

NGS-ТЕХНОЛОГИЯ В МОНИТОРИНГЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА

DOI: 10.17691/stm2023.15.2.04

УДК 616.9–022:578.825.12:004.891.3

Поступила 05.12.2022 г.

© **О.Е. Ванькова**, старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов;
Н.Ф. Бруснигина, к.м.н., зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов;
Н.А. Новикова, д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций

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

Современные молекулярно-генетические методы, в частности массовое параллельное секвенирование (NGS), позволяют проводить генотипирование различных возбудителей с целью их эпидемиологического маркирования и совершенствования молекулярно-эпидемиологического надзора за актуальными инфекциями, включая цитомегаловирусную инфекцию.

Цель исследования — оценить возможности использования технологии NGS для генотипирования клинических изолятов цитомегаловируса (ЦМВ).

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы биологических субстратов (лейкоцитарная масса, слюна, моча), взятые у пациентов, перенесших трансплантацию печени и почек. Для генотипирования были отобраны образцы ДНК ЦМВ. Детекцию этих образцов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением коммерческих диагностических тест-систем «АмплиСенс CMV-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Выделение ДНК проводили с использованием наборов «ДНК-сорб-АМ» и «ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ) в соответствии с инструкцией по применению. Оценку качества подготовленной библиотеки ДНК для секвенирования осуществляли с помощью системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Германия). Выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, США). Анализ результатов секвенирования выполняли с помощью инструмента BLAST сервера NCBI.

Результаты. Генотип ЦМВ определяли по двум вариабельным генам *UL55(gB)*, *UL73(gN)* с использованием технологии NGS на платформе-секвенаторе MiSeq (Illumina, США). На основе проведенных поисковых исследований и анализа источников литературы выбраны праймеры для генотипирования по генам *UL55(gB)* и *UL73(gN)* и определены оптимальные условия проведения ПЦР. Результаты секвенирования фрагментов генов *UL55(gB)* и *UL73(gN)* клинических изолятов ЦМВ, выделенных у реципиентов солидных органов, позволили определить генотипы вируса, среди которых доминирующими являются gB2, gN4c и gN4b. В ряде случаев выявлена ассоциация двух и трех генотипов ЦМВ.

Заключение. Применение технологии NGS для генотипирования штаммов ЦМВ может стать одним из основных методов молекулярной эпидемиологии ЦМВ-инфекции, так как позволяет получать достоверные результаты при существенном сокращении времени на проведение исследований.

Ключевые слова: NGS-технология; цитомегаловирус; генотипирование цитомегаловируса.

Как цитировать: Vankova O.E., Brusnigina N.F., Novikova N.A. NGS technology in monitoring the genetic diversity of cytomegalovirus strains. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(2): 41, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.2.04>

Для контактов: Ванькова Ольга Евгеньевна, e-mail: voe0@mail.ru

NGS Technology in Monitoring the Genetic Diversity of Cytomegalovirus Strains

O.E. Vankova, Head Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens;
N.F. Brusnigina, MD, PhD, Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens;
N.A. Novikova, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia

Modern molecular genetic methods, massive parallel sequencing in particular, allow for genotyping of various pathogens with the aim of their epidemiological marking and improvement of molecular epidemiological surveillance of actual infections, including cytomegalovirus infection.

The aim of the study is to evaluate the next-generation sequencing (NGS) technology for genotyping clinical isolates of cytomegalovirus (CMV).

Materials and Methods. The object of the study were samples of biological substrates (leukocyte mass, saliva, urine) taken from patients who underwent liver and kidney transplantation. Detection of CMV DNA was carried out by a real-time PCR using commercial diagnostic AmpliSense CMV-FL test systems (Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia). DNA extraction was performed using DNA-sorb AM and DNA-sorb V kits (Central Research Institute for Epidemiology) in accordance with manufacturer's manual. The quality of the prepared DNA library for sequencing was assessed by means of the QIAxcel Advanced System capillary gel electrophoresis system (QIAGEN, Germany). Alignment and assembly of nucleotide sequences were carried out using CLC Genomics Workbench 5.5 software (CLC bio, USA). The sequencing results were analyzed using BLAST of NCBI server.

