

СЕКВЕНИРОВАНИЕ УЧАСТКА VP1–2A ГЕНОМА ДЛЯ СУБТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА А

DOI: 10.17691/stm2020.12.1.06

УДК 575.22:579.24:616.36–002.14

Поступила 12.08.2019 г.



А.А. Залесских, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии вирусных гепатитов;
Т.Н. Быстрова, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории эпидемиологии вирусных гепатитов

Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, 71, Н. Новгород, 603950

Цель исследования — совершенствование методики секвенирования участка VP1–2A генома для молекулярно-генетического типирования вируса гепатита А.

Материалы и методы. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью коммерческих наборов выделения нуклеиновых кислот и обратной транскрипции в ручном и автоматическом вариантах. Подбор последовательностей праймеров осуществляли с помощью программного обеспечения DNASTAR. Олигонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом с последующей очисткой электрофорезом в полиакриламидном геле. Искомые фрагменты генома получены методом ПЦР. Для приготовления реакционной смеси использовали коммерческие компоненты. Учет результатов проводили методом электрофореза в агарозном геле с окрашиванием ДНК бромидом этидия. Фрагменты ДНК после амплификации очищали методом адсорбции на колонках с диоксидом кремния. Определение последовательности очищенных фрагментов выполняли методом секвенирования по Сэнгеру. Полученные последовательности фрагмента VP1–2A анализировали в программном пакете MEGA6. Оптимизированная методика секвенирования участка VP1–2A генома возбудителя апробирована на 171 образце клинического материала и проб внешней среды, содержащих РНК вируса гепатита А.

Результаты. Методика секвенирования оптимизирована на этапе амплификации варибельного участка VP1–2A структурной части генома возбудителя, для чего были созданы авторские последовательности праймеров и подобраны условия полимеразной реакции (длина, локализация и температура отжига, концентрация праймеров и матрицы). Искомый фрагмент длиной 249 пар нуклеотидов находился в регионе 2988—3237 пар нуклеотидов согласно референсному штамму HM175. С помощью оптимизированной методики секвенирования фрагмента VP1–2A генома возбудителя в Н. Новгороде за период 2000–2017 гг. в 76 пробах из 171 образца, содержащего РНК возбудителя, установлен генотип вируса гепатита А. Выявлено преобладание возбудителя субтипа IA — 97% (74 из 76 образцов), и только 2 образца принадлежали субтипу IB.

Заключение. Оптимизированная методика секвенирования на этапе амплификации участка VP1–2A генома вируса гепатита А позволяет определять генотипическую структуру циркулирующих штаммов вируса, идентифицировать завозные штаммы возбудителя и устанавливать эпидемиологическую связь между различными случаями заболевания.

Ключевые слова: гепатит А; генотипирование; секвенирование.

Как цитировать: Zaleskikh A.A., Bystrova T.N. Sequencing of the VP1–2A genome segment for hepatitis A subtyping. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(1): 52–56, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.1.06>

English

Sequencing of the VP1–2A Genome Segment for Hepatitis A Subtyping

A.A. Zaleskikh, PhD, Senior Researcher, Laboratory for the Epidemiology of Viral Hepatitis;

T.N. Bystrova, DSc, Professor, Leading Researcher, Laboratory for the Epidemiology of Viral Hepatitis

Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod,
Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор),
71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The aim of the study was to improve the VP1–2A sequencing method and facilitate the hepatitis A virus genotyping technique.

Materials and Methods. Nucleic acids were extracted by using commercial kits for nucleic acid extraction and reverse transcription in a manual and automatic version. Primer sequences were selected using the DNASTAR software. Oligonucleotides were synthesized

Для контактов: Залесских Артем Александрович, e-mail: gepatit-bystrova@yandex.ru

by the amidophosphite method followed by purification with polyacrylamide gel electrophoresis. The sought fragments of the genome were obtained with PCR. Commercial components were used to prepare the reaction mixture. The results were verified by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide DNA staining. After amplification, the DNA fragments were purified by adsorption on silica columns. Sequence identification of the purified fragments was performed by the Sanger sequencing method. The obtained sequences of the VP1–2A fragment were analyzed by the MEGA 6 software package. The optimized technique for sequencing of the VP1–2A segment was tested with 171 clinical and environmental samples containing hepatitis A virus RNA.

