

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Останкова Ю.В.¹, Серикова Е.Н.¹, Семенов А.В.², Тотолян Арег А.¹

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ НА ОСНОВЕ ГНЕЗДОВОЙ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО ТРЕМ ВИРУСНЫМ МИШЕНЯМ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

² ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия

Разработан способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. При разработке метода использованы образцы плазмы крови 128 больных ХГВ, проживающих в регионах РФ и странах средней Азии и 173 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО. ВГВ выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе осуществляли амплификацию ДНК ВГВ с использованием олигонуклеотидов, комплементарных областям наибольшего сходства геномов различных изолятов ВГВ, фланкирующих полный геном вируса. На втором этапе при использовании в качестве матрицы продукта амплификации первого этапа, проводили ПЦР с применением трех пар олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов к трем регионам (ген Core, ген S и ген X) генома вируса, а также одной пары праймеров и соответствующего зонда комплементарных участку гена человека HPRT. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 10 МЕ/мл, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл). Разработанный способ позволяет идентифицировать заболевание при различных суб-генотипах ВГВ и может быть использован для диагностики ХГВ в популяции и группах риска, в том числе при HBsAg-негативной форме заболевания.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; низкая вирусная нагрузка; метод идентификации, диагностика.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Серикова Е.Н., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 530-537.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shennal@yandex.ru

Финансирование. Отраслевая НИР «Парентеральные вирусные гепатиты: скрытая форма хронических гепатитов В и С при моно- и коинфекции в популяции и в группах риска, а также в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина» № АААА-А21-121021600219-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.05.2022

Принята к печати 06.06.2022

Опубликовано 12.09.2022

Ostankova Yu. V.¹, Serikova E. N.¹, Semenov A. V.², Totolian Areg A.¹

METHOD FOR HEPATITIS B VIRUS DNA DETECTING IN BIOLOGICAL MATERIAL AT LOW VIRAL LOAD BASED ON NESTED PCR WITH DETECTION ON THREE VIRAL TARGETS IN REAL-TIME MODE

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

² SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, 620030, Ekaterinburg, Russia

A method has been developed for HBV DNA finding in biological material at low viral load based on nested PCR with real-time detection of three viral targets. When developing the method, blood plasma samples were used from 128 CHB patients living in the regions of the Russian Federation and countries of Central Asia and 173 hemodialysis center patients living in the North-West Federal District. Analytical sensitivity was tested using the stepwise dilution method. HBV was detected by nested PCR. According to the method developed by us, at the first stage, the HBV DNA is amplified using at the first stage oligonucleotides complementary to the greatest similarity regions of the various HBV isolates genomes flanking the entire virus genome. At the second stage, when using the amplification product of the first stage as a template, PCR was performed using three pairs of oligonucleotides and the corresponding oligonucleotide fluorescently labeled probes to three virus genome regions (Core gene, S gene and X gene), as well as one pair of primers and the corresponding probe complementary to a human HPRT gene region. The method sensitivity for DNA extraction from plasma with a 100 µl volume was 10 IU/ml. Obtaining a threshold Ct cycle for only one fluorophore may indicate the presence of HBV DNA in the sample at a load of less than 10 IU/ml, HBV detection in this case is possible with a repeated

PCR study of the corresponding sample with HBV DNA extraction from an increased plasma volume (200-1000 µl). The developed method makes it possible to identify the disease in various HBV subgenotypes and can be used to diagnose CHB in the population and risk groups, including those with the HBsAg-negative form of the disease.

Key words: *chronic hepatitis B; occult hepatitis B; low viral load; identification method, diagnostics.*

For citation: Ostankova Yu. V., Serikova E.N., Semenov A. V., Totolian Areg A. Method for hepatitis B virus DNA detecting in biological material at low viral load based on nested PCR with detection on three viral targets in real-time mode. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 530-537 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537>

For correspondence: *Ostankova Yu.V.*, PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Virology and Immunology HIV Infection; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu.V. <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;

Serikova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>;

Semenov A.V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>;

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *Branch research work «Parenteral viral hepatitis: occult form of chronic hepatitis B and C with mono- and coinfection in the population and in risk groups, as well as depending on the genetic polymorphism of the host's genes».*

Received 06.05.2022

Accepted 06.06.2022

Published 12.09.2022

Введение. Вирус гепатита В (ВГВ) является самым распространенным гепатотропным вирусом, способным приводить как к острой, так и хронической форме заболевания. К концу 2019 г., по оценкам всемирной организации здравоохранения, примерно 296 млн человек, или 3,5% населения мира, были больны хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ), причем полтора миллиона из них были инфицированы в 2019 г. [1].