Results. CMV DNA samples were selected for genotyping. The two variable genes, *UL55(gB)* and *UL73(gN)*, were used for CMV genotype determination, which was performed using NGS technology MiSeq sequencer (Illumina, USA). Based on the exploratory studies and analysis of literature sources, primers for genotyping on the *UL55(gB)* and *UL73(gN)* genes have been selected and the optimal conditions for the PCR reaction have been defined. The results of sequencing the *UL55(gB)* and *UL73(gN)* gene fragments of CMV clinical isolates from recipients of solid organs made it possible to determine the virus genotypes, among which gB2, gN4c, and gN4b were dominant. In some cases, association of two and three CMV genotypes has been revealed.

Conclusion. The application of the NGS technology for genotyping cytomegalovirus strains can become one of the main methods of CMV infection molecular epidemiology, as it allows for obtaining reliable results with a significant reduction in research time.

Key words: NGS-technology; cytomegalovirus; cypomegalovirus genotyping.

Введение

В настоящее время молекулярно-генетические методы исследования занимают одно из важнейших мест в диагностике инфекционных заболеваний и эпидемиологическом надзоре за ними. Оснащение современных лабораторий автоматическими капиллярными секвенаторами, использующими метод Сэнгера, а также платформами для массового параллельного секвенирования (NGS) позволяет проводить генотипирование различных возбудителей с целью их эпидемиологического маркирования и совершенствования молекулярно-эпидемиологического надзора за актуальными инфекциями, включая цитомегаловирусную инфекцию.

Цитомегаловирус (ЦМВ) является одной из основных причин врожденной патологии у детей раннего возраста (частота инфицирования плода колеблется в пределах от 6 до 53%, среди недоношенных детей — 70%), а также основной причиной развития осложне-

ний после трансплантации гемопоэтических клеток, солидных органов и возникновения тяжелых пневмоний у ВИЧ-инфицированных больных [1, 2].

Цитомегаловирус — ДНК-содержащий вирус, относящийся к отряду *Herpesvirales*, семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Cytomegalovirus*, виду *Human herpesvirus 5*. Генотип ЦМВ определяется комплексом генов. Известны 12 генов, для которых характерны полиморфизмы: *RL5A*, *RL6*, *RL12*, *RL13*, *UL1*, *UL9*, *UL11*, *UL73*, *UL74*, *UL120*, *UL146* и *UL139* [3–6].

В настоящее время используются разные системы генотипирования, основанные на анализе гипервариабельных генов [3]. Наиболее изученными и «аккредитованными» в качестве потенциальных эпидемиологических маркеров являются гены *UL55(gB)*, *UL73(gN)*, *UL74(gO)*, *UL144-TNRF* [3–5].

Генетическая изменчивость ЦМВ позволяет вирусу реализовать способы иммунного уклонения (например, изменение антигенных эпитопов), увеличить

тропизм к клеткам организма-хозяина, повысить эффективность репликации вируса, изменить чувствительность к фармацевтическим препаратам.

Для идентификации вариантов ЦМВ, содержащегося в биоматериалах инфицированных лиц, используют различные методы: анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК, фрагментное секвенирование по Сэнгеру, генотип-специфическую ПЦР в реальном масштабе времени, массовое параллельное секвенирование. Предпочтительными являются методы анализа ДНК, основанные на секвенировании. С их помощью продемонстрировано, что в мире существует большое количество генетически разнообразных штаммов ЦМВ [7–9].

Полиморфные гены используются как эпидемиологический маркер при изучении циркуляции вируса в человеческой популяции. Геномные варианты ЦМВ-штаммов из различных географических регионов могут быть идентичными, существенно отличаются лишь показатели частоты их встречаемости. При этом имеется вероятность обнаружения редких или новых вариантов ЦМВ в регионах, изолированных от остального мира [3, 7].

Учитывая вариабельность последовательности гена *UL55*, кодирующего гликопротеин gB, выделяют 7 основных генотипов ЦМВ: gB1, gB2, gB3, gB4, gB5, gB6, gB7 [4, 10]. Показано [4, 5], что замены неконсервативных аминокислот происходят в тех участках, которые имеют функциональную или иммунологическую активность. Ген *UL73*, кодирующий поверхностный гликопротеин gN, также является полиморфным и позволяет выделить 7 gN-генотипов ЦМВ (gN1, gN2, gN3a, gN3b, gN4a, gN4b, gN4c) [3, 11]. Гликопротеин gN — самый полиморфный среди белков ЦМВ человека [11].