Results. The sequencing technique has been optimized at the stage of amplification of the variable VP1–2A structural genome segment. To obtain this result, we created original primer sequences and selected the polymerase reaction conditions (length, localization and annealing temperature, concentration of the primers and template). The sought fragment with a length of 249 nucleotide pairs was located between the 2988th and 3237th base pairs as per the reference HM175 strain. Using this optimized method of VP1–2A fragment sequencing, the hepatitis A genotype was detected in 76 from 171 samples containing hepatitis A virus RNA in the city of Nizhny Novgorod from 2000 to 2017. The prevalence of the IA subtype was found in 97% of cases (74 of 76 samples), and only 2 samples contained subtype IB.

Conclusion. The sequencing technique optimized at the stage of VP1–2A fragment amplification allows one to determine the hepatitis A virus genotype, identify imported virus strains, and also establish an epidemiological relationship between different cases of the disease.

Key words: hepatitis A; genotyping; sequencing.

Введение

Гепатит А продолжает оставаться самой частой причиной вирусного гепатита. В течение последних двух лет в странах Западной Европы, традиционно относящихся к низкоэндемичным территориям, зарегистрировано более 25 тыс. случаев этого заболевания [1–3].

В России гепатит А также относят к инфекциям, имеющим большое социально-экономическое значение. Уровень официально регистрируемой заболеваемости в стране колебался в течение последних 10 лет в значительных пределах от — 4,29 до 37,9 на 100 тыс. населения. В 2017 г. по сравнению с 2016 г. выросло на 20% число очагов групповой заболеваемости [4–7]. Сохраняются выраженные различия показателя инцидентности в субъектах страны: в ряде регионов заболеваемость гепатитом А превысила среднероссийский показатель в 1,5–4 раза. Эта инфекция в последнее десятилетие стойко занимает второе место после хронического гепатита С по величине экономического ущерба среди вирусных гепатитов. В 2017 г. он составил более 1 млрд. рублей [5, 7–9].

Молекулярно-генетические методы исследования, включая определение разнообразия геновариантов возбудителя, являются теоретической базой изучения особенностей проявления эпидемического процесса гепатита А и механизмов его регуляции. Развитие молекулярно-генетических технологий в последние десятилетия позволило не только изучать изменчивость возбудителя инфекции, но и существенно поднять уровень эпидемиологической диагностики при работе в эпидемических очагах за счет более точного определения источников инфекции, путей и факторов передачи вируса гепатита А, установления эпидемиологической связи между различными случаями инфицирования. Вместе с тем в России имеются лишь единичные работы о генотипической структуре вируса гепатита А, циркулирующего на различных территориях страны. Проведение исследований затруднено в

связи с отсутствием коммерческих наборов реагентов для генотипирования.

Генетическую изменчивость возбудителя чаще всего исследуют с помощью метода секвенирования, для чего выполняется амплификация искомого фрагмента генома вируса. Для проведения реакции применяются собственные или описанные в литературе последовательности праймеров и условия реакции, эффективность которых варьирует в широких пределах [10–15].

Цель исследования — совершенствование методики секвенирования участка VP1–2A генома для молекулярно-генетического типирования вируса гепатита А.

Материалы и методы

Экстракцию нуклеиновых кислот и обратную транскрипцию РНК в комплементарную ДНК проводили с помощью коммерческих наборов выделения нуклеиновых кислот и обратной транскрипции в ручном и автоматическом вариантах с применением роботизированной станции (Xiril, Швейцария).

Подбор последовательностей праймеров осуществляли с помощью программы PrimerSelect программного пакета DNASTAR (США). Олигонуклеотиды синтезированы амидофосфитным методом с последующей очисткой электрофорезом в полиакриламидном геле («Синтол», Россия).

Для приготовления ПЦР использовали коммерческие компоненты («Интерлабсервис», Россия): буфер для ПЦР (концентрация $MgCl_2$ — 15 мкмоль/л); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (концентрации каждого — 1,74 мкмоль/л); Taq-полимеразу (активностью 5 ед./мкл). Реакцию амплификации проводили с помощью амплификатора Maxygene Therm-1000 (Axugen, США).

