

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Жигалева О.Н.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}, Ермолаев И.И.^{1,2}

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Гепатит С является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний печени в мире и вызывается инфекцией вируса гепатита С (ВГС), которое может привести к тяжелым последствиям – циррозу, раку печени (гепатоцеллюлярной карциноме, ГЦК) и летальному исходу. Согласно стратегии Всемирной организации здравоохранения на 2022–2030 гг. подчеркивается важнейшая роль сектора здравоохранения в прекращении эпидемии. По данным руководства Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), опубликованному в 2016 году, число смертей от заболеваний, связанных с ВГС увеличивается, а смертность пациентов от ВГС-ассоциированного цирроза и печеночно-клеточного рака будет продолжать расти, если в клинике не будут применяться более эффективные методы лечения. К настоящему времени накоплен большой опыт ведения и лечения пациентов с гепатитом С, который положен в основу представленных рекомендаций. Таким образом, обнаружение ВГС с помощью простого, быстрого, но высокочувствительного и специфичного метода ПЦР может помочь уменьшить глобальное бремя ВГС на здравоохранение во всем мире. В статье описывается разработка набора реагентов для выявления нуклеиновой кислоты РНК вируса гепатита С методом ПЦР-РВ, что позволит диагностировать пациентов на разных стадиях инфекции, определять эффективность проводимого антиретровирусного лечения. Общая диагностическая чувствительность разрабатываемого набора составляет 100%, а специфичность – 100%, взятых у 200 пациентов с подтвержденным и отрицательным результатом по ВГС. На основании 200 образцов плазмы и сыворотки крови при использовании набора методом ПЦР в реальном времени ложноположительных реакций выявлено не было. Данные демонстрируют потенциал использования внутреннего эндогенного образца (ЭВКО), использующего в качестве мишеней гены человека и позволяющий судить о наличии клеток человека в образце и правильности проведения этапа пробоподготовки.

Ключевые слова: вирус гепатита С; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ); ПКО; ВКО; амплификация; детекция; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса гепатита С в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68(7):437-442.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-437-442>.

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: jjgon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО "ЭКОлаб".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.05.2023

Принята к печати 15.05.2023

Опубликовано 03.07.2023

Zhigaleva O.N.¹, Mardanly S.G.^{1,2}, Gashenko T.Yu.^{1,2}, Ermolaev I.I.^{1,2}

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR QUALITATIVE DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN CLINICAL MATERIAL BY REAL-TIME PCR WITH HYBRIDIZATION-FLUORESCENCE DETECTION

¹CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Hepatitis C is one of the most common chronic liver diseases in the world and is caused by infection with hepatitis C virus (HCV), which can lead to severe consequences - cirrhosis, liver cancer (hepatocellular carcinoma, HCC) and death. The World Health Organization's strategy 2022-2030 underlines the critical role of the health sector in ending the epidemic. According to World Health Organization (WHO) guidelines published in 2016, deaths from HCV-related diseases are increasing, and patient mortality from HCV-associated cirrhosis and liver cell cancer will continue to rise unless more effective treatments are used in the clinic. There is now a wealth of experience in the management and treatment of patients with hepatitis C, which forms the basis of the

recommendations presented. Thus, detection of HCV using a simple, rapid but highly sensitive and specific PCR method can help to reduce the global HCV burden on public health worldwide. This article describes the development of a reagent kit for the detection of hepatitis C virus RNA nucleic acid by PCR-RV, which will enable the diagnosis of patients at different stages of infection and determine the effectiveness of antiretroviral treatment administered. Total diagnostic sensitivity of developed kit is 100 %, and specificity – 100 %, taken from 200 patients with confirmed and negative HCV results. Based on 200 plasma and serum samples, no false-positive reactions were detected using real-time PCR. The data demonstrate the potential to use an internal endogenous sample (IES) using human genes as targets and to judge the presence of human cells in the sample and the accuracy of the sample preparation step.

Key words: HCV; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR-RV); PCS; IES; amplification; detection; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a reagent kit for qualitative detection of Hepatitis C virus (HCV) RNA in clinical material by real-time PCR with hybridization-fluorescence detection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68(7): 437-442 (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-7-437-442.

For correspondence: Zhigaleva Olga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department PCR CJSC «EKO-lab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;
Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>;
Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>.

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

Acknowledgment. The study was funded by CJSC «EKOLab».

