

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЯ ИМПЕДАНСНЫХ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ: ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА E

Бабенко Андрей Сергеевич¹, Грушевская Галина Владиславовна², Крылова Нина Георгиевна², Липневич Игорь Владимирович², Чакуков Руслан Фатихович³, Давыдов Владимир Витольдович¹, Задора Илона Сергеевна¹, Марчук Светлана Ивановна¹, Борисовец Дмитрий Сергеевич⁴, Карпуть Ирина Александровна⁵, Филонюк Василий Алексеевич¹, Жаворонок Сергей Владимирович¹

1 - Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

2 - Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;

3 - ООО «Умные ДНК Технологии», Минск, Беларусь;

4 - Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

5 - Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

РНК-САҚЛОВЧИ ВИРУСЛАР ЎЗГАРУВЧИ ГЕНОМЛАРИНИ АНИҚЛАШ УЧУН ИМПЕДАНС ДНК-НАНОСЕНСОРЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИНИ ҚЎЛЛАШ: ТАЖРИБАДА ГЕПАТИТ E ВИРУСИ ДИАГНОСТИКАСИ

Бабенко Андрей Сергеевич¹, Грушевская Галина Владиславовна², Крылова Нина Георгиевна², Липневич Игорь Владимирович², Чакуков Руслан Фатихович³, Давыдов Владимир Витольдович¹, Задора Илона Сергеевна¹, Марчук Светлана Ивановна¹, Борисовец Дмитрий Сергеевич⁴, Карпуть Ирина Александровна⁵, Филонюк Василий Алексеевич¹, Жаворонок Сергей Владимирович¹

1 – Беларус давлат тиббиёт университети, Минск ш., Беларус;

2 - Беларус давлат университети, Минск ш., Беларус;

3 - МЧЖ «Умные ДНК Технологии», Минск ш., Беларус;

4 – Беларус Миллий Фанлар Академияси С.Н. Вишелесский номидаги экспериментал ветеринария институти, Минск ш., Беларус;

5 – Гродно давлат тиббиёт университети, Гродно ш., Беларус

USING IMPEDANCE DNA-NANOSENSOR TECHNOLOGY TO DETECT VARIABLE GENOMES OF RNA-CONTAINING VIRUSES: EXPERIENCE IN DIAGNOSING HEPATITIS E VIRUS

Andrei S. Babenka¹, Halina V. Grushevskaya², Nina G. Krylova², Igor V. Lipnevich², Ruslan F. Chakukau³, Vladimir V. Davydov¹, Iona S. Zadora¹, Svetlana I. Marchuk¹, Dmitry S. Borisovets⁴, Irina A. Karputs⁵, Vasilii A. Filonyuk¹, Sergey V. Zhavoronok¹

1 - Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

2 - Belarusian State University, Minsk, Belarus;

3 - Smart DNA Technology LLC, Minsk, Belarus;

4 - Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshelesky, Minsk, Belarus;

5 - Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

e-mail: labmdbt@gmail.com, grushevskaja@bsu.by, krylovang@bsu.by, lipnevich@bsu.by, ruslan@nucleotica.com, DavidovVV@bsmu.by, zadora-ilona@mail.ru, marchuk_s@mail.ru, borisovets_bievm@mail.ru, karputirina@gmail.com, scinseprorektor@bsmu.by, zhavoronok.s@mail.ru

Резюме. Гепатит E вируси геноми жуда ўзгарувчан. Кенгайтирилган консервацияланган ҳудудларнинг йўқлиги ушбу вируснинг ПЗР диагностикасини мураккаблаштиради. Мақсад: импеданс ДНК наносенсорлари технологияси асосида гепатит E вируси РНКсини аниқлаш тизимини ишлаб чиқиш ва оптималлаштириш, шунингдек, таҳлил натижаларини сертификатланган диагностик реактивлар тўпламлари ёрдамида олинган натижалар билан солиштириш. Тадқиқот Минскдаги (Беларус) юқумли касалликлар шифохоналарида даволанаётган беморларнинг шаффоф нажас массаларининг клиник намуналаридан фойдаланилган. Маълумот сифатида HEV RT-PCR Kit 2.0 реактив тўплами (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия) ишлатилган. Вирус РНКни таниб олиш учун Ugene v. 35.0 (Unipro, РФ) дастури ёрдамида қўлланилган. Ушбу иш натижасида биз томонидан ишлаб чиқилган таҳлил протоколи билан импеданс ДНК наносенсорлари технологияси гепатит E вируси РНК клиник диагностикасида қўлланилиши мумкинлигини аниқладик. Олинган маълумотлар сертификатланган маълумотнома усулига тўлиқ мос келади.

Калит сўзлар: ДНК наносенсор, гепатит E вируси, реал вақтда ПЗР, клиник диагностика.