Технология NGS дает возможность секвенировать одновременно тысячи молекул ДНК, тем самым повышая скорость исследования и увеличивая объем получаемых данных. Применение платформ NGS для генотипирования позволяет получать достоверные результаты при существенном сокращении времени, затрачиваемого на их получение и анализ. Кроме того, с использованием NGS-технологии можно в одной реакции определить наличие нескольких штаммов вируса, в том числе и тех, которые присутствуют в минорных количествах [12]. Известно, что у иммунокомпетентных пациентов (ВИЧ-инфицированных или перенесших пересадку органа), а также у новорожденных с врожденной ЦМВ-инфекцией часто наблюдается инфицирование более чем одним штаммом ЦМВ. У пациентов после трансплантации органов на фоне иммуносупрессивной терапии могут реактивироваться штаммы ЦМВ, персистирующие как в организме реципиента до операции, так и в организме донора, при этом штаммы могут принадлежать как одному, так и разным генотипам [8, 13].

Кроме того, рядом исследователей показано [8, 14], что у пациентов с ЦМВ-инфекцией, обусловленной ассоциацией разных генотипов вируса, наблюдается

более высокая вирусная нагрузка, и для элиминации ЦМВ требуется более продолжительный временной период.

Цель исследования — оценить возможности применения технологии NGS для генотипирования клинических изолятов цитомегаловируса.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы биологических субстратов (лейкоцитарная масса, слюна, моча), взятые у пациентов отделения трансплантологии Приволжского окружного медицинского центра ФМБА России (Н. Новгород), перенесших трансплантацию печени и почек. Отбор и транспортировку клинического материала проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Детекцию ДНК ЦМВ осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением диагностических тест-систем «АмплиСенс CMV-FL» (ЦНИИЭ, Москва, Россия). ДНК выделяли с использованием наборов «ДНК-сорб-AM» и «ДНК-сорб-B» (ЦНИИЭ) в соответствии с инструкцией по применению. Чувствительность тест-систем согласно паспортным данным составляет 1000 вирионов в 1 мл образца.

Для генотипирования отобраны 16 образцов ДНК ЦМВ. Определение генотипов ЦМВ проводили по двум вариабельным генам *UL55*(gB), *UL73*(gN) с использованием технологии NGS на платформе MiSeq (Illumina, США). На основе результатов поисковых исследований и анализа источников литературы апробированы 19 пар праймеров (табл. 1).

Дизайн исследования представлен в табл. 2.

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных для генотипирования цитомегаловируса

Последовательность праймеров	Источник
gB up1 5' tgg aac tgg aac gtt tgg c 3' gB lo1 5' gca cct tga cgc tgg ttt gg 3' gB lo1a 5' gaa acg cgc ggc aat cgg 3'	de Albuquerque D.M., Costa S.C., 2003 [15]
gB up2 5' gat ctc ctg gga tat aca gga cg 3' gB lo2 5' gaa tyg ctg arg gyt tga tct tg 3' gB up3 5' acr ttc tgg gaa gcc tcg gaa cg 3' gB lo3 5' gag ttc ctt gaa gac ctc tag 3'	Barbi M. et al., 2006 [16]
gB up4 5' cct cat cgc tgc tgg att 3' gB lo4 5' tga ctc cca cca cat ctc 3' gB up5 5' att tgg ccc gcg acg aac at 3' gB lo5 5' ctc cgt act tga ggg tag tg 3'	Shepp D.H. et al., 1998 [17]
gB NF 5' gga tct ggt gcc tgg tag tc 3' gB NR 5' cga ata aga tcc gta ccc tg 3' CLZ F 5' tgt tct ggc aag gta tca aga a 3' CLZ R 5' gtg aac tgc agc tgg gcg ta 3'	Grosjean J. et al., 2009 [18]

