

вергается стабилизирующему отбору. Исходя из этих данных, мы можем подтвердить гипотезу, что у ВЗН – африканские корни происхождения. Для российских штаммов ВЗН, влияние движущего отбора на данной территории указывает на более активную эволюцию. Судя по всему, это можно связать с относительно недавним возникновением этих штаммов путем дивергенции от африканских и европейских предков.

Таким же образом движущий отбор оказывает свое влияние для изолятов выделенных на американском континенте, где ВЗН стал эндемичным сравнительно недавно. Оценивая эволюционную скорость генотипа ВЗН характерного России, видно, что скорость накопления нуклеотидных замен в нуклеотидной последовательности гена Е составляет примерно 2,5 x 10<sup>-4</sup> замен на сайт в год. Данная оценка, смогла показать, что скорость накопления мутаций для различных штаммов колеблется в пределах от 6,35 x 10<sup>-3</sup> до 4,27 x 10<sup>-5</sup>. Проведенные ранее расчеты для клещевых флавивирусов, показали значение равное 1,4x10<sup>-4</sup> для гена белка Е ВКЭ и 5,4x10<sup>-5</sup> для гена NS5 вируса Повассан. Оценка времени процесса дивергенции по гену белка Е от единых предшественников для 1, 2 и 4 генотипов ВЗН, циркулирующих на европейской части территории России, дала понять, что расчетное время для дивергенции составляет 2360, 2800 и 5950 лет, соответственно.

#### Список литературы

1. Kuno G., Chang G.J., Tsuchiya K.R., Karabatos N., Cropp C.B. Phylogeny of the genus *Flavivirus* // *J Virol*. 1998. V. 72 (1). P. 73.
2. Gubler, D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere // *Clin Infect Dis*. 2007. V. 45 (8). C. 1039.
3. Murata R., Hashiguchi K., Yoshii K., Kariwa H., Nakajima K., Ivanov L.I., Leonova G.N., and Takashima I. Sero-prevalence of West Nile virus in wild birds in far eastern Russia using a focus reduction neutralization test. // *Am J Trop Med Hyg*. 2011. V.84 (3). C. 461.
4. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса Западного Нила. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. №1. 31-37 С. 31.
5. Botha E.M., Markotter W., Wolfaardt M., Paweska J.T., Swanepoel R., Palacios G., Nel L.H., Venter M. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains // *Emerg Infect Dis*. 2008. V. 14 (2). C. 222.
6. Gubler, D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere // *Clin Infect Dis*. 2007. V. 45 (8). P. 1039.

### ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ РНК-ВИРУСА SARS-COV-2 МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Кубышкина Д.В., Антипова Д.В.,  
Ковалёва Л.Г., Рашимова А.Д.

ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России – ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Волгоград, e-mail: goku59uri@gmail.com

Показана классификация, к которой относится вирус SARS-CoV-2. Природный хозяин

является таким же, как и у остальных представителей рода *Betacoronavirus*, но также имеет промежуточный хозяин среди мелких млекопитающих. Выявлены пути передачи вируса и то, что он крайне неустойчив в условиях окружающей среды. В настоящее время самым достоверным методом диагностики РНК вируса является метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, но существуют определённые нюансы, способные привести к ложноположительным результатам.

Достаточно долгое время человечество знакомо с инфекциями, вызванными коронавирусами, но лишь в начале XXI века столкнулось с новыми видами, которые могут проникать в организм человека, вызывая тяжёлые поражения дыхательной системы.

За всю историю наблюдалось три вспышки коронавирусных инфекций, третья отмечается в данный момент, объявленная ВОЗ как пандемия планетарного масштаба.

Возникла острая необходимость в разработке быстрого и точного метода обнаружения возбудителя COVID-19. Соответствуя этим требованиям, наиболее подходящей стала тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией.

#### Характеристика вируса SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 относится к царству *Riboviria*, отряду *Nidovirales*, подотряду *Cornidovirineae*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus*, виду *SARS-coronavirus*.

10 января 2020 года в КНР был впервые секвенирован геном вируса SARS-CoV-2. Первые секвенированные геномы были идентичны на 99,98%, что свидетельствует об одном начальном источнике инфекции.

Выяснилось, что природным хозяином вируса являются летучие мыши, однако имеется промежуточный хозяин, и существует предположение, что это могут быть панголины, предположительно ставшие причиной заражения «нулевого пациента» [1, 2].

Размер вириона составляет примерно 80-220 нм. Нуклеокапсид имеет вид гибкой спирали, состоящей из геномной плюс-нити РНК и большого количества молекул нуклеопротеина N.

Имеют суперкапсид в виде солнечной короны с выдающимися пепломерами – булавовидными образованиями, которые состоят из белка S – основной белок мембраны. Данный белок играет важную роль в прикреплении, слиянии и проникновении вируса в поражаемые клетки.

Пути передачи вируса – воздушно-капельный и контактно-бытовой.

Для SARS-CoV-2 характерна низкая устойчивость в окружающей среде – он погибает при воздействии УФ-излучения, дезинфекции

онных средств, а также при нагревании до 40 °С в течение 1 часа. На поверхности предметов при 18-25 °С сохраняет жизнеспособность от 2 часов до 2 суток.