Abstract. The hepatitis E virus genome is highly variable. The absence of extended conserved regions complicates its detection by PCR. Aim of the study: to develop and optimize a system for detection hepatitis E virus RNA based on the technology of impedance DNA nanosensors, as well as to compare the results of the analysis with those obtained using certified diagnostic reagent kits. The study used clinical samples of translucent fecal masses of patients treated at the infectious diseases hospitals in Minsk (Belarus). The HEV RT-PCR Kit 2.0 reagent kit (RealStar®, Altona Diagnostics

GmbH, Germany) was used as a reference. The probe for virus RNA recognition was selected based on sequence alignment data of 500 hepatitis E virus genome isolates available in open sources (NCBI/nucleotide database) using the Ugene v. 35.0 (Unipro, RF). As a result of this work, we found that the technology of impedance DNA nanosensors with the analysis protocol developed by us can be used in the clinical diagnosis of hepatitis E virus RNA. The data obtained fully correspond to the data of the certified reference method.

Key words: DNA nanosensor, hepatitis E virus, real-time PCR, clinical diagnostics.

Актуальность исследования. В настоящее время одним из наиболее быстрых, точных и простых способов выявления РНК-содержащих вирусов является ПЦР в режиме реального времени с этапом обратной транскрипции [1]. Не смотря на ряд очевидных преимуществ, в реальной клинической диагностике эффективность использования такого подхода остается сравнительно низкой [2]. Проблема кроется в вариабельности генома РНК-содержащих вирусов. В некоторых случаях она не позволяет распознать патоген с помощью технологии ПЦР, поскольку однородные последовательности являются непротяженными и стандартный набор олигонуклеотидов (60 и более пар оснований) не может быть вписан в эти рамки. При этом использование «вырожденных» олигонуклеотидов решает проблему только отчасти незначительно увеличивая диагностическую чувствительность метода при ощутимом снижении специфичности [3, 4].

Одним из наиболее ярких примеров высокой изменчивости генома РНК-содержащего вируса, способным показать признанную проблему его ПЦР диагностики, является вирус гепатита Е. В настоящее время существуют сертифицированные для лабораторной диагностики коммерческие наборы реагентов, предназначенные для выявления РНК-генома вируса гепатита Е. Критическим, является признание разработчиками невозможности выявления 100% всех вариантов РНК вируса гепатита Е, что отражается в инструкциях по применению (P. Kar and R. Karna 2020) [5]. Полученные ранее экспериментальные данные показали, что при использовании на потоке подобные системы обладают показателями чувствительности и специфичности, не превышающими 75% [6].

К сожалению, даже использование высокопроизводительного секвенирования сотен изолятов генома вируса гепатита Е по всему миру не позволило решить указанную проблему. Сравнительно небольшой геном вируса практически лишен консервативных зон, что обуславливает актуальность поиска новых эффективных и экономически-оправданных подходов для выявления гепатита Е и РНК-содержащих вирусов в целом [7].

Одним из перспективных путей решения обозначенной проблемы является использование наносенсорных технологий, требующих для распознавания мишеней очень коротких последовательностей-зондов (обычно порядка 20-30 нуклеотидов), что резко снижает требования в отно-

шение длины консервативных участков генома РНК-вируса. В тоже время длина распознаваемой последовательности более 18 нуклеотидов позволяет практически во всех случаях добиваться специфичности равной 95-99,9%.

Технология ДНК-наносенсоров на данный момент не устоялась и постоянно развивается. Одним из проработанных нами направлений является использование импедансных ДНК-наносенсоров на основе многослойных углеродных нанотрубок. Данная технология не требует детекции с использованием оптических модулей, а основывается на измерениях электрических параметров системы до и после гибридизации. Система может быть полностью автоматизирована и быстро адаптирована для выявления специфических участков генома вирусов, грибов, бактерий, простейших, человека и др. животных. По сути процесс распознавания целевой последовательности посредством ДНК-наносенсора является частным случаем нанопорового секвенирования с использованием не белковых нанопор отличающихся высокой стабильностью. Также работа с наносенсорами не требует проведения ПЦР и доступна непосредственно после выделения образцов РНК/ДНК из биологического материала с перспективой использования образцов плазмы крови без процедуры выделения нуклеиновых кислот [8, 9].

В рамках настоящего исследования предположили, что использование технология импедансных ДНК-наносенсоров для выявления РНК вируса гепатита Е в образцах клинического материала может повысить качество диагностики данного патогена. На данном этапе работы была поставлена задача удостовериться в том, что данные получаемые с использованием этой технологии полностью соответствуют данным наиболее достоверного на данный момент теста, предназначенного для использования в рутинной диагностике.