Поверхностный антиген гепатита В (НВsAg) остается основой для диагностики острой и хронической инфекции, для скрининга крови и продуктов крови, а также для определения эффективности лечения и ответа на противовирусную терапию. Отличительной чертой инфекции, вызванной ВГВ, является большое количество субвирусных частиц, содержащих НВsAg, но не содержащих ДНК вируса, причем количество это может широко варьировать в зависимости от фазы инфекции [2]. Распространенность ХГВ в разных регионах мира оценивается по частоте встречаемости НВsAg среди населения, различается в зависимости от географического региона, а также определяет возможные пути передачи. Так, в Российской Федерации показана умеренная (2-7%) распространенность ХГВ. Долгосрочный анализ заболеваемости на территории РФ острым гепатитом В (ОГВ) показал значительное снижение ее уровня. Несмотря на это, отмечена значительная тенденция к росту заболеваемости ХГВ как в среднем по стране, так и в Северо-Западном федеральном округе [3].

Одной из естественных форм течения заболевания является НВsAg-негативный (скрытый) ХГВ. Скрытый гепатит В (СкГВ) определяют, как стадию заболевания, при которой в ткани печени обнаруживают ДНК ВГВ при неопределяемом уровне НВsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [4]. Хотя элиминации вируса при СкГВ не происходит, репликация вируса и экспрессия его генов в большинстве случаев подавлены, а из-за крайне низкой вирусной нагрузки выявление вируса стандартными методами осуществить не удается [5]. Исходя из вышесказанного, оценка распространенности ХГВ в популяциях разных стран и регионов в целом, как и в группах риска, в част-

ности, ошибочна за счет остающихся не выявленными случаев НВsAg-негативного заболевания. Для увеличения диагностической достоверности определения ХГВ необходимо одновременное выявление скрытой формы заболевания.

Как известно, на ранних этапах развития ХГВ клиническая симптоматика может быть крайне ограничена или отсутствовать вовсе. В то же время, несмотря на низкую вирусную нагрузку, при СкГВ сохраняются те же факторы риска, что и при НВsAg-позитивной форме течения заболевания. Так, например, показано, что у 70% НВsAg-негативных пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой выявляли СкГВ, что свидетельствует о значимости его роли в развитии заболевания [6]. Кроме того, иммуносупрессия у пациентов с НВsAg-негативным ХГВ может приводить к реактивации как у моноинфицированных больных, так и у лиц с коинфекцией ВГВ + ВИЧ, ВГВ + ВГС, ВГВ + ВГД. Таким образом, ранняя лабораторная диагностика ХГВ в целом, как и проблема совершенствования средств диагностики НВsAg-негативного ХГВ, остается крайне актуальной для здравоохранения.

«Золотым стандартом» диагностики СкГВ является обнаружение в тканях печени способной к репликации ДНК ВГВ. Однако использование инвазивной диагностики недоступно при скрининге групп риска, тестировании доноров крови и других популяционных исследованиях. Применение инвазивной диагностики возможно только в качестве дополнительного метода в случаях, когда пункционная биопсия печени осуществляется по клиническим показаниям. Согласно международным рекомендациям, для достоверного выявления СкГВ необходимо применение nested-ПЦР вкупе с обнаружением не менее чем двух различных областей вирусного генома. Важно при этом, чтобы анализ был одинаково эффективен для различных генотипов и субгенотипов вируса [7].

Разработанный нами ранее метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови позволяет обнаруживать вирус при низкой вирусной нагрузке, согласно вышеупомянутым рекомендациям [8], однако высокая гетерогенность вируса и низкая вирусная нагрузка могут при-

водить к тому, что тот или иной целевой регион вируса не будет выявлен, а отсутствие внутреннего контроля не позволит определить ложноотрицательный результат анализа. В связи с этим представляется очевидным необходимость разработать способ, включающий амплификацию трех регионов генома ВГВ, а также амплификацию фрагмента одного из генов домашнего хозяйства человека в качестве внутреннего контроля.

Целью нашей работы являлось: разработать способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени.