Инкубационный период составляет 2–14 суток.

Клиническая картина заболевания варьирует от бессимптомных случаев до тяжёлых [2–4].

#### ПЦР-диагностика

Основным материалом для лабораторного исследования методом ПЦР вируса SARS-CoV-2 служит биологический материал из носоглотки или ротоглотки [5]. Дополнительным материалом для исследования служат мокрота, промывные воды бронхов, эндотрахеальный и назофарингеальный аспират, биопсийный или аутопсийный материал лёгких, цельная кровь, сыворотка, плазма крови или фекалии. По некоторым исследованиям становится известно, что при использовании мокроты для детекции методом ПЦР шанс получения более точного результата намного выше [6].

Залог достоверности ПЦР-анализа при идентификации и субтипировании возбудителя – правильный выбор гена-мишени, олигонуклеотидов, комплементарных мишени и параметров ПЦР, а также экспериментальная оценка аналитических и диагностических характеристик.

Так как вирусам характерна изменчивость, то гены-мишени должны быть консервативными и не подвергаться модификациям, поэтому тестирование обычно производится на гены N, S, ORF1ab, E и различные их комбинации [4, 7, 8].

Диагностика проводится с участием термостойчивой ДНК-полимеразы, которая обеспечивает амплификацию целевых специфичных фрагментов ДНК возбудителя в биоматериале [7].

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Он обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, которая состоит из двух слоев, разделённых прослойкой из парафина, но также возможно использование Taq-полимеразы, которая блокирована антителами.

Для минимизации риска получения неадекватных результатов диагностики в состав набора включается внутренний контрольный образец (РНК-ВК), предназначенный для оценки этапа выделения РНК и качества прохождения полимеразной цепной реакции.

Положительный результат теста, по разным данным, удается получить в 34–62% случаев у больных с предположительно диагностируемым COVID-19.

Но, вместе с широким внедрением данных тестов в клиническую практику всё чаще появляются сведения о том, что реальная чувствительность метода ПЦР находится в пределах 60–80%, и что у пациентов с отрицательными результатами ПЦР-теста выявляется клиническая картина COVID-19 [6, 7].

Существует множество факторов, которые могут повлиять на появление ложноотрицательного результата.

Например, все зарегистрированные ПЦР тест-системы имеют ограничения – предел обнаружения вируса в образце. На практике это значит, что если предел обнаружения ПЦР тест-системы составляет 1 000 копий SARS-CoV-2 на 1 мл образца, то все образцы с концентрацией менее 1 000 копий/мл будут пропущены этим тестом и в результате чего результат будет отрицательным.

Недостоверный результат может быть получен, если в препарате нуклеиновых кислот, полученном из клинического материала, находились ингибиторы. Также возможны ошибки преаналитического этапа, неправильное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима амплификации и многие другие варианты.

Также вероятность ложноотрицательного результата теста зависит от количества дней с момента появления симптомов – чем больше времени прошло, тем с большей вероятностью результат будет ложноотрицательным [6].

#### Вывод

Таким образом, вирус SARS-CoV-2 имеет определённое сходство в плане строения и проникновения в организм с вирусами своей же группы, к которой был отнесён.

Самый надёжный вариант диагностики в настоящее время – это обнаружение РНК вируса методом ПЦР в режиме реального времени, но иногда случаются ситуации, когда результат оказывается ложноположительным.

Поэтому, при диагностике вируса SARS-CoV-2 необходимо быть внимательным и строго соблюдать методику проведения анализа.

#### Список литературы

1. Бегова М.Р. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 / М.Р. Бегова, С.В. Нетесов, Ю.С. Аульченко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38. № 2. С. 51-58.
2. Ильченко Л.Ю. COVID-19 и поражение печени / Л.Ю. Ильченко, И.Г. Никитин, И.Г. Федоров // Архивь внутренней медицины. 2020. Т. 10. № 3. С. 188-197.
3. Никифоров В.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты / В.В. Никифоров, Т.Г. Суранова, Т.Я. Чернобровкина, Я.Д. Янковская, С.В. Бутова // Архивь внутренней медицины. 2020. Т. 10. № 2. С. 87-93.
4. Бегова М.Р. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 / М.Р. Бегова, С.В. Нетесов, Ю.С. Аульченко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020. Т. 38. № 2. С. 51-58.
5. Момыналиев К.Т. О природе ложноотрицательных результатов при выявлении коронавируса SARS-CoV-2 методами амплификации нуклеиновых кислот / К.Т. Момыналиев, И.В. Иванов // Вестник Росздравнадзора. 2020. № 2. С. 11-19.
6. Панова А.Е. Коронавирусы возбудители тяжелых респираторных заболеваний / А.Е. Панова, И.Б. Куликова, Д.А. Лагуткин, А.С. Винокуров, М.В. Шульгина, И. А. Васильева // Туберкулез и болезни лёгких. 2020. Т. 98. № 7. С. 6-13.
7. Яцьшина С.Б. Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции / С.Б. Яцьшина, М.Г. Творогова, Г.А. Шипулин, В.В. Малеев // Лабораторная служба. 2017. Т. 6. № 3. С. 238-267.