Цель: разработать и оптимизировать систему детекции РНК вируса гепатита Е на базе технологии импедансных ДНК-наносенсоров, а также сравнить результаты анализа с полученными посредством использования сертифицированных диагностических наборов реагентов.

Материал и методы исследования. В исследовании использованы образцы биологического материала (просветные каловые массы) пациентов, проходивших лечение на базе Городской

детской инфекционной клинической больницы г. Минска (n = 40) и Городской клинической инфекционной больницы г. Минска (n = 200) в период 2017 – 2022 гг. Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов Viral RNA+DNA Preparation Kit - Column Kit (Jena Bioscience GmbH, Германия). В процессе выделения использовали рекомендации инструкции производителя набора. В качестве референсного метода выбрана ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «HEV RT-PCR Kit 2.0» (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия) предназначенного для клинической диагностики вируса гепатита Е на территории ЕС.

Синтез кДНК проводили до начала последующих этапов анализа с помощью 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 образцов, малого выхода РНК и относительно высокой стабильности РНК вируса гепатита Е.

Распознавание кДНК вируса гепатита Е с использованием технологии ДНК-наносенсоров проводили согласно разработанному и оптимизированному ранее способу [10, 11]. Для распознавания консервативного участка генома вируса гепатита Е использовали олигонуклеотидный зонд без дополнительных модификаций: TCCSSTATATTCATCCSAACCAACC (ОДО Праймтех, Беларусь). Зонд был выбран на основании данных выравнивания последовательностей 500 изолятов генома вируса гепатита Е доступных в открытых источниках (база данных NCBI/nucleotide) с помощью программы Ugene v. 35.0 (Unipro, РФ). Согласно данным анализа по-

следовательностей, выбранный зонд полностью покрывал 98,4% всех доступных изолятов.

Результаты исследования. С помощью референсного метода (ПЦР-РВ) были выявлены образцы, содержащие РНК вируса гепатита Е, n = 4. Из них 3 (3/40 – 7,5%) позитивных образцы в выборке детей и 1 (1/200 – 0,5%) позитивный образец в выборке взрослых. Образцы, не содержащие РНК вируса (n = 6) были выбраны случайным образом поровну из обеих выборок. Результаты анализа представлены в таблице 1.

В рамках выполненного сравнительного анализа установлено, что разработанные ДНК-наносенсоры для выявления вируса гепатита Е распознали его геномную РНК как в случае высокой, так и в случае низкой вирусной нагрузки. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов в ходе анализа зарегистрировано не было.

Обсуждение. В последние годы отмечается резкий рост популярности использования технологии ДНК-наносенсоров для анализа качественных и количественных характеристик нуклеиновых кислот, что по сути рассматривается как внедрение более прогрессивной технологии способной полностью заменить ПЦР в недалеком будущем как минимум за счет более высокой чувствительности и более широким возможностям по детекции высоковариабельных участков нуклеиновых кислот. В работе A. D. Chowdhury et al. [12] показано, что использование электрохимических наносенсоров на основе золотых частиц позволяет с высокой эффективностью не только определять малые количества РНК вируса гепатита Е, но и различать особенности генотипов этого патогена.

В тоже время T. Ngamdee et al. [13] отмечают высокий потенциал наносенсорных технологий для проведения экспресс диагностики в полевых условиях, высокую автономность и независимость оборудования и соответствующих материалов.

Таблица 1. Сравнение результатов выявления РНК вируса гепатита Е методом ПЦР-РВ и с использованием ДНК-наносенсоров

Образец	Вирусная нагрузка (ПЦР-РВ)	Результаты детекции	
		ПЦР-РВ качественная шкала	ДНК-наносенсор качественная шкала
1	высокая	+	+
2	умеренная	+	+
3	умеренная	+	+
4	низкая	+	+
5	отсутствует	–	–
6	отсутствует	–	–
7	отсутствует	–	–
8	отсутствует	–	–
9	отсутствует	–	–
10	отсутствует	–	–

Используемые в приведенных выше работах методы обладают рядом преимуществ свойственных технологии, однако сравнительно дороги из-за использования компонентов содержащих золото. Разработанные нами материалы основаны на использовании оксида алюминия и углеродных структур, что повышает экономическую эффективность их использования на потоке при сохранении всех преимуществ технологии.

Выводы. В результате проведенной работы мы установили, что технологии импедансных ДНК-наносенсоров с разработанным нами протоколом анализа может быть использована в клинической диагностике РНК вируса гепатита E. Получаемые данные полностью соответствуют данным сертифицированного референсного метода.