Received 11.05.2023

Accepted

Published 03.07.2023

15.05.2023

Введение. Вирус гепатита С (ВГС) представляет собой небольшой гепатотропный РНК-вирус из семейства *Flaviviridae*, представляя в нем третий, самостоятельный род *Hepacivirus*. Во всем мире хроническим гепатитом С страдают примерно 58 миллионов человек, при этом ежегодно происходит около 1,5 миллиона новых случаев инфицирования. По имеющимся оценкам, хроническим гепатитом С страдают 3,2 миллиона детей и подростков. По оценкам ВОЗ, в 2019 г. от гепатита С умерли приблизительно 290 000 человек, главным образом в результате цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (первичного рака печени) [1].

ВГС — это вирус, который может передаваться при совместном использовании игл, шприцев или других приспособлений для инъекций лекарств; от матери к ребенку во время беременности или при родах; или, в редких случаях, при половом контакте [2].

Вирус состоит из нуклеокапсида, имеющего кубический тип симметрии диаметром 50-80 нм, состоящего из сердцевинного (ядерного) белка и одноцепочечной (+) РНК, снаружи расположена белково-липидная оболочка, содержащая аполипротеин Е (апоЕ) человека и вирусные белки Е1 и Е2 6-8 нм в высоту [3, 4]. Вирусный геном кодирует 10 различных белков, среди которых 3 структурные (С, Е1 и Е2/NS2) и 7 неструктурных (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B). Геном ВГС состоит примерно из 9400 нуклеотидов, с одной большой открытой рамкой считывания, кодирующей полипептид длиной около 3000 аминокислот, состоящий из структурных и неструктурных доменов. Геном HCV фланкирован 5'-нетранслируемой (5'-UTR) и 3'-нетранслируемой (3'-UTR) областями на 5'- и 3'-концах соответственно. Оба UTR являются высокоструктурированными и

имеют решающее значение для трансляции и пролиферации вируса и хорошо сохраняются среди генотипов или штаммов HCV [5]. 5'UTR состоит из 341 нуклеотида, включает внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) и является наиболее консервативным участком генома [6, 7]. 3'UTR состоит из трех участков: сразу за стопкодомом располагается вариабельный участок длиной 27–70 нуклеотидов, за которым следует полиуридиновая/пиримидиновая (polyU/UC) последовательность, далее – высококонсервативный участок длиной 98 нуклеотидов, названный X-РНК [7].

Выделяют 8 генотипов (ГТ), которые обозначаются арабскими цифрами от 1 до 8, и несколько десятков субтипов ВГС, которые обозначаются латинскими буквами [3, 8]. Наибольшее клиническое значение имеют субтипы ГТ 1: а и в. Генотипы и субтипы различаются в последовательностях приблизительно на 30% и 20% соответственно. В России самым распространенными являются ГТ 1 (52,6%, из них 3,7% приходятся на субтип 1а и 48,9% – на субтип 1в и ГТ 3 (39,6%), гораздо реже встречается ГТ 2 (7,8%). Генотипы 4-6 встречаются менее чем в 0,01% случаев, ГТ 7 и 8 – крайне редко [3, 9].

Выявление РНК ВГС осуществляется с помощью молекулярных методов: ИФА, иммуноблоттинг, полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время основным молекулярно-биологическим методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени, используемая для качественных и количественных тестов. Большое значение определения HCV, определяет алгоритм противовирусной терапии (продолжительность курса лечения, дозы противовирусных препаратов) и ее прогноз.

Вирус гепатита С обладает высокой генетической вариабельностью, с учетом большого количества различных генотипов, а также множественных мутаций в вирусных частицах. Такие отличные частицы от материнского вируса называют квазивидами. Они способны уклоняться от действия нейтрализующих антител, синтезируемых в ответ на исходный вариант вируса. Такие изменения в геноме вируса часто всего приводят к увеличивающемуся числу ложноотрицательным результатам при проведении ОТ-ПЦР. Ложноотрицательный результат чрезвычайно опасен и может вызвать множество проблем в лечении и контроле над распространением вируса.

Результаты сравнительной частоты мутаций для полипротеина (*POLY*) представлены на прилагаемом рисунке, где выделенным цветом показаны области мутаций у разных людей, точками обозначены совпадающие нуклеотидные последовательности.

В наборах, присутствующих на рынке в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО), используется экзогенная синтетическая конструкция. Нами была разработана система диагностики ВГС на основе набора реагентов для метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с эндогенным ВКО.

Цель исследования - разработать набор реагентов «Гепатит С» для качественного выявления РНК ВГС методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. При подготовке было использовано оборудование и материалы:

- Олигонуклеотиды (ДНК-Синтез, Россия);
- Набор для выделения («КовидЭК Экстракт» - РУ № РЗН 2022/18013 от 17.08.2022, ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [10];
- 2х ПЦР буфер (0,5 М Tris Cl, pH 8.6, 0,05 М KCl, 15 mM MgCl₂, 1 % Tween 20)

Аmplификацию, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаборатории» (США) [11].