Электрофорез продуктов ПЦР выполняли в 1,5% агарозном геле с окрашиванием ДНК бромидом этидия и фиксированием результатов в системе гель-документации G:Box F3 (Syngene, США).

Фрагменты ДНК после амплификации очищали методом адсорбции на колонках с диоксидом кремния с помощью набора для очистки смесей для ПЦР (Qiagen, США). Определение последовательности очищенных фрагментов проводили на генетическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Полученные последовательности фрагмента VP1–2A анализировали в программном пакете MEGA6, а также с помощью онлайн-сервисов BLAST (NCBI, США), Hepatitis A virus genotyping tool (RIVM, Нидерланды, <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hav/introduction>).

Оптимизированная методика секвенирования участка VP1–2A генома возбудителя апробирована на 171 образце клинического материала и проб внешней среды, содержащих РНК вируса гепатита А. В процессе исследования использовали клинический материал от больных гепатитом А и концентраты сточных вод, отобранных в Н. Новгороде за период 2000–2017 гг.

Результаты и обсуждение

В качестве цели для секвенирования был выбран участок VP1–2A структурной части генома вируса гепатита А, обладающий достаточно высокой вариабельностью относительно других регионов генома. В библиотеке NCBI Genbank накоплено большое число охарактеризованных по данному участку изолятов вируса, выделенных в разных странах [16, 17].

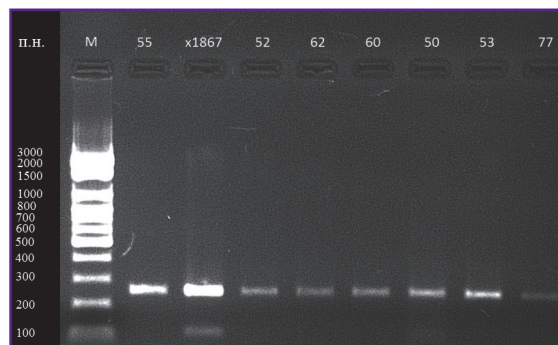
Для оптимизации методики секвенирования на этапе амплификации искомого участка применяли авторские праймеры, созданные на основе последовательностей, использованных В.Н. Robertson и соавт. в исследованиях по открытию генотипов вируса гепатита А [18]. Модификацию осуществляли с целью сближения температуры плавления олигонуклеотидов, для минимизации вероятности появления шпилек и праймер-димеров. Необходимые параметры достигнуты путем изменения длины праймеров и локализации их отжига с помощью программного обеспечения DNASTAR, что позволило существенно повысить эффективность амплификации по сравнению с прототипными олигонуклеотидами. Последовательность праймеров указана в таблице.

Длина искомого фрагмента амплификации составляла 249 пар нуклеотидов (см. рисунок). Реакционная смесь включала в себя следующие

Последовательность праймеров для амплификации участка VP1–2A генома вируса гепатита А

Тип	Последовательность	Длина, нуклеотидов	Локализация*
Прямой	5'-AGAGCTCCATTGAACTCA-AATGC-3'	23	2988–3010
Обратный	5'-AAAACAGTCCCTTCATTTT-CCTAGG-3'	25	3213–3237

* — нумерация нуклеотидов согласно геному референсного штамма вируса гепатита А HМ175.



Электрофореграмма амплифицированных фрагментов VP1–2A генома вируса гепатита А длиной 249 пар нуклеотидов (п. н.), левый ряд — маркер молекулярной массы

компоненты: 5 мкл буфера для ПЦР; 2,5 мкл смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов; по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров (концентрации — 3 мкмоль/л каждого); 0,25 мкл Taq-полимеразы; 2,25 мкл деионизированной воды. Общий объем смеси составил 25 мкл, включая 10 мкл комплементарной ДНК исследуемого образца.

При амплификации использовали следующую программу для термоциклера: 95°C — 5 мин; затем 42 цикла (95°C — 10 с; 53,5°C — 10 с; 72°C — 10 с), заключительная элонгация: 72°C — 1 мин. Температуру отжига праймеров (53,5°C) подбирали экспериментально для достижения максимального выхода специфического продукта реакции, количество которого учитывалось с помощью электрофореза.