Литература:

1. Lin S, Yang L, Zhang YJ. Hepatitis E Virus: Isolation, Propagation, and Quantification. *Curr Protoc.* 2023 Jan;3(1):e642.
2. Alzate D, Lopez-Osorio MC, Cortés-Mancera F, Navas MC, Orozco J. Detection of hepatitis E virus genotype 3 in wastewater by an electrochemical genosensor. *Anal Chim Acta.* 2022 Aug 15;1221:340121.
3. Irshad M, Gupta P, Mankotia DS, Ansari MA. Multiplex qPCR for serodetection and serotyping of hepatitis viruses: A brief review. *World J Gastroenterol.* 2016 May 28;22(20):4824-34.
4. Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Delannoy S, Guillier L, Fach P, Perelle S. Quantification of Hepatitis E Virus in Naturally-Contaminated Pig Liver Products. *Front Microbiol.* 2016 Aug 3;7:1183.
5. Kar P, Karna R. A Review of the Diagnosis and Management of Hepatitis E. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2020;12(3):310-320.
6. Новая тест-система для выявления РНК вируса гепатита E методом ПЦР в режиме реального времени / В. В. Давыдов, А. С. Бабенко, С. В. Жаворонок [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 346-359.
7. Wang Y, Toh X, Ong J, Teo XH, Bay P, Fernandez CJ, Huangfu T. Serological prevalence and molecular characterization of hepatitis E virus in imported pigs in Singapore (2000-2019). *Transbound Emerg Dis.* 2022 Mar;69(2):286-296.
8. Saylan Y, Denizli A. Molecularly Imprinted Polymer-Based Microfluidic Systems for Point-of-Care Applications. *Micromachines (Basel).* 2019 Nov 11;10(11):766.
9. Ganganboina AB, Khoris IM, Chowdhury AD, Li TC, Park EY. Ultrasensitive Detection of the Hepatitis E Virus by Electrocatalytic Water Oxidation Using Pt-Co₃O₄ Hollow Cages. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020 Nov 11;12(45):50212-50221.
10. Nanopore–Penetration Sensing Effects for Target DNA Sequencing via Impedance Difference Between

Organometallic–Complex–Decorated Carbon Nanotubes with Twisted Single–Stranded or Double–Stranded DNA Babenko, A.S., Grushevskaya, H.V., Krylova, N.G., Egorova, V.P., Chakukov, R.F. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology* this link is disabled, 2020, pp. 247–258.

11. A Single-Molecule Label-Free Identification of Single-Nucleotide Colorectal-Cancer-DNA Polymorphism Using Impedance Spectroscopy of Self-Redox-Active Decorated Carbon Nanotubes Egorova, V.P., Grushevskaya, H.V., Babenka, A.S., Lipnevich, I.V., Vaskovtsev, E.V. *Semiconductorsthis*, 2020, 54(14), pp. 1873–1876.

12. Chowdhury AD, Takemura K, Li TC, Suzuki T, Park EY. Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection. *Nat Commun.* 2019 Aug 19;10(1):3737.

13. Ngamdee T, Yin LS, Vongpunsawad S, Poovorawan Y, Surareungchai W, Lertanantawong B. Target Induced-DNA strand displacement reaction using gold nanoparticle labeling for hepatitis E virus detection. *Anal Chim Acta.* 2020 Oct 16;1134:10-17.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИМПЕДАНСНЫХ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ РНК- СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ: ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ГЕПАТИТА E

Бабенко А.С., Грушевская Г.В., Крылова Н.Г.,
Липневич И.В., Чакуков Р.Ф., Давыдов В.В.
Задора И.С., Марчук С.И., Борисовец Д.С.,
Карпуть И.А., Филонюк В.А., Жаворонок С.В.

Резюме. Геном вируса гепатита E обладает высокой вариабельностью. Отсутствие протяженных консервативных участков затрудняет ПЦР-диагностику этого вируса. Цель: разработать и оптимизировать систему детекции РНК вируса гепатита E на базе технологии импедансных ДНК-наносенсоров, а также сравнить результаты анализа с полученными посредством использования сертифицированных диагностических наборов реагентов. В исследовании использованы клинические образцы просветных каловых масс пациентов, проходивших лечение на базе инфекционных больниц г. Минска (Беларусь). В качестве референсного использован набор реагентов «HEV RT-PCR Kit 2.0» (RealStar®, Altona Diagnostics GmbH, Германия). Зонд для распознавания РНК вируса был выбран на основании данных выравнивания последовательностей 500 изолятов генома вируса гепатита E доступных в открытых источниках (база данных NCBI/nucleotide) с помощью программы Ugene v. 35.0 (Unipro, РФ). В результате проведенной работы мы установили, что технологии импедансных ДНК-наносенсоров с разработанным нами протоколом анализа может быть использована в клинической диагностике РНК вируса гепатита E. Получаемые данные полностью соответствуют данным сертифицированного референсного метода.

Ключевые слова: ДНК-наносенсор, вирус гепатита E, ПЦР-РВ, клиническая диагностика.