Материал и методы. В работе были использованы образцы плазмы крови, полученные от 128 больных ХГВ, проживающих в регионах РФ и странах Средней Азии, уровень кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК в печени которых был нами описан ранее [9] и 173 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

Качественное определение ДНК вируса проводили двумя способами: методом ПЦР-РВ при помощи коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) в соответствии с инструкциями производителя, затем, при низкой вирусной нагрузке и/или отрицательном качественном результате,

полученном при использовании стандартизированного набора, проводили выявление методом nested-ПЦР с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1).

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 10 пМ каждого олигопраймера и 3 пМ каждого зонда, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

На первом этапе ПЦР проводили с использованием прямого и обратного праймеров HBV long (см. табл. 1) при указанных параметрах амплификации (табл.2).

На следующем этапе в качестве матрицы использовали продукт амплификации первого этапа и проводили ПЦР с «вложенными» олигонуклеотидами и зондами, комплементарными трем регионам ВГВ, а также фрагменту ДНК гена человека HPRT, в одной пробирке – HBV SrtF, HBV SrtR, HBV Srt-Z, HBV XrtF, HBV XrtRd, HBV Xrt-Z, HBV CoretF, HBV CoretR, HBV Coret-Z, HPRT F, HPRT R, HPRT-Z (см. табл. 1) – при указанных в табл. 3 параметрах амплификации.

Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали по четырем каналам. По трем каналам сигналы, относящиеся к вирусному геному: по каналу для флуорофора FAM – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ Core-региона, по каналу для флуорофора HEX – о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ S-региона, по каналу для флуорофора ROX – о на-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем мишеням в режиме реального времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV longF	5'- TTTTTCACCTCTGCCTAATCA - 3'
HBV longR	5' - AAAAAGTTGCATGRTGMTGG - 3'
HBV SrtF	5'- GATGTGTCTGCGGCGTTTA -3'
HBV SrtR	5'- GCAACATACCTTGATAGTCCAGAAGAA -3'
HBV Srt-Z	5- HEX - CCTCTICATCCTGCTGCTATGCCTCA - BHQ1 -3'
HBV XrtF	5'- GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC -3'
HBV XrtRd	5'- GTCGGTTCGTTGACATTGCAG -3'
HBV Xrt-Z	5'- ROX - TGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC - BHQ2/RTQ2 -3'
HBV CoretF	5'- TTCCGGAAACTACTGTTGTAGAC -3'
HBV CoretR	5'- ATTGAGATCCCGAGATTGAGA -3'
HBV Coret-Z	5'- FAM - CCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTC - BHQ1-3'
HPRT F	5'- CTGCTCGAGATGTGATGAAGG -3'
HPRT R	5'- CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG -3'
HPRT-Z	5'- Cy5 - ATCATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG - RTQ2 -3'

коплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ X-региона. И по одному каналу для флуорофора Cy5 регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК человека высококонсервативного гена гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), выступающего в качестве эндогенного внутреннего контроля. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

Для оценки применимости разработанного способа при выявлении ДНК ВГВ при пулировании были изготовлены минипулы. Минипулы готовили путем смешивания шести и десяти случайных образцов в одной 1,5 мл емкости/пробирке по 100 мкл каждого образца. Всего было изготовлено 30 минипул, то есть 15 минипул по шесть образцов и 15 минипул по десять образцов. Анализ проводили слепым методом, при котором исполнитель не знал в какие минипулы входят те или иные образцы. Оценку проводили с использованием двух способов экстракции ДНК: в первом случае из минипула брали 100 мкл смешанной плазмы и проводили выделение ДНК, во втором случае выделение проводили из всего объема пулированной плазмы.

Для исключения контаминации в качестве дополнительного контроля секвенировали нуклеотидные последовательности генома вируса в выявленных ВГВ-позитивных образцах. Для получения полногеномной нуклеотидной последовательности вируса проводили асимметричную ПЦР с использованием протяжённых олигонуклеотидов, на втором этапе проводили ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и набором внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный

геном ВГВ, как было показано ранее [10]. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), продуктов секвенирующих реакций анализировали с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов осуществляли с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Используемые в рамках работы полные геномы ВГВ, полученные из HBsAg-негативных образцов с низкой вирусной нагрузкой, субгенотипов В2, В4, С1, С2, С3, С5, Е депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами ON402774-ON402785).