Вариабельный фрагмент генома VP1–2A вируса гепатита А был получен в 76 образцах из 171, положительных на РНК возбудителя. Можно предположить, что такой результат связан с низкой концентрацией РНК в пробах и разной чувствительностью тест-системы для определения РНК и описанной методики, что требует дальнейшего исследования.

После амплификации образцы очищали от продуктов реакции, а затем проводили определение последовательности полученных фрагментов на автоматическом секвенаторе. Полученные последовательности VP1–2A выравняли между собой и анализировали на гомологию с депонированными в Genbank изолятами вируса гепатита А различного географического происхождения в программном пакете MEGA6.

Впервые с помощью оптимизированной методики секвенирования фрагмента VP1–2A генома возбудителя показана исключительная циркуляция в период 2000–2017 гг. среди населения Н. Новгорода I генотипа вируса гепатита А. Установлено, что субтип IA преобладал в 97% (74 образца из 76), и только 2 образца принадлежали субтипу IB.

Филогенетический анализ пока-

зал, что гомология всех изолятов вируса гепатита А субтипа 1А составляла 93% (за 100% принимается полная идентичность изолятов) и выше с последовательностями, выделенными в европейской части России и образующими единый филогенетический кластер. Это согласуется с данными публикаций о циркулирующих в европейской части России геновариантах вируса гепатита А [13, 19]. Обнаруженные штаммы субтипа 1В имели максимальную гомологию с изолятами, выделенными в Египте и Болгарии, что указывает на вероятные завозные случаи инфекции из стран Средиземноморья [20].

Заключение

Оптимизированная методика секвенирования на этапе амплификации участка VP1–2А генома вируса гепатита А позволила впервые определить генотипическую структуру циркулирующих штаммов этого вируса в Н. Новгороде в 2000–2017 гг. и может использоваться для слежения за циркуляцией и изменчивостью вируса гепатита А, для расследования групповых заболеваний, установления эпидемиологической связи между различными случаями заболевания и идентификации завозных штаммов возбудителя.

Финансирование исследования. Работа выполнена по государственному заданию в рамках утвержденной темы НИР ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