Биологический материал в количестве 200 штук был получен от компании INVITRO (г. Москва). Об-

разцы плазмы и сыворотки крови от пациентов с ВГС хранились при температуре -20 °С.

Эндогенный внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген человека β -глобулин. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце гена человека, который прошел все стадии исследования: хранение, экстракция, амплификация.

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмиду (pUC19) с синтетическим фрагментом гена РНК ВГС в 1X TE буфере.

Экстракция нуклеиновых кислот для сравнительных наборов проводилась методом спиртового осаждения с последующей отмывкой РНК.

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank был проведен с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Специфичность выбранных олигонуклеотидов изучали с помощью компьютерной программы BLAST online [12].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [13].

Результаты и обсуждение. Разработан набор реагентов «Гепатит С» для выявления РНК ВГС в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

По данным приводимых в литературе исследований и анализа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank в этом исследовании были использованы геномы различных генотипов ВГС. Для создания праймеров была выбрана области полипротеина (*POLY*) вируса ВГС.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных участков в последовательностях ВГС с использованием биотехнологических программ, результаты представлены в таблице [14-16].

Используемые праймеры

Мишень	Ген	Последовательность (5'-3')	Ориентация праймера
ВГС	<i>POLY</i>	GCGATATCATGAGCACACTTCCTAAA	Прямой
		ААТСТАГАТКАТГГСТГСТГГАТГААТ	Обратный
		AGGACGACCGGGTCCTTTC	Флуоресцирующий зонд
<i>Homo sapiens</i>	β -глобулин	ATCTTGGCTCACTGCAACCT	Прямой
		CCCTAAAAGAAAATCGCCAATC	Обратный
		ACAGCGCGTTGTTCTATGTG	Флуоресцирующий зонд

Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких как GC%, температура плавления (T_m), длина праймера и их взаимосвязи между собой.

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению вируса методом ОТ-ПЦР стало использование гена самого человека [17].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена β -глобулин, взятых в базе данных GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [18].

В итоге, для создания реакционной смеси были использованы следующие компоненты: 2x ПЦР буфер, рабочая концентрация Taq-полимеразы - 5 ед/мкл, рабочая концентрация каждого праймера и зондов составляет 1 рМ/мкл, 5% ДМСО, 0,5% 40 единиц ревертазы.

Экстрагирование РНК проводилось из 250 мкл об-

разца. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) входили 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО) и положительный контроль ПЦР (ПКО).

Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси и 5 мкл экстрагированных РНК. Отрицательный и положительный контроль для постановки ПЦР вносился в отдельные пробирки в объеме 5 мкл.

Включенный в тест ген β -глобулин человека в качестве внутреннего контроля помогал оценивать качество проведенных исследований и достоверность результатов. Наличие эндогенного ВКО позволяет контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, позволяя эффективно оценивать каждый этап проведения анализа, а также позволяет оценить качество хранения пробы, что не позволяет сделать экзогенный ВКО (рис 1, а, б).

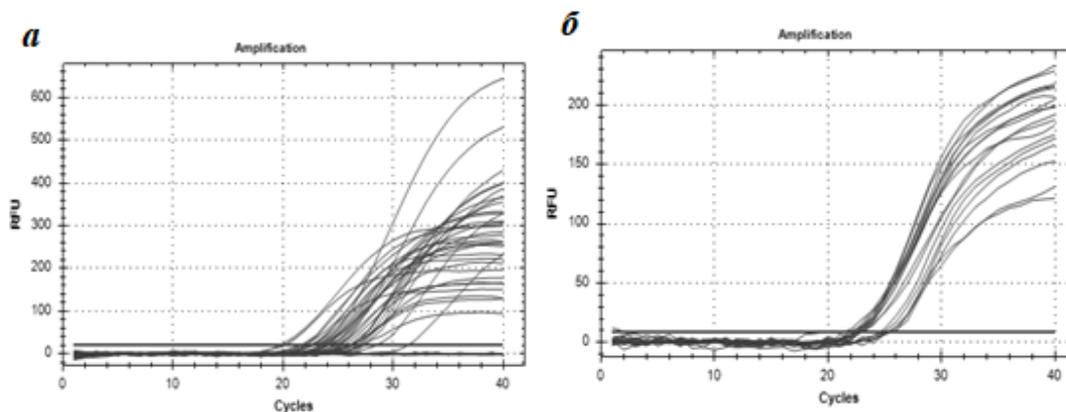


Рис. 1. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО. а - результаты детекции эндогенного ВКО; б - результаты детекции синтетической конструкции ВКО. Здесь и на рис.2: по оси абсцисс – количество циклов (Cycles); по оси ординат – уровень флуоресценции (RFU).