Результаты и обсуждение. На базе ранее предложенных нами методик был разработан способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени [8, 10].

Согласно разработанному нами способу, на первом этапе осуществляли амплификацию ДНК ВГВ с использованием олигонуклеотидов, комплементарных областям наибольшего сходства геномов различных изолятов ВГВ, фланкирующих полный геном вируса. На втором этапе при использовании в качестве матрицы продукта амплификации первого этапа, проводили ПЦР с применением трех пар олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов к трем регионам (ген Core, ген S и ген X) генома вируса, а также одной пары праймеров и соответствующего зонда комплементарных участку гена человека HPRT (см. табл.1). По каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 детектировали продукты амплификации ДНК ВГВ Core, S, X-регионов и гена человека HPRT, соответственно (рис. 1).

Выделение и амплификацию ДНК образца считали успешными, если на канале Cy5 получено значение порогового цикла Ct. Образцы считали положительным по содержанию ДНК ВГВ, если на каналах FAM, HEX, ROX или любых двух из них получали значение порого-

Таблица 2

Параметры программы амплификации первого этапа на планшетном амплификаторе CFX96

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	5 мин	1
	95	20 с	
2	52	30 с	20
	72	3 мин 50 с	
3	72	7 мин	1
	95	20 с	
4	52	30 с	20
	72	3 мин 50 с	
5	72	7 мин	1
	95	20 с	
6	50	30 с	10
	72	3 мин 50 с	
7	72	7 мин	1
8	4	Хранение	

Таблица 3

Параметры программы амплификации второго этапа на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин		1
	95	10 с		
2	50	20 с		7
	72	40 с		
3	72	5 мин		1
	95	10 с		
4	58	20 с	FAM, HEX, ROX, CY5	45
	72	40 с		
5	4	Хранение		

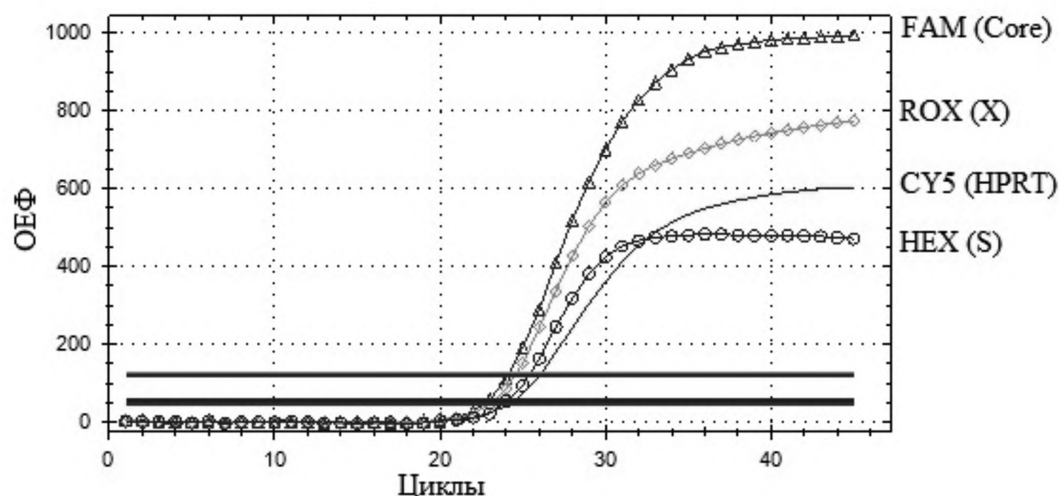


Рис. 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе второго этапа амплификации. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции. Треугольниками обозначен сигнал флуорофора FAM, кружками – сигнал HEX, ромбами – сигнал ROX, представляющие собой результат амплификации трех регионов генома ВГВ (Core, S, X). Без дополнительных отметок – сигнал Cy5, представляющий собой результат амплификации гена человека HPRT, свидетельствующая об успешности экстракции ДНК и последующей амплификации.

вого цикла Ct при одновременном получении значения порогового цикла Ct на канале Cy5 и отрицательными – если на каналах FAM HEX, ROX отсутствовало значение Ct. Получение порогового цикла Ct на канале Cy5 при одновременном получении значения порогового цикла Ct только по одному флуорофору FAM, HEX или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл. В этом случае рекомендуется повторное исследование соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл).