Окончание табл. 1

gB1 forward 5' tca cca ttc ctc tcr tac gac 3'	de Vries J.J. et al., 2012 [19]
gB1 reverse 5' cac cat ggc tga ccg ttt gg 3'	
gB2 forward 5' ctt taa ggt acg ggt cta cca a 3'	
gB2 reverse 5' gaa ctg tag cat tgg gca aac t 3'	
gB3 forward 5' ccg gtg tga act cca cgc g 3'	
gB3 reverse 5' gat tcg ctt tca rgy gac agg 3'	
gB4 forward 5' tcg tgc aac ttc tact ca taa tg 3'	
gB4 reverse 5' cgt tac gcg ttg aga gga gat 3'	
gB F 5' tgg aac tgg aac gtt tgg c 3'	Chou S.W., Dennison K.M., 1991 [4]
gB R 5' gca cct tga cgc tgg ttt gg 3'	
gN up 5' tgg tgt gat gga gtg gaa c 3'	Lisboa L.F. et al., 2012 [20]
gN lo 5' tag cct ttg gtg gtt gc 3'	
gN 105672F 5' cgc gac agt acc agt tga ga 3'	Grosjean J. et al., 2009 [18]
gN 106306R 5' cta cac cta cgt cac cat c 3'	
gN 105672F 5' cgc gac agt acc agt tga ga 3'	
gN 106179R 5' ctt acc ccg ccg gaa cac 3'	
gNF 5' ttg ggt cgg tca aca tcg taa g 3'	Pignatelli S. et al., 2003 [11]
gNR 5' ggt ggt tgc agt aaa gtt ctg ga 3'	

Таблица 2

Дизайн исследования фрагментов ДНК генома цитомегаловируса с использованием технологии NGS

Этапы	Использованное оборудование и реактивы
Выделение и очистка ДНК	Наборы «АмплиСенс CMV-FL», «ДНК-сорб-AM» (ЦНИИЭ)
Амплификация специфических фрагментов ДНК генома цитомегаловируса	Амплификатор Bio-Rad DNA Engine (Bio-Rad, США), геноспецифические праймеры
Очистка продуктов амплификации методом экстракции из агарозного геля	Набор Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs, США)
Определение концентрации ДНК	Флуориметр Qubit (Invitrogen, Австрия)
Подготовка библиотеки ДНК для секвенирования	Набор Nextera XT (Illumina, США)
Оценка качества подготовленной библиотеки ДНК для секвенирования	Система капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Германия)
Секвенирование ДНК-библиотеки	MiSeq Reagent Kit v3 (150 циклов), секвенатор MiSeq (Illumina, США)
Выравнивание и сборка нуклеотидных последовательностей (ридов)	Программное обеспечение CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, США)
Анализ результатов: анализ нуклеотидных последовательностей генов <i>UL55(gB)</i> и <i>UL73(gN)</i> визуализация полученных данных	BLAST, сервер NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) Unipro UGENE, MEGA 10, ClustalX 2.0 (http://bips.ustrasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX)

Секвенирование проводили с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, США) на 150 циклов. На первом этапе осуществляли подготовку библиотеки ДНК, которая включала фрагментирование ДНК с последующим присоединением к полученным фрагментам ДНК универсальных олигонуклеотидных адаптеров известной последовательности и индексов с помощью ПЦР. На втором этапе выполняли амплификацию каждого фрагмента ДНК методом ПЦР. Фрагмент ДНК с помощью последовательности адаптера гибридизовали с одним или двумя праймерами, иммобилизованными на твердой поверхности и участвующими в ПЦР. Реакционную смесь, содержащую набор ферментов и пул образцов ДНК, вносили в проточную ячейку прибора MiSeq для секвенирования. Выравнивание и объединение полученного массива данных осуществляли с использованием референсного генома и *de novo*. Выравнивание и сборку полученных коротких чтений относительно референс-генома проводили с помощью встроенного в секвенатор программного обеспечения.

В качестве референсных были выбраны последовательности генов *UL55(gB)*, *UL73(gN)* штаммов ЦМВ с известными генотипами, взятые из базы данных GenBank:

полноразмерные геномы GQ466044, HCU66425, FJ527563, BK000394, GQ121041, GQ221975, X17403, AY446894, GQ466044;

последовательности гена *UL55(gB)*: HS5GLYBM, HS5GLYBL, HS5GLYBK, X04606, HS5GLYBI, M60929;

последовательности гена *UL73(gN)*: EU686456, EU686440, AF309995, AF224677, AF390785, AF309993, AF309987, EU686430, AF390802, AF309986, AF309975, AF309974, AF310006, AF309988, AF309980, AF309975, AF309969, GU647095, GU441773, GU376726, GU376725, GU376724, GU376723, GU376721, GU376720.

Результаты

На основании анализа данных литературы были отобраны праймеры, используемые разными исследователями для определения генотипа ЦМВ по генам *UL55(gB)* и *UL73(gN)*.