- Vaz J., Floyd C., Mason B., Shankar A.G., Lewis H. Control of a community outbreak of hepatitis A in an area of low endemicity, Wales, 2016. *Hum Vaccin Immunother* 2017; 13(10): 2352–2356, <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1347242>.
- Michaelis K., Wenzel J.J., Stark K., Faber M. Hepatitis A virus infections and outbreaks in asylum seekers arriving to Germany, September 2015 to March 2016. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6(4): e26, <https://doi.org/10.1038/emi.2017.11>.
- Gallone M.F., Desiante F., Gallone M.S., Barbuti G., Tafuri S., Germinario C. Serosurveillance of hepatitis A in a region which adopted the universal mass vaccination. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(9): e5884, <https://doi.org/10.1097/md.0000000000005884>.
- Гепатит А: этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика.** Под ред. В.В. Шкарина. Н. Новгород: НижГМА; 2015.
Gepatit A: etiologiya, epidemiologiya, diagnostika, profilaktika [Hepatitis A: etiology, epidemiology, diagnosis, prevention]. Pod red. Shkarina V.V. [Shkarin V.V. (editor)]. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2015.
- Вирусные гепатиты в Российской Федерации: аналитический обзор.** Под ред. Покровского В.И., Тотоляна А.А. СПб: ФБУН НИИЭМ им. Пастера; 2016.
Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii: analiticheskiy obzor. Pod red. Pokrovskogo V.I., Totolyana A.A. SPb: FBUN NIIEM im. Pastera; 2016.
- obzor. Pod red. Pokrovskogo V.I., Totolyana A.A. [Pokrovskiy V.I., Totolyan A.A. (editors)]. Saint Petersburg: FBUN NIIEM im. Pastera; 2016.
- Кареткина Г.Н. Вирусный гепатит А в прошлом, настоящем и будущем. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение* 2014; 3(8): 38–48.
Karetkina G.N. Viral hepatitis A: past, present and future. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* 2014; 3(8): 38–48.
- Мукомолов С.Л., Михайлов М.И., Семенов Т.А., Селькова Е.П., Герасимова И.Е. Бремя гепатита А в Российской Федерации: научный обзор. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2014; 6(79): 24–34.
Mukomolov S.L., Mikhailov M.I., Semenenko T.A., Sel'kova E.P., Gerasimova I.E. Review: burden of hepatitis A in Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika* 2014; 6(79): 24–34.
- Чернов А.В., Брусенская Т.Ю., Корчагин В.В. Анализ заболеваемости острыми вирусными гепатитами по Воронежской области. *Территория инноваций* 2017; 4(8): 117–120.
Chernov A.V., Brusenskaya T.Y., Korchagin V.V. Analysis of the incidence of acute viral hepatitis in the Voronezh region. *Territoriya innovatsiy* 2017; 4(8): 117–120.
- WHO position paper on hepatitis A vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87(28/29): 261–276. URL: http://www.who.int/wer/2012/wer8728_29/en/.
- Карандашова И.В., Пименов Н.Н., Неверов А.Д., Михайловская Г.В., Долгин В.А., Браславская С.И., Комарова С.В., Лыткина И.Н., Шулакова Н.И., Шипулин Г.А., Чуланов В.П. Молекулярно-эпидемиологические особенности вспышки гепатита А в Москве. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы* 2012; 3: 9–14.
Karandashova I.V., Pimenov N.N., Neverov A.D., Mikhailovskaya G.V., Dolgin V.A., Braslavskaya S.I., Komarova S.V., Lytkina I.N., Shulakova N.I., Shipulin G.A., Chulanov V.P. Molecular epidemiological characteristics of hepatitis A outbreak in Moscow. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* 2012; 3: 9–14.
- Bondarenko T.Y., Ternovoi V.A., Netesov S.V. Hepatitis a virus: structure-functional features of genome, molecular diagnostics, and cultivation. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2013; 28(3): 99–109, <https://doi.org/10.3103/s0891416813030038>.
- Мукомолов С.Л., Калинина О.В. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов. *Мир вирусных гепатитов* 2003; 11: 2–7.
Mukomolov S.L., Kalinina O.V. The molecular epidemiology of viral hepatitis. *Mir virusnykh gepatitov* 2003; 11: 2–7.
- Чуланов В.П., Карандашова И.В., Пименов Н.Н., Молочный В.П., Томилка Г.С., Слепцова С.С., Семенова В.К., Малый В.П., Бойко В.В., Камолов Б.Д., Волчкова Е.В. Клиническое значение генетического разнообразия вируса гепатита А. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2014; 19(4): 12–17.
Chulanov V.P., Karandashova I.V., Pimenov N.N., Molochniy V.P., Tomilka G.S., Sleptsova S.S., Semenova V.K., Malyy V.P., Boiko V.V., Kamolov B.D., Volchkova E.V. Clinical significance of genetic diversity of hepatitis A virus. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 2014; 19(4): 12–17.
- Nainan O.V., Xia G., Vaughan G., Margolis H.S. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach.

Clin Microbiol Rev 2006; 9(1): 63–79, <https://doi.org/10.1128/cmr.19.1.63-79.2006>.

15. Vaughan G., Goncalves Rossi L.M., Forbi J.C., de Paula V.S., Purdy M.A., Xia G., Khudyakov Y.E. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* 2014; 21: 227–243, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.023>.

16. Costa-Mattioli M., Di Napoli A., Ferré V., Billaudel S., Perez-Bercoff R., Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 12): 3191–3201, <https://doi.org/10.1099/vir.0.19532-0>.

17. Sánchez G., Bosch A., Pintó R.M. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol* 2003; 77(1): 452–459, <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.452-459.2003>.

18. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 6): 1365–1677, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1365>.

19. Mukomolov S., Kontio M., Zheleznova N., Jokinen S., Sinayskaya E., Stalevskaya A., Davidkin I. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St. Petersburg, Russia. *J Med Virol* 2012; 84(10): 1528–1534, <https://doi.org/10.1002/jmv.23378>.

20. Bruni R., Taffon S., Equestre M., Cella E., Lo Presti A., Costantino A., Chionne P., Madonna E., Golkocheva-Markova E., Bankova D., Ciccozzi M., Teoharov P., Ciccaglione A.R. Hepatitis A virus genotypes and strains from an endemic area of Europe, Bulgaria 2012–2014. *BMC Infect Dis* 2017; 17(1): 497, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2596-1>.