На втором этапе в работу вводили положительный контрольный образец, позволяющий оценить успешность амплификации, представляющий собой плазмиду, содержащую синтетические последовательности, соответствующие фрагментам трех целевых регионов ВГВ – Core, S, X.

Аналитическую чувствительность метода проверяли двумя способами с использованием двух видов анализируемых матриц. В первом случае были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ следующим образом: аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл ВГВ-негативной плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку и т. д. до получения серии последовательных разведений. После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному способу. Аналитическая чувствительность 10 МЕ/мл при объеме экстрагируемого материала 100 мкл, 3 МЕ/мл при объеме экстрагируемого материала 500 мкл.

Во втором случае в качестве матрицы использовали контрольную плазмиду, концентрацию которой предварительно оценивали с помощью цифровой ПЦР, проводили десятикратные разведения следующим образом:

аликвоту объемом 10 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 90 мкл ТЕ-буфера, тщательно пипетировали и переносили 10 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 90 мкл ТЕ-буфера и т. д. до получения серии последовательных десятикратных разведений. Для каждого плазмидного образца из полученной серии разведений проводили второй этап амплификации (рис. 2).

Определение специфичности разработанного способа осуществляли двумя способами.

Анализ in silico. При сравнении с помощью алгоритма BLASTn целевых последовательностей с представленными в базе данных GenBank геномными последовательностями патогенов и человека было установлено, что искомые последовательности имеют сходство только с соответствующими последовательностями в геноме ВГВ (Core, S, X) и в геноме человека (HPRT), соответственно.

Для оценки специфичности эмпирическим методом проводили выделение НК с последующей nested-ПЦР с использованием ранее охарактеризованных коллекционных образцов плазмы крови, как «чистых» (не содержащих патогенов), так и инфицированных различными вирусными патогенами в виде моно- и коинфекций, в том числе: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вируса гепатита Е, вируса гепатита G, вирус иммунодефицита человека, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса 6 и 8 типов, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита. Анализ проводили «слепым» методом, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГВ-положительную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-положительных образцов использовали плазму, содержащую ВГВ субгенотипов А1, D4, Е, присутствие которых в используемых для анализа специфичности группах маловероятно. Неспецифических реакций выявлено не было, что является подтверждением спец-

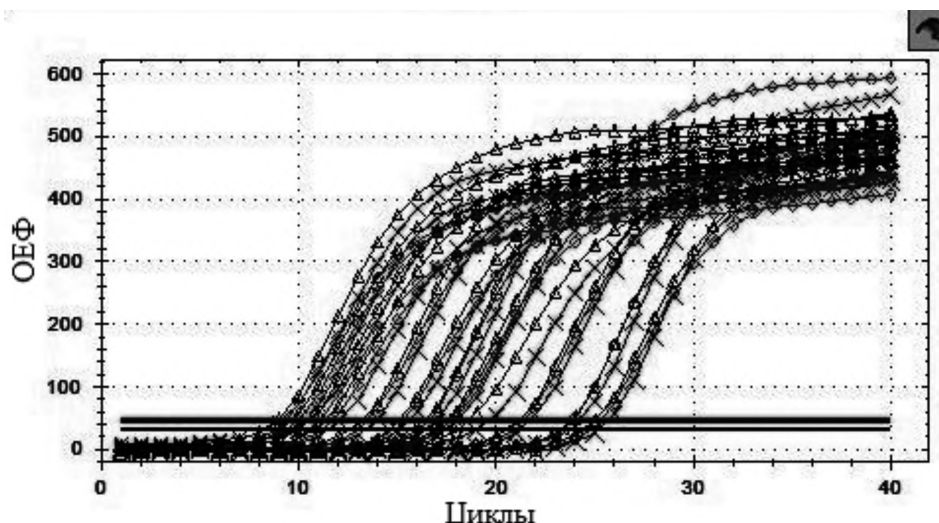


Рис. 2. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе второго этапа амплификации с использованием последовательных разведений синтетического контрольного образца. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции. Ромбами обозначен сигнал флуорофора FAM, треугольниками – сигнал HEX, крестами – сигнал ROX, представляющие собой результат амплификации трех синтетических фрагментов позитивного контроля ДНК ВГВ, соответствующих трем регионам генома ВГВ (Core, S, X).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus isolate XZ74, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3212	MN657315.1	
Hepatitis B virus isolate XZ79, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3215	MN683717.1	
Hepatitis B virus isolate XZ175, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3215	MN683701.1	