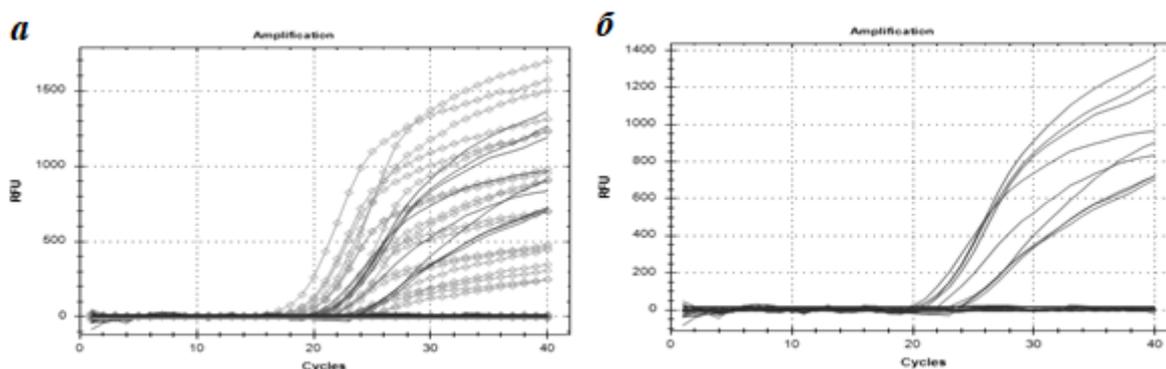


Рис. 2. Результаты сравнительной детекции ВГС + ген человека и ВГС.

а - результаты детекции по двум каналам в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВГС + эндогенный ВКО). Сплошная линия – выявление РНК ВГС (специфика), ромбовидные линии – выявление гена человека (ВКО); б - результаты детекции по одному каналу в ОТ-ПЦР в одной пробирке (ВГС).

Для эндогенного ВКО у каждой пробы наблюдается свой выход на графике с различным уровнем флуоресценции (RFU), для синтетической конструкции наблюдается выход из одной точки, в большей части с одинаковым для всех проб (RFU).

Аmplификация и детекция проводилась как отдельно для выявления ВГС по одному каналу (моноплексное выявление), так и одновременно выявлялся ВГС и ген человека (ВКО) по двум каналам (мультиплексное выявление) для оценки возможности конкуренции между каналами для ВКО и спецификации.

Результаты сравнительной детекции ВГС + ген человека и ВГС представлены на рис 2, а, б.

Конкуренции между каналами не выявлено. Все результаты по выявлению положительных и отрицательных проб совпали между разрабатываемым набором и коммерческим набором сравнения.

Анализ разрабатываемого набора был подвергнут оценке с точки зрения аналитической чувствительности и специфичности, воспроизводимости.

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК ВГС, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительный результат амплификации специфического продукта по каналу детекции Rox и положительный результат амплификации эндогенного ВКО по каналу детекции Fam.

Оценка аналитической специфичности набора была проведена на панели нуклеиновых кислот следующих организмов: РНК вирусов HAV, HDV, HGV, SARS-CoV-2, HIV, ДНК вирусов HBV, EBV, HCMV, вирус гриппа А, В. Все результаты были отрицательными, показывая, что ни один из этих образцов не вступал в перекрестную реакцию с реакционной системой определения ВГС, тем самым подтверждая ее специфичность, которая составила 100%.

Для определения чувствительности набора был использован положительный образец, разведенный 10-м шагом до подтвержденной концентрации 8×10^2 ГЭ/мл. Показатели обнаружения были на уровне 100%, что свидетельствует о достаточной чувствительности.

Повторяемость и воспроизводимость определения РНК ВГС были установлены путем тестирования положительных и отрицательных образцов крови и плазмы крови.

Условия повторяемости включали в себя: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле:

$$E.A. = \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{C}_i - \bar{C})^2}{n-1}}$$

и не превышал 6 %, где: \bar{C} – средняя арифметическая величина концентрации РНК гепатита С, МЕ/мл;

\bar{C}_i - концентрация РНК гепатита С для каждого отдельного определения, МЕ/мл;

n - число определений.

Условия воспроизводимости – тестирование в раз-

ных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни.

Таким образом, воспроизводимость и повторяемость работоспособности набора реагентов составляет 100%.

