

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
И.Г. Лосицкий
2018 г.
Регистрационный № 024-0318



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ «УСКОЛЬЗАЮЩИХ» МУТАЦИЙ
В ГЕНОМЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р мед. наук, проф. Еремин В.Ф., канд. биол. наук, доц. Гасич Е.Л.,
Немира А.С., Матлах О.Л., Бунас А.С., Гудель А.С., Тулинова М.Г.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

_____ И. Г. Лосицкий
30.04.2018
Регистрационный № 024-0318

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ «УСКОЛЬЗАЮЩИХ» МУТАЦИЙ
В ГЕНОМЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В. Ф. Еремин, канд. биол. наук, доц. Е. Л. Гасич,
А. С. Немира, О. Л. Матлах, А. С. Бунас, А. С. Гудель, М. Г. Тулинова

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения «ускользающих» мутаций в S участке генома вируса гепатита В (ВГВ) использованием секвенирования и филогенетического анализа. Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику вируса гепатита В.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВГВ-инфекцией.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.

Оборудование для ПЦР и секвенирования

1. Термоциклер.
2. Центрифуги с охлаждением на 14000 об/мин.
3. Центрифуга типа «Эппендорф».
4. ПЦР-боксы.
5. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания.
6. Гель-документирующая система.
7. Три комплекта автоматических дозаторов.
8. Вортекс.
9. Твердотельный термостат.
10. Генетический анализатор.
11. Морозильник с температурой -20 °С.
12. Пластиковые пробирки (1,5; 0,2; 2 мл) и наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов (1–10; 10–100; 100–1000 мкл).

Реагенты для ПЦР и секвенирования

1. Праймеры.
2. Реагенты для ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером, Mg^{2+} , смесь дезоксинуклеотидов, деионизированная вода).
3. Реагенты для секвенирующей ПЦР (праймеры, Big-Dye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизированная вода).
4. HiDi Formamid.
5. Агароза.
6. Маркер молекулярного веса.
7. Колонки для очистки продуктов ПЦР или аналогичные реагенты.
8. Реагенты для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (смесь нуклеаз и фосфатаз).
9. Комплект реагентов для выделения ДНК любого производителя.

Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.1.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Для определения ускользящих мутаций в S участке генома вируса гепатита В.

Правила забора, транспортировки и хранения клинических образцов

Кровь берут натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (NB! В противном случае кровь свернется, и выделение ДНК/РНК станет невозможным!). После плавного перемешивания пробирку следует поместить в штатив.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10–20 мин при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «Эппендорф». Образцы плазмы крови желателно разлить небольшими (0,1–0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения материала:

- образцы цельной крови: при температуре от 20 до 25 °С — в течение 6 ч с момента получения материала; от 2 до 8 °С — не более 1-х сут;

- образцы плазмы крови: при температуре от 2 до 8 °С — в течение 5 сут; от -16 до -20 °С — в течение 1 года.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Транспортирование пробирок с кровью и микропробирок с плазмой осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

Забор крови и ее транспортировка производится согласно руководству «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1–4 групп патогенности» № 11–7–13–2002, утвержденному Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30.12.2002.

Молекулярно-генетические исследования с целью определения «ускользающих» мутаций ВГВ

Выделение ДНК ВГВ из сыворотки/плазмы проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения ДНК из плазмы/сыворотки крови.

Аmplификация по участку гена S ВГВ проводится в варианте «гнездовой» в два раунда ПЦР.

Первый раунд

Компоненты ПЦР: исследуемая ДНК, праймеры p1 и pR5 (10 мкМ), 10х ПЦР-буфер, 25 мМ MgCl₂, 25 мМ смесь трифосфатов, 5 Ед/мкл Taq-полимераза, деионизированная вода.

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция выполняется в конечном объеме 25 мкл.

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	17,175 мкл	–
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1 x
MgCl ₂	2,0 мкл	2 mM
Праймер fw P1	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер rw pR5	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Тақ-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10–15 с.

Поместить пробирки в амплификатор. Режим амплификации: 95 °С — 5 мин; 95 °С — 30 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин (35 повторов); 72 °С — 7 мин.

Второй раунд

Компоненты ПЦР: исследуемая ДНК, праймеры r4 и pR2 (10 мкМ), 10x ПЦР-буфер, 25 mM MgCl₂, 25 mM смесь трифосфатов, 5 Ед/мкл Тақ-полимераза, деионизированная вода.

