

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



А.А. Тарасенко

08 2022 г.

Регистрационный № 037-0622

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В X-УЧАСТКЕ ГЕНОМА ВИРУСА
ГЕПАТИТА В
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Белякова Е.С., Гудель А.С., Коско А.Д.

Минск 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко
26.08.2022
Регистрационный № 037-0622

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В X-УЧАСТКЕ ГЕНОМА ВИРУСА
ГЕПАТИТА В**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р биол. наук, доц. Е. Л. Гасич, Е. С. Белякова, А. С. Гудель, А. Д. Коско

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения мутаций в X-участке генома вируса гепатита В (далее — ВГВ) с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием.

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Для оказания комплекса медицинских услуг, направленных на диагностику ВГВ-инфекции.

Классификация по МКБ 10: МКБ В18.0 и МКБ В18.1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1 Изделия медицинской техники:

- термоциклер для полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР),
- центрифуга для микропробирок,
- центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14000 об/мин,
- ламинарные боксы,
- аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания,
- геледетектирующая система,
- дозаторы механические переменного объема, комплект (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл),
- вортекс,
- твердотельный термостат,
- генетический анализатор,
- холодильник с морозильной камерой (от 4 до 8 °С, от -18 до -20 °С),
- бактерицидная лампа.

2 Изделия медицинского назначения:

- пробирки стерильные пластиковые типа «эппендорф» (1,5 мл),
- микропробирки для ПЦР (0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз,
- вакутайнеры с ЭДТА для забора крови,
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз,
- набор реагентов для выделения ДНК,
- реагенты для ПЦР (5 ед./мкл Taq полимеразы; 10x буфер для полимеразы, хлорид магния 50 мМ, смесь дНТФ 2 мМ, олигонуклеотидные праймеры 10мМ, вода стерильная, свободная от нуклеаз),
- реагенты для электрофоретической детекции (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50-1500 п.о., ТАЕ-буфер, бромистый этидий),

- реагенты для очистки продуктов после ПЦР,
- реагенты для секвенирующей ПЦР (2мМ прямой или обратный праймер, Big dye terminator v.1.1, 5x Big Dye буфер, деионизованная вода),
- реагенты для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР,
- штативы для пробирок,
- халаты, перчатки резиновые.

Качество используемых реагентов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-генетических исследований.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА для выявления мутаций в X-участке генома вируса гепатита В

Этап 1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала

Забор периферической венозной крови осуществляется натошак или через 3 ч после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа Vacutainer (6 % ЭДТА). Далее шприц следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. Условия хранения материала: образцы цельной крови: при температуре от 20 до 25 °С хранятся в течение 6 ч с момента получения материала; при температуре от 2 до 8 °С — не более 1 сут. Замораживание образцов цельной крови не допускается.

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». Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Образцы плазмы крови хранятся в течение 5 сут при температуре от 2 до 8 °С или при температуре от -16 до -20 °С — в течение года.

Забор крови и ее транспортировка производятся в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2.

Этап 2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления мутаций в X-участке генома вируса гепатита В

2.1 Выделение ДНК вируса гепатита В из плазмы/сыворотки крови

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

2.2 Диагностическая амплификация X-участка генома вируса гепатита В с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием

Белок ВГВ-Х (НВх) участвует в биологии и патогенезе ВГВ-инфекции, оказывая влияние на спектр клеточных процессов, включая клеточный цикл,

пролиферацию клеток и апоптоз. Доказано связь между изменениями в X участке генома вируса и прогрессированием осложнений, связанных с ВГВ-инфекцией, таких как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. Наиболее часто встречающимися мутациями в геноме ВГВ, которые способствуют прогрессированию заболевания печени у пациентов с хронической формой инфекции, являются замена аланина на треонин в 1762 нуклеотидной позиции (A1762T) и глицина на аланин в 1764 позиции (G1764A). Кроме того, происходит индукция дополнительных мутаций в рессоге участке генома, связанных с более тяжелым клиническим течением заболевания: A1383C, G1386A/C, C1485T, C1653T, T1753V.

В связи с чем был разработан метод амплификации с последующим секвенированием ПЦР-продукта, позволяющий прогнозировать тяжесть течения ВГВ-инфекции у пациентов.

Для амплификации используются последовательности праймеров, представленных в таблице 1.

