

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 Х-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:

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

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

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных 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 B18.0 и МКБ B18.1.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ДР

Изделия медицинской техники:

термоциклер для проведения 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;

гельдетектирующая 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 +4⁰С до +8⁰С, от минус 18⁰С до минус 20⁰С);

бактерицидная лампа.

Изделия медицинского назначения:

пробирки стерильные пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл);
микропробирки для проведения 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 проведения ПЦР (5 ед/мкл Taq полимераза; 10x буфер для полимеразы, хлорид магния 50 mM, смесь дНТФ 2 mM, олигонуклеотидные праймеры 10mM, вода стерильная, свободная от нуклеаз);

реагенты для проведения электрофоретической детекции (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50-1500 п.о., TAE-буфер, бромистый этидий);

реагенты для проведения очистки продуктов после ПЦР;

реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (2mM прямой или обратный праймер, Big dye terminator v.1.1, 5x Big Dye буфер, деионизованная вода);

реагенты для проведения очистки продуктов после секвенирующей ПЦР;

штативы для пробирок;

халаты, перчатки резиновые;

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

ТЕХНОЛОГИЯ МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ В Х-УЧАСТКЕ ГЕНОМА ВГВ

Этап 1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала.

Взятие периферической венозной крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа Vacutainer (6% ЭДТА). После взятия крови 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°C до 25°C хранятся в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток. Замораживание образцов цельной крови не допускается.

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». Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Образцы плазмы крови хранятся в течение 5 суток при температуре от 2°C до 8°C или при температуре от (-16°C) до (-20°C) – 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», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

Этап 2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления мутаций в X-участке генома ВГВ.

1. Выделение ДНК ВГВ из плазмы/сыворотки крови

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

2. Диагностическая амплификация X-участка генома ВГВ 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 пресоре 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 *BГВ*

Номер раунда	Название праймера	Последовательность
1	HBxF1 HBxR1	Прямой 5'- АТТ GAT TGG AAA GTM TGT M -3' Обратный 5'- TCC ACA GTA GCT CCA AAT TCT TT -3'
2	HBxF2 HBxR2	Прямой 5'- CGC TTG TTT TGC TCG GAG C'3' Обратный 5'- GGC ACA GCT TGG AGG CTT G -3'

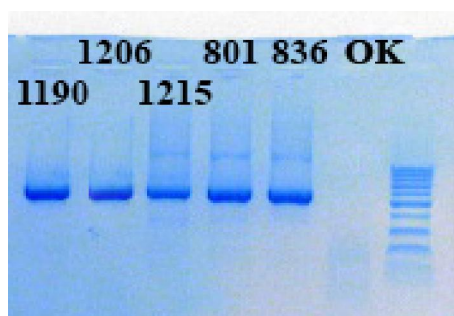
Для амплификации X-участка генома *BГВ* проводится «гнездовая» ПЦР. Объем реакционной смеси 25 мкл со следующими компонентами ПЦР: 10х буфер А, 50 mM MgCl₂, 2 mM смесь дНТФ, 10мМ праймеры (прямой и обратный), 5 Ед/мкл полимеразы, деионизованная вода. Временные и температурные режимы представлены в таблице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

Таблица 2 – Временные и температурные режимы для амплификации X-участка генома *BГВ* для первого и второго раундов «гнездовой» ПЦР.

Номер раунда	Порядковый номер этапа	Температура	Время	Количество циклов
1	1	95°C	3 мин	1
	2	95°C	1 мин	35
	3	56°C	30 сек	
	4	72°C	1 мин	
	5	72°C	7 мин	1
	6	4°C	хранение	
2	1	95°C	3 мин	1
	2	95°C	1 мин	30
	3	65°C	30 сек	
	4	72°C	45 сек	
	5	72°C	7 мин	1
	6	4°C	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 ВГВ (628 п.н)

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.

4. Секвенирующая ПЦР

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°C – 5 минут; 95°C – 10 секунд, 50°C – 5 секунд, 60°C – 2 минуты (25 повторов); 4°C – хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешивают 5 секунд на вортексе, сбрасывают кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Пробирки помещают в

термостат при 95°C на 2 минуты, затем немедленно образцы помещают на лед. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