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция выполняется в конечном объеме 25 мкл.

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	17,175 мкл	-
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1 x
MgCl ₂	2,0 мкл	2 mM
Праймер fw P4	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер rw pR2	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Тақ-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10–15 с. Поместить пробирки в амплификатор. Режим амплификации: 95 °С — 5 мин; 95 °С — 30 с, 50 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин (35 повторов); 72 °С — 7 мин.

Электрофорез продуктов амплификации

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидиума в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля — 1,8 %. Результаты электрофоретической детекции амплификации фрагмента детекции S участка генома ВГД представлены на рисунке 1. Размер амплифицированного фрагмента 750 п.н.

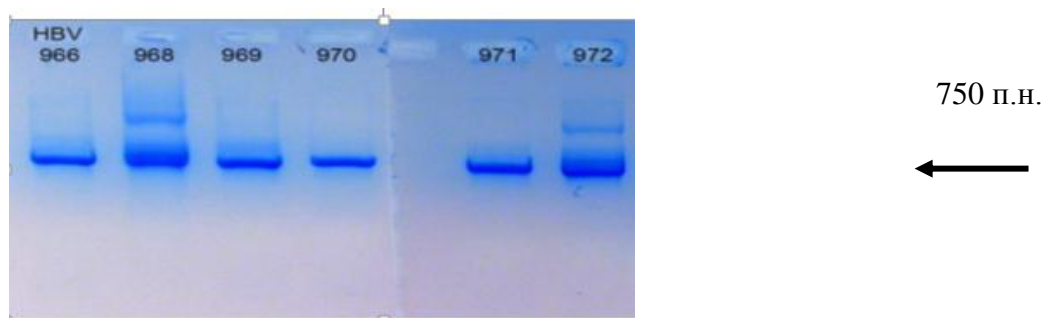


Рисунок 1. — Результаты электрофоретической детекции S участка генома ВГВ (966, 968, 969, 970, 971, 972 — исследуемые образцы)

Очистка продуктов амплификации.

Осуществляется на колонках для очистки ДНК или реагентом для очистки «clean up» любого производителя.

Секвенирующая ПЦР

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

Компоненты	Объем
ддН ₂ О	4,5 мкл
праймер прямой и обратный	1 мкл
5хбуфер	2 мкл
Bigdye Terminator 3.1	0,5 мкл
ДНК	2 мкл
Общий объем 10 мкл	

Секвенирующая ПЦР в объеме 20 мкл по следующей прописи: 4,0 мкл прямого или обратного праймера (10 пкМ); 1 мкл Bigdye Terminator v.3.1; 1,5 мкл ПЦР-продукта (концентрация 10 нг); 7 мкл Bigdye буфера; 6,5 мкл деионизированной воды. Режим амплификации: 96 °С — 5 мин; 95 °С — 10 с, 50 °С — 5 с, 60 °С — 2 мин (25 повторов); 4 °С — хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от невключенных нуклеотидов методом преципитации.

Секвенирование продуктов ПЦР

К очищенной пробе добавить по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешать 5 с на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Поместить пробирки в термостат при 95 °С на 2 мин. Немедленно образцы поместить на лед. Подготовленные пробы внести по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

Определение «ускользающих» мутаций в S участке генома ВГВ

Биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза выполняется с помощью стандартного программного обеспечения.

Для установления HBsAg «ускользающих» мутаций используется программное обеспечение HBV-Grade (http://www.hiv-grade.de/hbv_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg) и geno2pheno (<http://hbv.geno2pheno.org/index.php>), находящиеся в открытом доступе в Интернет или аналогичные программы. К числу наиболее значимых замен в HBsAg следует отнести G145R, K141E, T131I, M133I, S132T, G145A, P217L, V184A и S207N и др., а также инсерцию трех аминокислот между остатками 123 и 124, поскольку они изменяют антигенную структуру HBsAg. Результаты анализа нуклеотидной последовательности S участка ВГВ с помощью on-line программы HBV-Grade представлены на рисунках 2, 3. Установление значимых мутаций в S участке генома ВГВ свидетельствует об обнаружении варианта ВГВ, способного ускользать от иммунитета, индуцированного вакцинацией.

