

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:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практиче-
ский 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

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод определения ускользящих мутаций в S участке генома вируса гепатита В с 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 МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И ПРИБОРОВ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов:

Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.

Оборудование для проведения ПЦР и секвенирования:

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

Реагенты для проведения ПЦР и секвенирования

1. Праймеры.
2. Реагенты для проведения ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером, Mg^{2+} , смесь дезоксинуклеотидов, деионизованная вода).
3. Реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, Big Dye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизованная 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 ИСПОЛЬЗОВАННОГО МЕТОДА

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

1. Правила забора, транспортировки и хранения клинических образцов.

Взятие крови следует производить натощак или через 3 часа 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 поместить в штатив.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желательно 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°C до 25°C – в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток;

- образцы плазмы крови: при температуре от 2°C до 8°C – в течение 5 суток; при температуре минус от 16°C до 20°C – в течение 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 плюс от 2°C до 8°C. 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.

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

Выделение ДНК 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 (preS1/S2) ВГВ.

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

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

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

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизованная вода	17,175 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	2 мМ
4.	Праймер fw P1	0,5 мкл	0,2 мкМ
5.	Праймер rw pR5	0,5 мкл	0,2 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
7.	Taq-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
8.	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 сек.

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

Второй раунд. Компоненты ПЦР: исследуемая ДНК, праймеры p4 и pR2 (10мкМ), 10х ПЦР-буфер, 25мМ MgCl₂, 25мМ смесь трифосфатов, 5Ед/мкл Taq-полимераза, деионизованная вода.

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

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизованная вода	17,175 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	2 мМ
4.	Праймер fw P4	0,5 мкл	0,2 мкМ
5.	Праймер gw pR2	0,5 мкл	0,2 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
7.	Taq-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
8.	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 сек. Поместить пробирки в амплификатор. Режим амплификации: 95 °С – 5мин; 95 °С – 30с, 50 °С – 30с, 72 °С – 1мин (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.

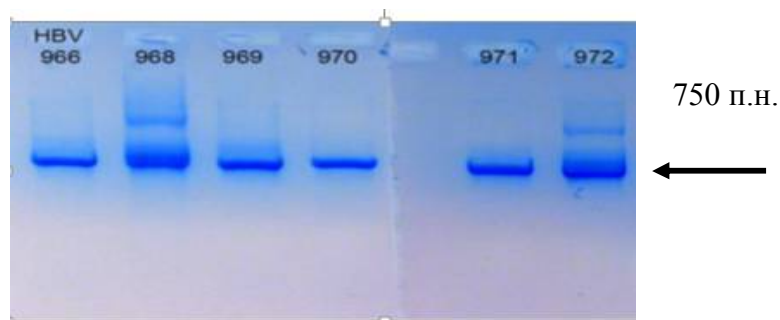


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции S участка генома ВГВ (966, 968, 969, 970, 971, 972 – исследуемые образцы).

Очистка продуктов амплификации.

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 Big dye terminator v.3.1, 1,5 мкл ПЦР продукта (концентрация 10 нг), 7 мкл Big Dye буфера,

6,5 мкл деионизованной воды. Режим амплификации: 96°C – 5 мин; 95°C – 10 с, 50°C – 5с, 60°C – 2 мин (25 повторов); 4°C – хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

Секвенирование продуктов ПЦР:

К очищенной пробе добавить по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешать 5с на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Поместить пробирки в термостат при 95°C 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.

Выполнить биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза 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 другие, 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
GGGGGGACCACCGTGTGCTTGGCCAAAATTCCGAGTCCCAACCTCCAAT
CACTACCAACCTCCTGTCTCCTCAACTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGT
CTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCT
TGTTGGCTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTCTGTCTCTAATTC
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 ускользящих мутаций в HBsAg (S – участок генома ВГВ)

Alignment of amino-acid sequences:

Alignment of patient RT-gene sequence to Consensus D

```

RT-consensus D   10      20      30      40      50      60
                  EDWGPCEAHG EHHIRIPRTP ARVTGGVFLV DKNPHNTAES RLVVDFSQFS RGNYRVSPK
                  .....
                  ..... ..DH.....
RT-consensus D   70      80      90      100     110     120
                  FAVPNLQSLT NLLSSNLSHL SLDVSAAFYH LPLHPAAMPH LLVGSGLSR  YVARLSSNSR
                  .....
                  .....
RT-consensus D  130     140     150     160     170     180
                  IFNHQHGTMQ NLHDYCSRNL YVSLLLYQT  FGRKLLHLYSH PIILGFRKTP HQVGLSPFL
                  .....
                  ..... .K.....
RT-consensus D  190     200     210     220     230     240
                  AQFISAICSV VRRAPPHCLA FSYDDVVLG AKSVQHLESL FTAVTNFLLS LGTHLTPNKT
                  .....
                  ..... .H...A... .S...H..
RT-consensus D  250     260     270     280     290     300
                  KRWGYSLNFY GYVIGCYGSL PQDHIIQKIK ECFRKLPMNR PIDWKVCQRI VGLLGFAAFP
                  .....
                  .....
RT-consensus D  310     320     330     340
                  TQCGYPALMP LYACIQSKQA FTFSPYKAF LCKQVNLNLYP VARQ
                  .....
                  .....
    
```

Alignment of patient HBsAg-gene sequence to Consensus D

```

HBsAg-consensus D  10      20      30      40      50      60
                   MENITSGFLG PLLVLQAGFF LLTRILTIPQ SLDSHWTSLN FLGGTVCLG QNSQSPTSNIH
                   .....
                   .....
HBsAg-consensus D  70      80      90      100     110     120
                   SPTSCPPTCP GYRHWCLRRF IIFLFILLLC LIFLLVLLDY QGMLVCPILT PGSSTTSTGTP
                   .....
                   ..... .A.....
HBsAg-consensus D  130     140     150     160     170     180
                   GRITCTTPAQG TSMYPSGCTT KPSDGNCTCI PIPSSWAFGK FLNEWASARF SWLSLLVPFV
                   .....
                   .....
HBsAg-consensus D  190     200     210     220
                   QMFVGLSPTV WLSVIWMMIMY WGPLYSILS PFLPLLPIFF CLWVVI
                   .....
                   ..... .IT.K
    
```

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 "-".

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

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