 58, pp. 629–634.
19. Hyams C., Mabayoje D.A., Copping R., Maranao D., Patel M. (2014) Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol*, vol. 86, pp. 478–483.
20. Aggarwal R. (2013) Hepatitis E: clinical presentation in disease-endemic areas and diagnosis. *Seminars in liver disease*, vol. 33, no 1, pp. 30–40.
21. Molenaar-de Backer M.W. (2016) Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. *Transfusion*, vol. 56, no 2, pp. 440–448.
22. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA.
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, pp. 1547–1549.
24. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, vol. 40(15), p. 115. Available at: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>.
25. Integrated DNA Technologies, Inc. (2021) Available at: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
26. Arabey A.A., Marchuk S.I., Zhavoronok S.V., Davydov V.V., Kyureghian K.K., Mikhailov M.I. (2018) Adaptirovannyj metod polimeraznoj cepnoj reakcii dlya vyyavleniya virusa gepatita e u cheloveka i zhivotnyh [Adapted polymerase chain reaction method for detecting hepatitis E virus in humans and animals]. *Military medicine*, vol. 3, pp. 86–92.
27. Primadharsini P.P., Nagashima S., Okamoto H. (2019) Genetic Variability and Evolution of Hepatitis E Virus. *Viruses*, vol. 11, no 5, p. 456.
28. Smith D.B. (2016) Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol*, vol. 97, no 3, pp. 537–542.
29. Al-Sadeq D.W. (2018) Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 67, no 4, pp. 466–480.
30. Wang B. (2018) Comprehensive Molecular Approach for Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 Variants. *J Clin Microbiol*, vol. 56, no 5, pp. 452–461.

Подана/Submitted: 05.07.2021

Принята/Accepted: 06.09.2021

Контакты/Contacts: DavidovVV@bsmu.by