

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-192

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АМПЛИФИКАЦИИ SMART  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ РИНОВИРУСОВ****USING SMART AMPLIFICATION TECHNOLOGY TO OBTAIN WHOLE RHINOVIRUSES GENOMES**А. Д. Ксенафонтов<sup>1</sup>, А. В. Фадеев<sup>1</sup>, М. Коржанова<sup>1</sup>,  
С. А. Гешко<sup>1</sup>, А. Б. Комиссаров<sup>1</sup>, И. В. Киселёва<sup>2</sup>, Д. А. Лиознов<sup>1,3</sup><sup>1</sup>НИИ группа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург<sup>3</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. ПавловаA. D. Ksenafontov<sup>1</sup>, A. V. Fadeev<sup>1</sup>, M. Korzhanova<sup>1</sup>, S. A. Geshko<sup>1</sup>, A. B. Komissarov<sup>1</sup>, I. V. Kiseleva<sup>2</sup>, D. A. Lioznov<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg<sup>2</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg<sup>3</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

✉ ksenandrey@yandex.ru

**Аннотация**

Риновирусы — одни из самых распространенных респираторных вирусов, генетическое разнообразие которых в России и в мире мало изучено. Они делятся на три вида: А, В, С. Известно 169 типов. Высокое разнообразие последовательностей геномов риновирусов затрудняет применение ампликонного секвенирования, поэтому для проведения мониторинга нами была модифицирована технология SMART. В работу взято 563 назофарингеальных образца, собранные в период 2018–2023 гг. Вид был определен у 54,71 % образцов (n = 308), среди них RV-A — 56,82 % (n = 175), RV-B — 6,82 % (n = 21), RV-C — 36,36 % (n = 112). Тип определен у 44,4 %, n = 250. Получено 24 полных генома.

**Abstract**

Rhinoviruses are one of most common respiratory viruses. Their genetic diversity is poorly studied in Russia and worldwide. Rhinoviruses are divided into three types: A, B, C. There are 169 known types. The high diversity of rhinovirus genome sequences complicates the application of amplicon sequencing. Therefore, we modified the SMART technology for monitoring purposes. A total of 563 nasopharyngeal samples collected from 2018 to 2023 were analyzed. The species was identified in 54.71 % of the samples (n = 308), among which 56.82 % (n = 175) were RV-A, 6.82 % (n = 21) were RV-B, and 36.36 % (n = 112) were RV-C. A total of 24 whole genomes were obtained.

**Актуальность темы исследования**

Риновирусы — одни из самых распространенных респираторных вирусов. Они принадлежат к семейству *Picornoviridae*, роду *Enterovirus* и делятся на три вида: риновирусы А (RV-A), риновирусы В (RV-B) и риновирусы С (RV-C), которые делятся на 169 типов [1].

Геном состоит из 5'-нетранслируемого региона (5'-UTR), открытой рамки считывания (ORF) и 3'-нетранслируемого региона (3'-UTR), который заканчивается poly-A-хвостом [2]. ORF делится на три участка, один из которых (P1) содержит гены, кодирующие структурные белки (VP1-VP4), а два других (P2 и P3) — неструктурные.

Для определения видовой принадлежности риновирусов применяют капиллярное секвенирование участков VP1 и VP4/VP2 [3, 4]. В связи с высокой вариабельностью геномов риновирусов дизайн праймерных панелей для их ампликонного секвенирования крайне затруднителен. В качестве альтернативы использованию праймерных панелей была выбрана технология SMART [5], использующая особенности обратной транскриптазы MMLV для введения служебных последовательностей в кДНК с последующей сиквенс-независимой амплификацией.

Для повышения эффективности применения протокола SMART на риновирусных геномах была проведена адаптация протокола — подобраны специальные праймеры, состоящие из двух частей:

- служебной последовательности (5'-конец, заранее известной);
- специфической части (3'-конец).

Для подбора специфической части были отобраны участки генома риновирусов длиной 9 оснований, располагающиеся перед poly-A-хвостом и повторяющиеся у большинства типов. Затем была проведена проверка частоты встречаемости выбранных участков на протяжении всей длины генома. Были отобраны наиболее часто

встречаемые участки. После по принципу комплементарности к выбранным участкам были подобраны специфические части.

В общей сложности был подобран 21 праймер, из них для RV-A — семь, для RV-B — шесть, для RV-C — восемь.

### Материалы и методы

Для апробации метода был использован изолят риновируса 1979 г. из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

В качестве материала служили назофарингеальные образцы от госпитализированных пациентов, собранные в рамках госпитального надзора за гриппом и ОРВИ (GHSN) в период 2018–2023 гг. Критерием отбора служило значение порогового цикла (Ct) в ПЦР в реальном времени по данным тестирования с использованием «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). В работу брались образцы с Ct меньше 26. Всего было отобрано 563 образца.

Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось набором для выделения на магнитных частицах NAmagp100, ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Обратная транскрипция РНК осуществлялась набором RNAscribe RT, ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Накопление продуктов обратной транскрипции осуществлялось посредством ПЦР с помощью набора «БиоМастер LR HS-ПЦР (2X)», ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия).

Библиотеку готовили с помощью набора MGIEasy Fast PCR-Free FS Library Prep Set (MGITech, Китай). Приготовленные библиотеки секвенированы при помощи набора для FCL SE100 на приборе DNBSEQ-G400 (MGITech, Китай).

Сборку геномов проводили на референсные последовательности из базы данных GenBank с использованием инструментов BWA, samtools, iVar.

### Результаты

При апробации метода был получен полный геном риновируса A13, который был выложен в базу данных GenBank под номером PP997254.1.

При дальнейшем применении метода был определен вид у 54,71 % образцов (n = 308), у 44,4 % (n = 250) — тип. Было получено 24 полных геномов.

В результате генотипирования было выявлено преобладание RV-A над остальными риновирусами — 56,82 % (n = 175) от общего числа образцов, у которых определен вид. В меньшей степени детектировано RV-C — 36,36 % (n = 112). Меньше всего обнаружено RV-B — 6,82 % (n = 21). Было выявлено 73 типа RV-A, 15 типов RV-B и 45 типов RV-C.

Для валидации разработанного метода типирования риновирусов было проведено капиллярное секвенирование участка генома VP4/VP2 восьми риновирусов из данной выборки. Вид и тип совпали в каждом случае.

### Обсуждение

Применение технологии SMART позволило определить видовую принадлежность риновирусов в 54,71 % исследованных респираторных образцов, а полученные результаты совпали с результатами капиллярного секвенирования. Разработанный протокол может найти свое применение в геномном надзоре за разнообразием риновирусов, циркулирующих в Российской Федерации.

### Литература

1. Simmonds P, Gorbalenya A. E., Harvala H. et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses // Arch Virol. 2020. Vol. 165, No. 3. P. 793–797.
2. Jain S., Self W. H., Wunderink R. G. et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. adults // N. Engl. J. Med. 2015. Vol. 373, No. 5. P. 415–427.
3. da Costa Souza L., Bello E. J. M., Dos Santos E. M., Nagata T. Molecular and clinical characteristics related to rhinovirus infection in Brasília, Brazil // Braz. J. Microbiol. 2021. Vol. 52, No. 1. P. 289–298.
4. Wang W., He J., Liu Y. et al. Molecular genotyping of human rhinovirus by using PCR and Sanger sequencing // Methods Mol Biol. 2015. Vol. 1221. P. 39–47.
5. Claro I. M., Ramundo M. S., Coletti T. M. et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing // Wellcome Open Res. 2023. Vol. 6. P. 241.