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus ayw2 isolate Bushehr-PW-HBS35 S protein (S) and polymerase (pol) genes, partial cds	Hepatitis B virus ayw2	223	223	100%	4e-54	100.00%	412	OK490614.1	
Hepatitis B virus strain BSY675 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244564.1	
Hepatitis B virus strain BSM688 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244555.1	
Hepatitis B virus strain BSM549 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244552.1	

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus genotype D B-H10-Ban DNA, complete genome	hepatitis B virus genotype D	286	286	100%	6e-73	100.00%	3125	LC519824.1	
Hepatitis B virus isolate HBV occult Arkh33, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MKG18428.1	
Hepatitis B virus isolate HBV occult Arkh15, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MKG18427.1	
Hepatitis B virus isolate 12/16/0148, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MK541688.1	

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 2 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Transcripts									
Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), mRNA	Homo sapiens	294	294	100%	1e-77	100.00%	1395	NM_000194.3	
Genomic sequences									
Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	237	301	100%	2e-60	100.00%	156040895	NC_000231.11	

Рис. 3. Анализ in silico анализируемых фрагментов Core (а), S (б), X (в) ДНК ВГВ и фрагмента ДНК человека гена HPRT (г). Приведены фрагменты полученных таблиц результатов анализа соответствующих генов с использованием метода BLASTn.

ифичности разработанного способа и его диагностической ценности.

Метод был апробирован при обследовании большого контингента лиц разных групп риска и дозорных групп в различных географических регионах мира, в том числе в группах больных ХГВ при моно- и коинфекции с ВИЧ из РФ и стран Средней Азии, условно здоровых жителей Южного Вьетнама, беременных женщин из Гвинейской Республики [11-14]. Полученные результаты подтверждают диагностическую ценность разработанного способа для выявления ХГВ, независимо от генотипов и субгенотипов вируса в разных географических регионах мира. В ряде случаев при наличии сигнала *Cy5* (HPRT) регистрировали сигналы только одного «вирусного» флуорофора, однако при повторной экстракции ДНК из большего объема плазмы регистрировали сигналы двух или всех трех флуорофоров, свидетельствовавших о выявлении вирусных мишеней. Первичная регистрация сигнала даже по одному из каналов, свидетельствующих о наличии вирусной ДНК в образце, позволяет обратить внимание на обследуемого пациента и, проведя дополнительные исследования, своевременно диагностировать заболевание.

Особого внимания заслуживает оценка применимости разработанного нами способа при выявлении ДНК ВГВ в минипулах. При экстракции ДНК из полного объема минипулов вирус был выявлен во всех ВГВ-положительных минипулах. При экстракции ДНК из 100 мкл смешанной плазмы в минипулах по десять образцов удалось выявить ДНК вируса только в тех случаях, когда в пул входили 2-3 образца с приблизительной вирусной нагрузкой более 30 МЕ/мл, при этом сигнал флуоресценции получали только по одному из каналов. Если в минипул входил только один ВГВ-положительный образец или 2-3 образца с предположительной вирусной нагрузкой менее 10 МЕ/мл, ДНК вируса выявить не удавалось. В минипулах по шесть образцов достаточно было одного образца с концентрацией около 50 МЕ/мл для получения сигнала флуорофора одного из каналов. Таким образом, несмотря на высокую чувствительность разработанного способа, пулирование плазмы крови при выявлении СкГВ значительно снижает вероятность выявления вируса. В целом чувствительность снижается в соответствии с коэффициентом разбавления в процессе пулирования.

Описанный способ был разработан с использованием в качестве матричных образцов ВГВ вариантов, преобладающих на территории РФ (D1, D2, D3, A2). Однако предложенный метод позволяет выявить ВГВ среди пациентов из географически отдаленных регионов мира, в том числе были определены генотипы/субгенотипы вируса не встречающиеся или встречающиеся крайне редко на территории России. Так, были определены субгенотипы A1, B2, B4, C1, C2, C3, C5, E вируса, что также свидетельствует о диагностической чувствительности и специфичности разработанного способа и его применимости для диагностики СкГВ независимо от геноварианта вируса.