Выбор в качестве генетической мишени в наборе гена *полипротеина POLY* обусловлен меньшей частотой мутаций в гене, относительно других регионов генома.

Заключение. Разрабатываемый набор реагентов способен качественно выявлять РНК ВГС в разных генотипах независимо от субтипа. Определение различных генотипов позволит своевременно назначить лечение антиретровирусными препаратами, контролировать ход лечения заболевания, что значительно повысит выживаемость среди населения и уменьшит распространения инфекции. Использование эндогенного ВКО позволит повысить точность проводимого анализа ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 2, 4-6, 8, 12, 14-16, 18 см. REFERENCES)

1. Всемирная организация здравоохранения (Гепатит С) 2023. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (17 апреля 2023).
2. Рубриктор клинических рекомендаций (Хронический вирусный гепатит С) 2023. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/516_2 (20 апреля 2023).
3. Калинина О.В., Дмитриев А.В., Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита С. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(2): 9-13.
4. Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы элиминации инфекции. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(3): 37-45. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-3-37-45.
5. ЗАО «ЭКОлаб» (Отделение ПЦР-диагностики - КовидЭК Экстракт); 2023. Режим доступа: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (дата обращения 27 апреля 2023).
6. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с принадлежностями»), 2023. Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 12 февраля 2023).
7. Безродный С.Л., Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Помазанов В.В., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом ОТ- ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(11): 663-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667.
8. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В. Разработка набора реагентов для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом прямой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(12): 739-43. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743.

REFERENCES

1. World Health Organization (Hepatitis C) 2023. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (accessed 17 April 2023).
2. Centers for Disease Control and Prevention (Hepatitis C Surveillance 2020) 2023. Available at: <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2020surveillance/hepatitis-c.htm> (accessed 14 April 2023).
3. Rubric of clinical guidelines (Chronic viral hepatitis C) 2023. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/516_2 (accessed 20 April 2023).
4. Jean Dubuisson, François-Loïc C. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology*. 2014; 61(1):S3-S13. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
5. Guoli S., Tetsuro S. Molecular Basis of Encapsidation of Hepatitis C Virus Genome. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9(396):1-7. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00396.
6. Brett D., Charles M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005; 436:933-8. DOI: 10.1038/nature04077.
7. Kalinina O.V., Dmitriev A.V. Structural and functional genome organization and life cycle of Hepatitis C virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 33(2):9-13. (in Russian)
8. Sergio M.B., Charlotte H., Bandita H.P., Robert H., Luisa M.S., Diana M.B. et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018; 218(11):1722–9. DOI: 10.1093/infdis/jiy401.
9. Pimenov N.N., Komarova S.V., Karandashova I.V., Tsapkova N.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of incidence, prevalence and mortality rates before the start of the programme of infection elimination. *Infektsionnye bolezni*. 2018; 16(3):37-45. DOI: 10.20953/1729-9225-2018-3-37-45. (in Russian)
10. CJSC «EKOLab» (PCR diagnostic department - CovidEK Extract). 2023. Available at: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (accessed 27 April 2023). (in Russian)
11. Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor): state register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices (Registration certificate for the medical product «Thermocycler for nucleic acid amplification 1000 with accessories») 2023. Available at: <https://www.rozdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 12 February 2023). (in Russian)
12. Basic Local Alignment Search Tool 2023. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 10 February 2023).
13. Bezrodny S.L., Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Pomazanov V.V., Gashenko T.Yu. Development of a reagent kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 virus RNA in naso- and oropharyngeal swabs by real-time RT-PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(11): 663-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-11-663-667. (in Russian)
14. Lida C., Wenli L., Kuo Z., Rui Z., Tian L., Mingju H. et al. Hepatitis C Virus RNA Real-Time Quantitative RT-PCR Method Based on a New Primer Design Strategy. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2016; 18(1):84-91. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.07.009.
15. Akanksha S., Dhananjay S.M., Mohammad I. A Single-step multiplex quantitative real time polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus genotypes. *International Journal of Translational Medicine*. 2016; 5(1):34-42.
16. Vaithilingaraja A., Roland R., Vidhya K., Eric Y.S., Tuyet N.Ho, Chang L. et al. High-Resolution Functional Profiling of Hepatitis C Virus Genome. *PLoS Pathog*. 2008; 4(10):1-16. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000182.
17. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V. Development of a reagent kit for the real-time detection of SARS-CoV-2 RNA in naso- and oropharyngeal smears by direct polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67 (12): 739-43. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743. (in Russian)
18. International Nucleotide Sequence Database Collaboration 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 5 April 2023).