5. Определение мутаций в X-участке генома ВГВ

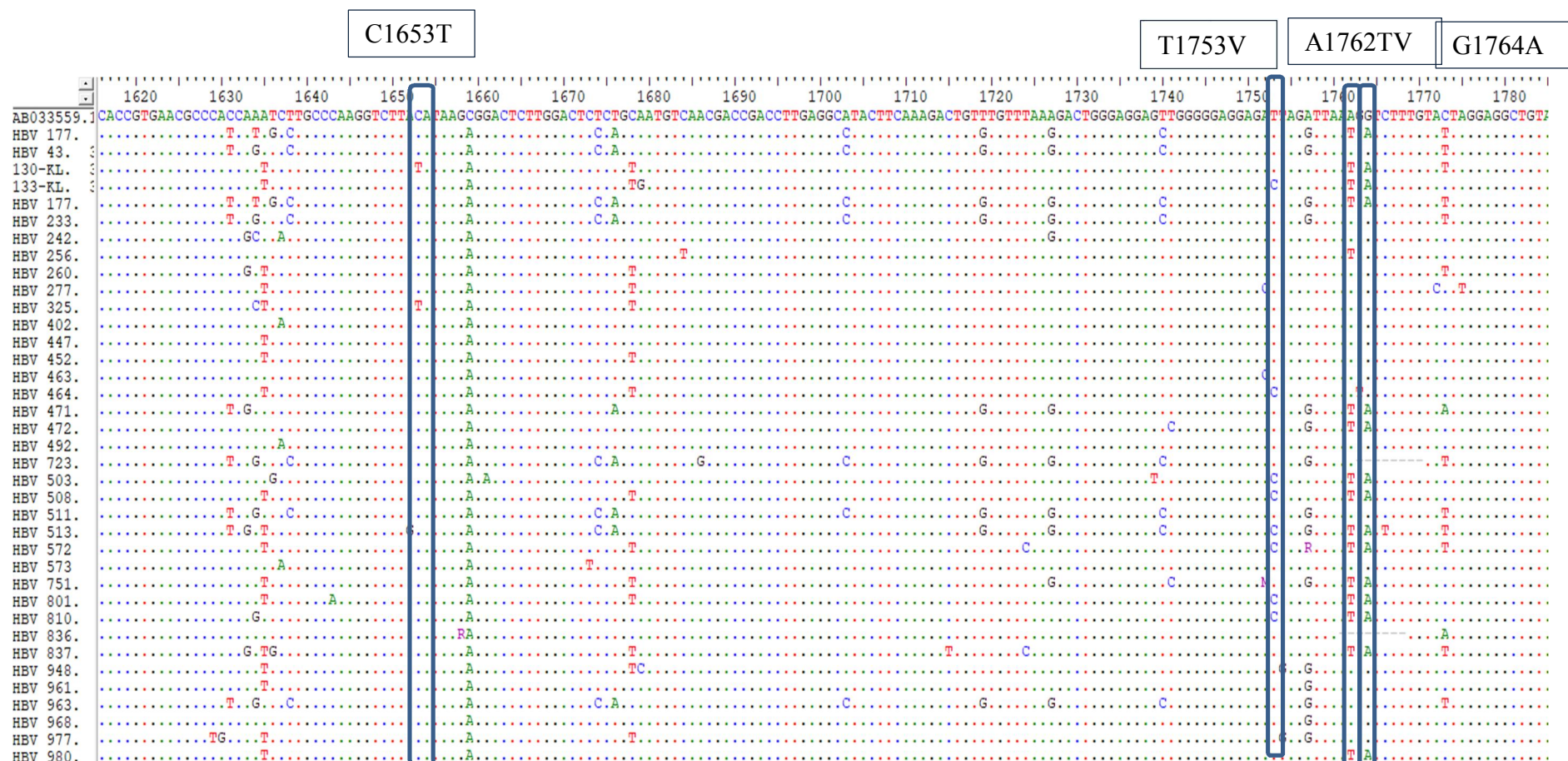
Биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза выполняется с помощью стандартного программного обеспечения. Для получения последовательности используются программы SeqScape v.2.4, BioEdit v.6, BLAST, находящиеся в открытом доступе в Интернете либо аналогичные программы.

Для установления мутаций X-участка генома ВГВ в качестве референсного штамма используется полногеномная последовательность изолята PYW30, 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/nucore/AB033559.1>).

В результате анализа определяют спектр нуклеотидных замен в X-участке генома вируса, с появлением которых отмечается более тяжёлое течение ВГВ-инфекции и более быстрая прогрессия в развитие цирроза печени или гепатоклеточной карциномы. Среди таких замен ключевыми являются – C1485T, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A и другие.

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 (Рисунок 2, 3).



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 AB033559.1. Исследование выполнено с использованием программы BioEdit.

На рисунках указаны наиболее распространенные варианты нуклеотидных замен. Так, нуклеотидная замена C1653T выявлена в двух последовательностях – KL_130 и HBV_325. Нуклеотидная замена T1753C выявлена в образцах KL_1336, HBV_464, 503, 508, 513, 572, 801 и 810. Нуклеотидная замена A1762T выявлена в образцах HBV_177, 43, 133, 177, 256, 471, 472, 503, 508, 513, 572, 751, 801 и 837. Нуклеотидная замена G1764A 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 клинически значимые замены, влияющие на прогрессию хронической ВГВ-инфекции.

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 ошибок, ограничений 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 путём 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 её 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.