Критериями отбора праймеров служили их соответствие анализируемой области гена, чистота нарабатываемого ПЦР фрагмента, оптимальная температура отжига, размер получаемого фрагмента. Для генотипирования по гену *UL55(gB)* рассматривались праймеры, предложенные шестью авторами [4, 15–19]. Все авторы в качестве целевого фрагмента для разделения генотипов предложили варибельную область, расположенную на N-конце белка gB. Из исследования были исключены праймеры, предложенные J.J. de Vries с соавт. в 2012 г. [19], которые рекомендовали использовать для каждого gB-генотипа отдельные пары праймеров, фланкирующие фрагменты размером 92 п.н. Для изучения каждого образца они использовали четыре пары праймеров, что увеличи-

вало продолжительность исследования. Такой подход оправдан при определении генотипа методом ПЦР с электрофоретической детекцией амплифицированных фрагментов в агарозном геле, но недопустим при определении генотипа методом секвенирования, запланированным в нашем исследовании. Праймеры, предложенные D.M. de Albuquerque и S.C. Costa в 2003 г. [15], фланкируют переменную область, расположенную ближе к С-концу белка gB, размером 305 п.н. Оставшиеся варианты праймеров захватывали примерно одну и ту же область, расположенную на N-конце белка gB, размер которой варьировал от 256 до 522 п.н. Следует отметить, что пары праймеров для nested-ПЦР, предложенные M. Barbi с соавт. в 2006 г. [16], захватывают область, предшествующую области гена *UL55*, и фланкируют самый большой фрагмент гена длиной 522 п.н. Нами откорректирована нуклеотидная последовательность 5'-праймера для генотипирования по гену *UL55*(gB), предложенного S.W. Chou, K.M. Dennison в 1991 г. [4].

Вариабельные нуклеотиды были заменены на выроджденные. Все пары праймеров сначала апробировали на контрольном штамме ЦМВ AD169, а затем на клинических образцах. Наилучшие результаты получены при использовании праймеров, предложенных также S.W. Chou, K.M. Dennison в 1991 г. [4].

С целью выбора оптимальных праймеров для генотипирования ЦМВ по гену *UL73*(gN) анализировали праймеры, предложенные тремя авторами [11, 18, 20]. Праймеры, предложенные L.F. Lisboa с соавт. в 2012 г. [20], были разработаны для проведения nested-ПЦР и при проверке оказались комплементарными области гена *UL72*, а не *UL73*, поэтому были исключены из анализа. Праймеры, предложенные J. Grosjean с соавт. в 2009 г. [18], в целом перекрывают ту же переменную область гена *UL73*, что и праймеры, предложенные S. Pignatelli с соавт. в 2003 г. [11], однако наблюдается сдвиг в области посадки праймера и при этом длина нарабатываемого фрагмента увеличивается на 20 п.н. Сравнительный анализ эффективности работы праймеров на клинических образцах показал, что частота выявления специфического фрагмента с использованием пары праймеров, предложенных S. Pignatelli с соавт. [11], существенно выше.

Таким образом, для генотипирования ЦМВ по генам *UL55* и *UL73* отобраны праймеры, предложенные S.W. Chou, K.M. Dennison в 1991 г. и S. Pignatelli с соавт. в 2003 г. соответственно [4, 11].

В ходе работы определен оптимальный объем образца для проведения реакции — 10 мкл. Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: температура и время отжига праймеров, количество циклов в реакции. В результате установлены следующие условия: 98°C — 2 мин; 98°C — 10 с; 55°C — 15 с; 72°C — 1 мин; 40 циклов (рис. 1 и 2).

Анализ результатов секвенирования генов *UL55* и *UL73* позволил определить пейзаж генотипов ЦМВ, циркулирующего среди населения одного региона

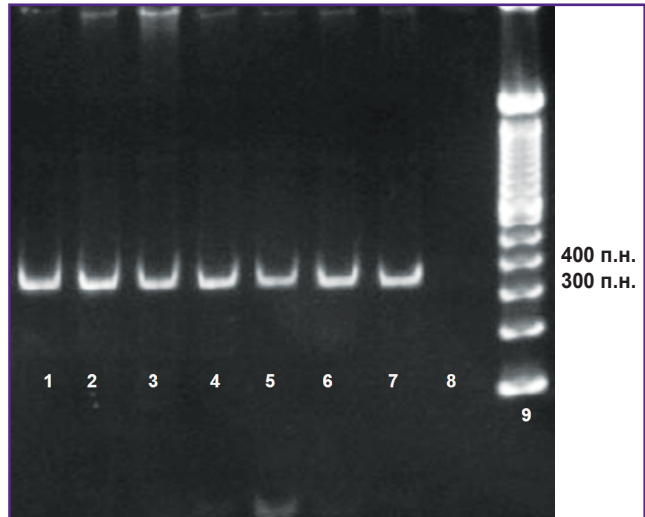


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации. Анализ работы праймеров для гена *UL55*(gB) на клинических образцах