Таблица 1 — Последовательности праймеров для амплификации X-участка генома вируса гепатита В

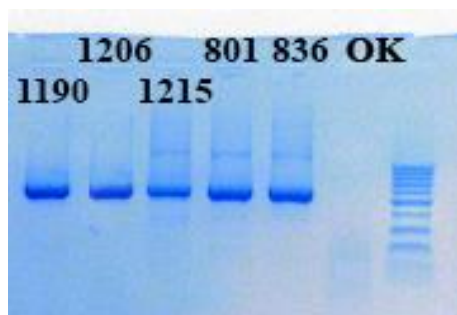
Номер раунда	Название праймера	Последовательность
1	НВxF1	Прямой 5'- ATT GAT TGG AAA GTM TGT M -3'
	НВxR1	Обратный 5'- TCC ACA GTA GCT CCA AAT TCCT TT -3'
2	НВxF2	Прямой 5'- CGC TTG TTT TGC TCG GAG C'3'
	НВxR2	Обратный 5'- GGC ACA GCT TGG AGG CTT G -3'

Для амплификации X-участка генома ВГВ проводится «гнездовая» ПЦР. Объем реакционной смеси 25 мкл со следующими компонентами ПЦР: 10х буфер А, 50 мМ MgCl₂, 2 мМ смесь дНТФ, 10мМ праймеры (прямой и обратный), 5 Ед/мкл полимеразы, деионизованная вода. Временные и температурные режимы представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Временные и температурные режимы для амплификации X-участка генома вируса гепатита В для первого и второго раундов «гнездовой» ПЦР

Номер раунда	Порядковый номер этапа	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	1	95	3 мин	35
	2	95	1 мин	
	3	56	30 с	
	4	72	1 мин	
	5	72	7 мин	1
	6	4	Хранение	
2	1	95	3 мин	30
	2	95	1 мин	
	3	65	30 с	
	4	72	45 с	
	5	72	7 мин	1
	6	4	Хранение	

Анализ продуктов амплификации осуществляется методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и детекцией в трансиллюминаторе при ультрафиолетовом свете. Результаты электрофоретической детекции X-участка генома ВГВ представлены на рисунке 1.



1190, 1206, 801, 836 — исследуемые образцы,
OK — отрицательный контроль

Рисунок 1 — Результаты электрофоретической детекции X-участка генома вируса гепатита В (628 п.н)

2.3 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется согласно инструкции производителя реагента или набора реагентов для очистки продуктов ПЦР, например, набор для ферментативной очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT Express, Thermo FS, и др.

2.4 Секвенирующая полимеразная цепная реакция

Секвенирующая ПЦР в объеме 10 мкл по следующей прописи: 2мМ прямого или обратного праймера, Big dye terminator v.1.1, 10 нг ПЦР продукта, Big Dye буфер, деионизованная вода. 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 не включенных нуклеотидов методом преципитации.

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешивают 5 с на вортексе, сбрасывают кратким центрифугированием капли со стенок пробирок «эппендорф». Пробирки помещают в термостат при 95 °С на 2 мин, затем немедленно образцы помещают на лед. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

2.5 Определение мутаций в X-участке генома вируса гепатита В

Биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза выполняется с помощью стандартного программного обеспечения. Для получения последовательности используются программы SeqScape v.2.4, BioEdit v.6, BLAST, находящиеся в открытом доступе в Интернете либо аналогичные программы.