Disclaimer:
Disclaimer: Although this software tries to predict resistance against various drugs used in HBV therapy and tries to assess HBsAg-escape based on actually published data, **no clinical decision should be based only on results of the used algorithm.**
The Internet Tool is based on the Stanford [HIValg-Software](#).

1 Name: (optional) Date: (optional)

2 Output Options: Original SpreadSheet

3 Sequences:
1. Choose a file to upload from your computer using the file selection box below.

2. Paste sequence text in the text box below.

```
CCTCaAAaACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTA
GGGGGGACCACCGTGTCTTGGCCAAAATTGCGAGTCCCCAACCTCCAAT
CACTCACC AACCTCCTGCCTCCAACCTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGT
CTGCGGCGTTTTATCATCTTCTTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT
TGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCGCTGCTCCTAATTC
CAGGATCTTCAACCACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGACTACTG
```

You can also try out some sample sequences. (Warning: You will need javascript for this feature!)
[sample 1](#) [sample 2](#) [sample 3](#) [sample 4](#) [clear](#)

4

Рисунок 2. — Первый этап анализа образца № HBV-918 с использованием программы HBV-Grade для поиска ускользающих мутаций в HBsAg (S — участок генома ВГВ)

Alignment of amino-acid sequences:

Alignment of patient RT-gene sequence to Consensus D

```

      10      20      30      40      50      60
RT-consensus D EDWGPCAEHG EHHIRIPRTP ARVTGGVFLV DKNPHNTAES RLVVDFSQFS RGNVRSWPK
               .....
               .....
               .....
      70      80      90     100     110     120
RT-consensus D FAVPNLQSLT NLLSSNLSWL SLDVSAAFYH LPLHPAAMPH LLVGSSGLSR YVARLSSNSR
               .....
               .....
               .....
      130     140     150     160     170     180
RT-consensus D IFNHQGHGTHQ NLHDYCSRNL YVSLLLLYQT FGRKLHLYSH PIILGFRKTP MGVGLSPFLI
               .....
               .....
               .....
      190     200     210     220     230     240
RT-consensus D AQTSAICSV VRRAFPHCLA FSYDDVVLG AKSVQHLESL FTAVTNFLLS LGTHLVPNKT
               .....
               .....
               .....
      250     260     270     280     290     300
RT-consensus D KRWGYSLNFM GYVIGCYGSL PQDHIIQKIK ECFRKLNVNR PIDWKCQRI VGLLGFAAPF
               .....
               .....
               .....
      310     320     330     340
RT-consensus D TQCGYPALHP LYACIQSKQA FTFSPTYKAF LCKQYLNLYP VARQ
               .....
               .....
               .....
    
```

Alignment of patient HBsAg-gene sequence to Consensus D

```

      10      20      30      40      50      60
HBsAg-consensus D MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTIPQ SLDSWMTSLN FLGGTTVCLG QNSQSPTSNIH
               .....
               .....
               .....
      70      80      90     100     110     120
HBsAg-consensus D SPTSCPPTCP GYRWMLRRF IIFLFILLC LIFLLVLLDY QGMLPVCPLI PGSTTSTGPG
               .....
               .....
               .....
      130     140     150     160     170     180
HBsAg-consensus D CRTCTTPAQQ TSMYPSACCT KPSDGNCTCI PIPSSNAFGK FLWENASARF SWLSLLVPFV
               .....
               .....
               .....
      190     200     210     220
HBsAg-consensus D QWVGLSPTV WLSVIWMMWY WGPSLYSILS PFLPLLPIFF CLWVYI
               .....
               .....
               .....
    
```

Explanation of Alignment: Only in positions different to the consensus sequence the one letter amino-acid code in the patient-sequence line is shown. Identical positions are marked with ".". Positions where no patient sequence data is available are marked with "-".

HBsAg-Escape mutation	Interpretation		SIR
	Mutation List	Algorithm Result	
	P127T	Typical mutations for HBsAg escape detected	R

Рисунок 3. — Детекция HBsAg исчезающей мутации P127T образца № HBV-918 с использованием программы HBV-Grade (стрелками указана замена Р на Т в 127 аминокислотной позиции)

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Все реакции отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР-смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности
Ампликон в отрицательной пробе	Реагенты контаминированы
Нет специфического ампликона в исследуемой пробе несмотря на определяемую вирусную нагрузку	Вирусная нагрузка ниже 3000 копий ДНК ВГВ на мл