Размер фрагмента гена *UL55*(gB) составил 356 п.н. Треки 1–6 — клинические образцы; трек 7 — контрольный образец; трек 8 — отрицательный контроль; трек 9 — ДНК-маркер

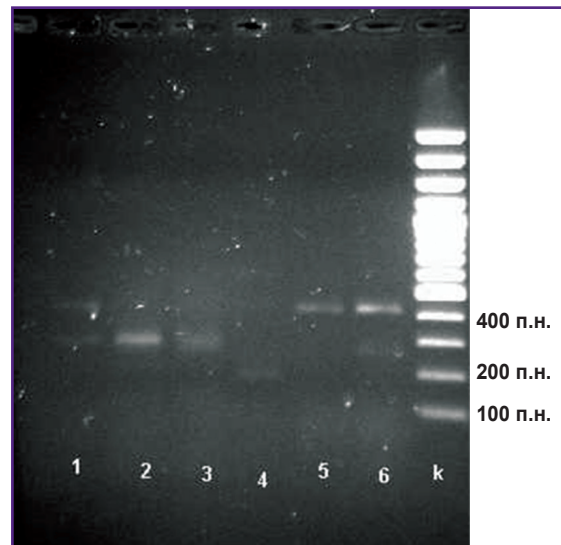


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации. Анализ работы праймеров для гена *UL73*(gN) на клинических образцах

Размер фрагмента гена *UL73*(gN) — 406 п.н. Треки 1–6 — клинические образцы; k — ДНК-маркер

России. В частности, у пациентов, перенесших пересадку солидных органов, идентифицировано 4 gB-генотипа ЦМВ: gB2, gB1, gB3, gB4 (показано по частоте встречаемости). У одного пациента установлено одновременное присутствие ЦМВ двух генотипов — gB3 и gB4.

Анализ результатов секвенирования фрагментов

гена *UL73* клинических изолятов ЦМВ, выделенных у реципиентов солидных органов, позволил обнаружить 5 gN-вариантов: gN4c, gN4a, gN4b, gN1, gN3b.

У некоторых пациентов установлено одновременное присутствие ЦМВ нескольких gN-генотипов: у реципиентов печени выявлена ассоциация двух и трех генотипов: gN4c, gN4b и gN3b, gN4a, gN1, у двух реципиентов почек — gN4c, gN1 и gN4c, gN4a.

Полученные данные показывают, что технология NGS позволяет проводить детальный и глубокий анализ генетической вариативности вирусных возбудителей инфекционных заболеваний, необходимый для решения как фундаментальных, так и практических задач эпидемиологии, а также определять наличие ассоциаций различных генотипов ЦМВ в образце клинического материала, что существенно влияет на выбор этиотропной терапии пациента.

Обсуждение

Современные молекулярные технологии NGS являются наиболее перспективными и высокоточными методами для оценки генетического разнообразия возбудителей инфекционных болезней, включая ЦМВ-инфекции.

В результате поисковых работ были выбраны пары праймеров, условия проведения реакции и дизайн анализа полученных результатов.

В настоящее время для дифференциации клинических изолятов ЦМВ зарубежные исследователи в качестве потенциальных эпидемиологических маркеров используют наиболее изученные гены: *UL55(gB)*, *UL73(gN)*, *UL74(gO)*, *UL144-TNRF*. Частота встречаемости генотипов ЦМВ в разных географических регионах мира различна и определяется контингентом обследованных. Так, установлено, что в группе ВИЧ-инфицированных в основном доминирует генотип gB2, в группе пациентов, перенесших пересадку органов, чаще встречаются генотипы gB1 и gN3a, среди детей с врожденной ЦМВ-инфекцией преобладают генотипы gB1, gB2 и gN4c, gN4a [14, 21–24].

Подобранные нами параметры генотипирования с использованием технологии NGS позволили определить, что в клинических образцах, полученных от реципиентов солидных органов, доминируют генотипы gB2 и gN4c ЦМВ. В некоторых случаях ЦМВ-инфекция у пациентов обусловлена ассоциацией двух и трех генотипов ЦМВ, что дало возможность установить NGS-технология.