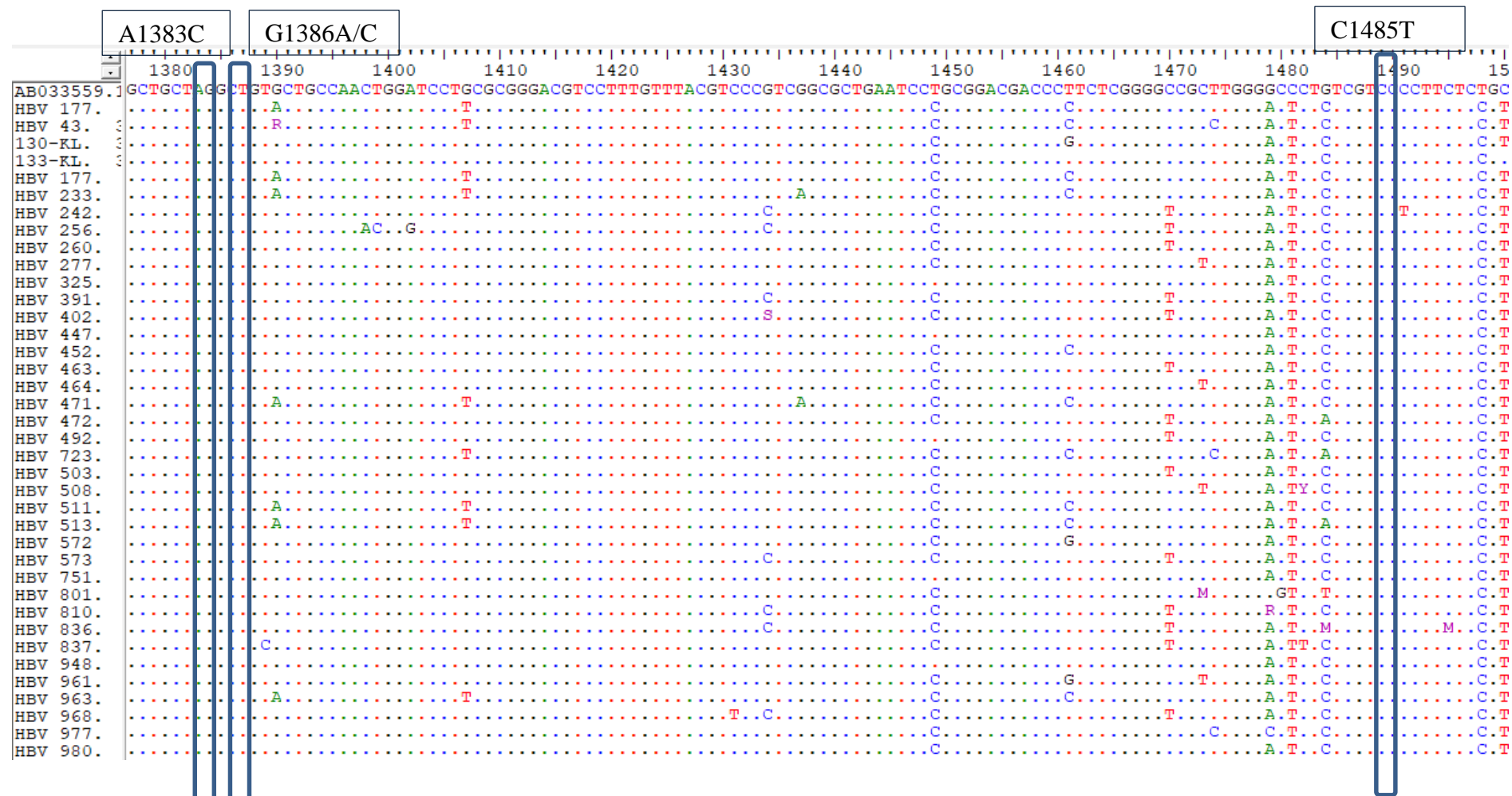
Для установления мутаций X-участка генома ВГВ в качестве референсного штамма используется полногеномная последовательность изолята РYW30, выделенного из образца донора крови и зарегистрированная в международной базе

данных GenBank № AB033559.1 – Hepatitis B virus DNA, complete genome, isolate:PYW310 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB033559.1>).

В результате анализа определяют спектр нуклеотидных замен в X-участке генома вируса, с появлением которых отмечается более тяжелое течение ВГВ-инфекции и более быстрая прогрессия в развитие цирроза печени или гепатоклеточной карциномы. Среди таких замен ключевыми являются — С1485Т, С1653Т, Т1753V, А1762Т, G1764А и др.