Отметим также потенциальную клинико-диагностическую значимость выявления в исследуемых образцах только одного фрагмента генома ВГВ даже при повторном анализе с увеличением объема биологического материала при экстракции ДНК. Такие случаи могут свидетельствовать о выявлении фрагментов ДНК ВГВ интегрированных в геном человека, что, как известно, может способствовать онкогенезу и развитию ГЦК [15,

16]. Однако применимость разработанного способа для выявления интегрированных фрагментов генома ВГВ в геном хозяина и связь с развитием заболевания печени нуждается в дальнейших исследованиях.

Заключение. Разработанный способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе метода двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени позволяет идентифицировать различные геноварианты ВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования двухэтапного метода с мультиплексной ПЦР на втором этапе для комплексной диагностики. Способ может быть использован для диагностики ХГВ при различных генотипах/субгенотипах вируса, в том числе, при HBsAg-негативной форме заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4-7, 15-16 см. REFERENCES)

3. Эсауленко Е.В., Сухорук А.А., Иванова Н.В. Возможность элиминации парентеральных вирусных гепатитов на территории Российской Федерации и Северо-Западного федерального округа. *Актуальные вопросы фундаментальной, клинической медицины и фармации*. 2018; 230-3.
8. Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю. В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 59-64.
9. Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 565-70.
10. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (10): 635-40.
11. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Габдрахманов И.А., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Разнообразие геновариантов вируса гепатита В у военнослужащих. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(3):46-53. DOI:10.22625/2072-6732-2019-11-3-46-53.
12. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Банцевич М.Д., Филипович-Вигньевич С.Б., Зуева Е.Б. и др. Характеристика связанных с HBsAg-негативной формой заболевания мутаций вируса гепатита В у пациентов гемодиализных центров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4: 96-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104.
13. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э. и др. Распространенность маркеров вирусов гепатита В и С среди условно-здоровых жителей южного региона Социалистической Республики Вьетнам. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(6): 1131-40.
14. Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Семенов А.В. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:87-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-87-94.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Available at <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Accessed 2022.04.08.

2. Kuhns M.C., Holzmayer V., Anderson M., McNamara A.L., Sauleda S., Mbanya D., Duong P.T., Dung N.T.T., Cloherty G.A. Molecular and Serological Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Positive Samples with Very Low or Undetectable Levels of HBV Surface Antigen. *Viruses*. 2021; 13(10): 2053. DOI:10.3390/v13102053.
3. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Ivanova N.V. The possibility of elimination of parenteral viral hepatitis in the territory of the Russian Federation and the North-Western Federal District. *Aktual'nyye voprosy fundamental'noy, klinicheskoy meditsiny i farmatsii*. 2018; 230-3. (in Russian)
4. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2008; 49: 652-7.
5. Calux S.J., Silva V.C.M., Compri A.P., Lemos M.F., Santos A.P.T, Oba I.T., Mendes-Correa M.C.J., Moreira R.C. Hepatitis B: Prevalence and occult infection in HIV-infected patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2020; 53: e20180533.
6. Wong D.K., Cheng S.C.Y., Mak L.L., To E.W., Lo R.C., Cheung T.T. Among Patients with Undetectable Hepatitis B Surface Antigen and Hepatocellular Carcinoma, a High Percentage Has Integration of HBV DNA into Hepatocyte DNA and No Cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2019; 18: 449-56. DOI:10.1016/j.cgh.2019.06.029.
7. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F. Anna S. Lok, Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2019; 71(2): 397-408. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.034.
8. Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (1): 59-64. DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64. (in Russian)
9. Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (9): 565-70. (in Russian)
10. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 635-40. (in Russian)
11. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Variety of the hepatitis B virus genovariants in the military. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(3): 46-53. (in Russian)
12. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B., Zueva E.B. et al. Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; 4: 96-104. (in Russian)
13. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Schemelelev A.N., Valutite D.E. et al. The prevalence of hepatitis B and C virus's markers among conditionally healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam). *Infektsiya I immunitet*. 2021; 11(6): 1131-40. DOI:10.15789/2220-7619-TPO-1793. (in Russian)
14. Balde T.A.L., Boumbaly S., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (1): 87-94. (in Russian)
15. Shao Y., Su L., Hao R., Wang Q., Naranmandura H. Advances on molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021; 50(1): 113-22. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2021-0032.
16. Tu T., Zhang H., Urban S. Hepatitis B Virus DNA Integration: In Vitro Models for Investigating Viral Pathogenesis and Persistence. *Viruses*. 2021; 13(2): 180. DOI: 10.3390/v13020180.