Полученные нами данные показывают, что NGS-технология позволяет проводить одновременный поиск всего спектра генотипов ЦМВ, присутствующих в одном образце, и определять не только генотип, но и региональную типовую структуру популяции ЦМВ. Такие исследования необходимы при обследовании лиц из групп риска по ЦМВ, включая детей первых лет жизни и пациентов, перенесших пересадку органов. Кроме того, как уже было сказано, ЦМВ-инфекция, об-

условленная ассоциацией нескольких генотипов ЦМВ, может протекать более тяжело и для элиминации вируса требуется больше времени.

Исследования, направленные на изучение генетического разнообразия ЦМВ, необходимы для получения новых знаний о распространенности его различных геновариантов среди населения, повышения качества диагностики ЦМВ-инфекции, эффективного контроля групп риска.

Заключение

Использование технологии NGS для изучения генетического разнообразия цитомегаловируса дает возможность оптимизировать молекулярный мониторинг возбудителя цитомегаловирусной инфекции, проводить динамический контроль групп риска (беременных, новорожденных, детей первого года жизни и пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов), прогнозировать эпидемиологическую ситуацию по цитомегаловирусной инфекции и совершенствовать систему эпидемиологического надзора за инфекциями в целом. Сведения о генотипах циркулирующего цитомегаловируса позволяют получать объективную информацию о региональных особенностях генотиповой структуры популяции ЦМВ, что открывает новые перспективы в области разработки вакцин и иммунобиологических препаратов.

Источник финансирования. Исследование проведено в рамках отраслевых научно-исследовательских программ на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» — НИР №AAAA-A16-116040810130-9 и на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» — НИР №121092300068-2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Жебрун А.Б., Куляшова Л.Б., Ермоленко К.Д., Закревская А.В. Распространенность герпесвирусных инфекций у детей и взрослых в С.-Петербурге по данным сероэпидемиологического исследования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2013; 6: 30–36.
2. Zhebrun A.B., Kulyashova L.B., Ermolenko K.D., Zakrevskaya A.V. Spread of herpesvirus infections in children and adults in St. Petersburg according to seroepidemiologic study data. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2013; 6: 30–36.
3. Дмитриченко Т.И., Горбачев В.В., Семенов В.М., Зенькова С.К., Шпигун Н.В. Реактивация цитомегаловирусной инфекции у пациентов в критическом состоянии.

Вестник Витебского государственного медицинского университета 2018; 17(3): 25–37.

Dmitrachenko T.I., Harbachou V.V., Semenov V.M., Ziankova S.K., Shpigun N.V. Reactivation of cytomegalovirus infection in patients being in critical state. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* 2018; 17(3): 25–37.

3. Pignatelli S., Dal Monte P., Rossini G., Landini M.P. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 2004; 14(6): 383–410, <https://doi.org/10.1002/rmv.438>.

4. Chou S.W., Dennison K.M. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization related epitopes. *J Infect Dis* 1991; 163(6): 1229–1234, <https://doi.org/10.1093/infdis/163.6.1229>.

5. Suárez N.M., Wilkie G.S., Hage E., Camiolo S., Holton M., Hughes J., Maabar M., Vattipally S.B., Dhingra A., Gompels U.A., Wilkinson G.W.G., Baldanti F., Furione M., Lilleri D., Arossa A., Ganzenmueller T., Gerna G., Hubáček P., Schulz T.F., Wolf D., Zavattoni M., Davison A.J. Human cytomegalovirus genomes sequenced directly from clinical material: variation, multiple-strain infection, recombination, and gene loss. *J Infect Dis* 2019; 220(5): 781–791, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz208>.

6. Yan H., Koyano S., Inami Y., Yamamoto Y., Suzutani T., Mizuguchi M., Ushijima H., Kurane I., Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol* 2008; 153(4): 667–674, <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0044-7>.

7. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., Dargan D.J., McGeoch D.J., Gatherer D., Emery V.C., Griffiths P.D., Sinzger C., McSharry B.P., Wilkinson G.W.G., Davison A.J. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 5): 1301–1312, <https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>.

8. Brait N., Kúlekçi B., Goerzer I. Long range PCR-based deep sequencing for haplotype determination in mixed HCMV infections. *BMS Genomics* 2022; 23(1): 31, <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08272-z>.

9. Dhingra A., Götting J., Varanasi P.R., Steinbrueck L., Camiolo S., Zischke J., Heim A., Schulz T.F., Weissinger E.M., Kay-Fedorov P.C., Davison A.J., Suárez N.M., Ganzenmueller T. Human cytomegalovirus multiple-strain infections and viral population diversity in haematopoietic stem cell transplant recipients analysed by high-throughput sequencing. *Med Microbiol Immunol* 2021; 210(5–6): 291–304, <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00722-5>.

10. Martí-Carreras J., Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes* 2019; 55(2): 138–164, <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1627-3>.

11. Pignatelli S., Dal Monte P., Rossini G., Chou S., Gojobori T., Hanada K., Guo J.J., Rawlinson W., Britt W., Mach M., Landini M.P. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 3): 647–655, <https://doi.org/10.1099/vir.0.18704-0>.

12. Dorado G., Gálvez S., Rosales T.E., Vásquez V.F., Hernández P. Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing — review. *Biomolecules* 2021; 11(8): 1111, <https://doi.org/10.3390/biom11081111>.

13. Renzette N., Pokalyuk C., Gibson L., Bhattacharjee B., Schleiss M.R., Hamprecht K., Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Britt W.J., Jensen J.D., Kowalik T.F. Limits and patterns of cytomegalovirus genomic diversity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(30): E4120–E4128, <https://doi.org/10.1073/pnas.1501880112>.

14. Wu X.J., Wang Y., Zhu Z.L., Xu Y., He G.S., Han Y., Tang X.W., Fu Z.Z., Qiu H.Y., Sun A.N., Wu D.P. The correlation of cytomegalovirus gB genotype with viral DNA load and treatment time in patients with CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2013; 34(2): 109–112.

15. de Albuquerque D.M., Costa S.C. Genotyping of human cytomegalovirus using non-radioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *J Virol Methods* 2003; 110(1): 25–28, [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00094-6).

16. Barbi M., Binda S., Caroppo S., Calvario A., Germinario C., Bozzi A., Tanzi M.L., Veronesi L., Mura I., Piana A., Solinas G., Pugni L., Bevilacqua G., Mosca F. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis* 2006; 25(2): 156–159, <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000199261.98769.29>.

17. Shepp D.H., Match M.E., Lipson S.M., Pergolizzi R.G. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res Virol* 1998; 149(2): 109–111, [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(98\)80086-1](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(98)80086-1).

18. Grosjean J., Hantz S., Cotin S., Baclet M.C., Mengelle C., Trapes L., Virey B., Undreiner F., Brosset P., Pasquier C., Denis F., Alain S. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J Clin Virol* 2009; 46 Suppl 4: S43–S48, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.08.018>.

19. de Vries J.J., Wessels E., Korver A.M., van der Eijk A.A., Rusman L.G., Kroes A.C., Vossen A.C. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 232–237, <https://doi.org/10.1128/jcm.05253-11>.

20. Lisboa L.F., Tong Y., Kumar D., Pang X.L., Asberg A., Hartmann A., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Humar A. Analysis and clinical correlation of genetic variation in cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis* 2012; 14(2): 132–140, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2011.00685.x>.

21. Jiang X.J., Zhang J., Xiong Y., Jahn G., Xiong H.R., Yang Z.Q., Liu Y.Y. Human cytomegalovirus glycoprotein polymorphisms and increasing viral load in AIDS patients. *PLoS One* 2017; 12(5): e0176160, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176160>.

22. Pignatelli S. Recent knowledges on the linkage of strain specific genotypes with clinical manifestations of human cytomegalovirus disease. *Recenti Prog Med* 2011; 102(1): 5–10.

23. Garcia de Figueiredo G., Marques A.A., Mussi-Pinhata M.M., Silva W.A. Jr., Yamamoto A.Y. Is the mixture of human cytomegalovirus genotypes frequent in infants with congenital infection at birth in a high seroprevalence population? *J Med Virol* 2018; 90(8): 1389–1397, <https://doi.org/10.1002/jmv.25205>.

24. Kúlekçi B., Schwarz S., Brait N., Perkmann-Nagele N., Jaksch P., Hoetzenecker K., Puchhammer-Stöckl E., Goerzer I. Human cytomegalovirus strain diversity and dynamics reveal the donor lung as a major contributor after transplantation. *Virus Evol* 2022; 8(2): veac076, <https://doi.org/10.1093/ve/veac076>.