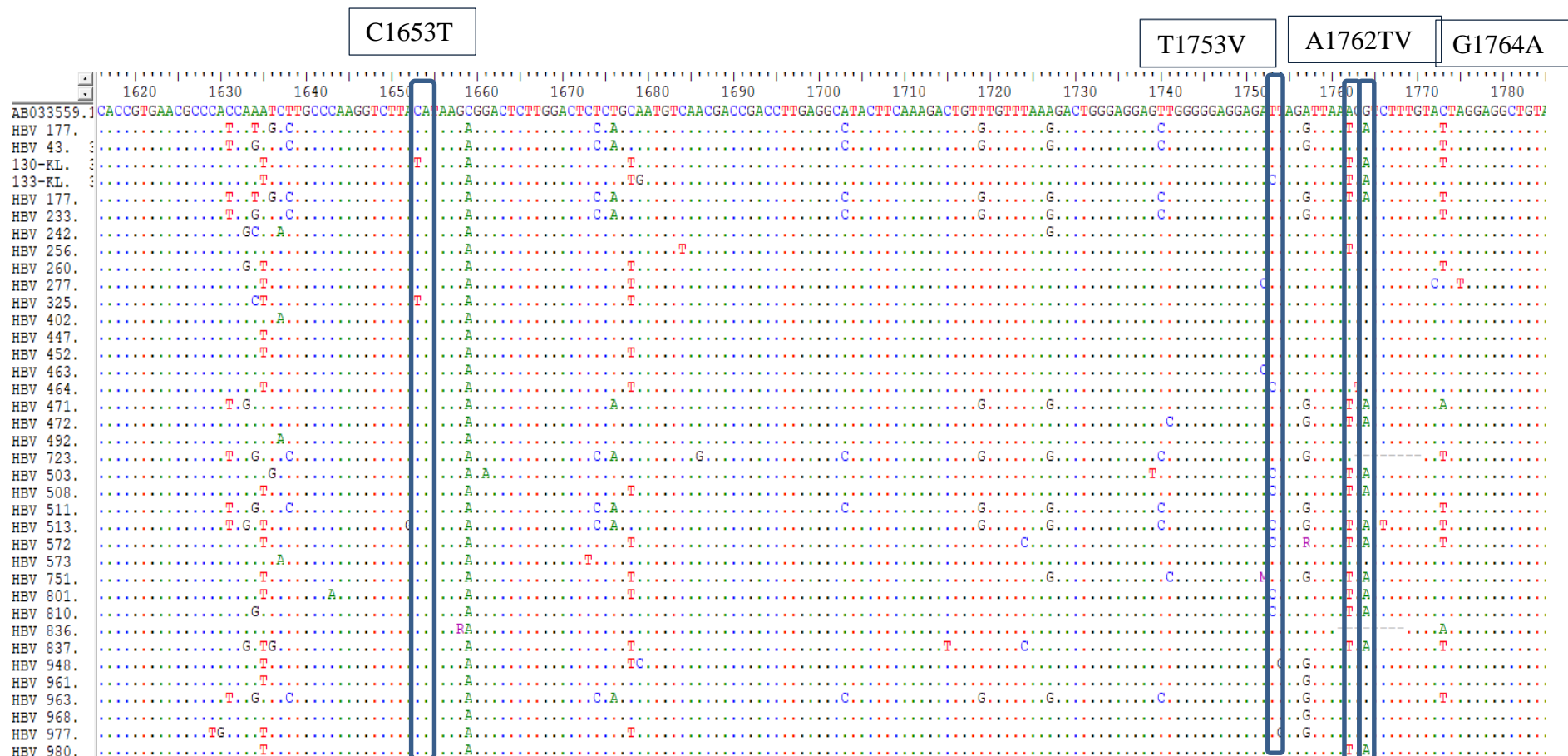
Анализ выполняется в программе BioEdit v.6 или аналогичной.

Ниже представлен пример анализа секвенированных последовательностей по X участку генома, полученных от образцов пациентов, проживающих в Республике Беларусь (рисунки 2 и 3).



Выделены клинически значимые позиции A1383C, G1386A/C, C1485T

Рисунок 2 — Расположение позиций мутаций в X участке генома ВГВ (позиции 1377–1500) в исследуемых образцах по отношению к референсной последовательности AB033559.1. Исследование выполнено с использованием программы BioEdit



Выделены клинически значимые позиции C1653T, T1753V, A1762T, G1764A

Рисунок 3 — Расположение позиций мутаций в X участке генома ВГВ (позиции 1615–1785) в исследуемых образцах по отношению к референсной последовательности АВ033559.1. Исследование выполнено с использованием программы BioEdit

На рисунках указаны наиболее распространенные варианты нуклеотидных замен. Так, нуклеотидная замена С1653Т выявлена в двух последовательностях – KL_130 и HBV_325. Нуклеотидная замена Т1753С выявлена в образцах KL_1336, HBV_464, 503, 508, 513, 572, 801 и 810. Нуклеотидная замена А1762Т выявлена в образцах HBV_177, 43, 133, 177, 256, 471, 472, 503, 508, 513, 572, 751, 801 и 837. Нуклеотидная замена G1764А выявлена в образцах HBV_ HBV_177, 43, 133, 177, 471, 472, 503, 508, 513, 572, 751, 801 и 837.

Таким образом, анализируемый участок генома включает все позиции X участка, с которыми связаны клинические значимые замены, влияющие на прогрессию хронической ВГВ-инфекции.

2.6 Заключение

Установление клинически значимых мутаций в X-участке генома ВГВ свидетельствует об обнаружении варианта вируса, повышающего риск развития осложнений заболевания печени, связанных с ВГВ, таких как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Деградация ДНК и/или низкое содержание исходной ДНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК
	Деградация ДНК	Использовать пробы ДНК сразу после выделения
	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путем использования в реакции контрольных образцов
	Вирусная нагрузка менее 2000 копий ДНК/мл	Тестирование вирусной нагрузки до проведения амплификации
Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе	Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования	Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования
	Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку ее продуктов
При сравнении сиквенса в программе Blast нет гомологии с ВГВ	Ложноположительная реакция ПЦР из-за нарушения условий проведения	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов