

© 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 С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В

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

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

Вирус гепатита В (HBV) наряду с другими вирусными гепатитами является распространенным возбудителем и опасным инфекционным агентом среди тех, которые вызывают заболевания печени у людей, он определен как одна из основных глобальных проблем здравоохранения не только в России, Европе, но и во всем мире. С момента открытия вируса гепатита В было инфицировано примерно 400 миллионов человек во всем мире; цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома, основные последствия хронического гепатита В, приводящие к более полумиллиона смертей в год. В 2016 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) поставила амбициозную цель ликвидировать вирусный гепатит, как основную глобальную угрозу общественному здравоохранению к 2030 году. Виремия HBV является важнейшим фактором риска прогрессирования хронической HBV-инфекции, в связи с этим направлены поиски на новые методы обнаружения вируса гепатита В наряду с хорошо зарекомендовавшими себя иммунологическими методами. Качественное выявление ДНК HBV в крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало важнейшим инструментом в оценке и лечении инфекции. В статье приводится описание разработки набора реагентов для выявления вируса HBV методом ПЦР. Диагностическая чувствительность и специфичность разрабатываемого набора составляет 100 %, такие результаты были получены на пробах от 200 пациентов с подтвержденным и отрицательным результатом по HBV. По анализу литературных данных показано, что скорость мутаций в геноме для HBV выше, чем для большинства ДНК-вирусов. В связи с этим областью для посадки праймеров послужил ген POL, после выравнивания последовательностей генотипов HBV, в том числе с приобретенными мутациями. Включенный в набор эндогенный внутренний контроль, нацеленный на ген человека (бета-глобулин), позволит судить о реальном наличии клеток человека в образце и правильности проведения этапа пробоподготовки.

Ключевые слова: вирус гепатита В (HBV); полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); ПКО; ВКО; праймеры; детекция; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов с применением метода ПЦР для качественной идентификации ДНК вируса гепатита В. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12):775-779. DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-775-779>

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

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО "ЭКОлаб".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2023

Принята к печати 30.11.2023

Опубликовано 10.12.2023

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

DEVELOPMENT OF A PCR REAGENT KIT FOR QUALITATIVE IDENTIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS DNA

¹JJSC «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 B virus (HBV) along with other viral hepatitis is a common pathogen and dangerous infectious agent among those that cause liver disease in humans, it is identified as one of the major global health problems not only in Russia, Europe, but also worldwide. Since its discovery, the hepatitis B virus has infected approximately 400 million people worldwide; cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the main consequences of chronic hepatitis B, leading to more than half a million deaths per year. In 2016, the World Health Organization (WHO) set an ambitious goal to eliminate viral hepatitis as a major global public health threat by 2030. HBV viremia is a critical risk factor for the progression of chronic HBV infection, and new methods for detecting hepatitis B virus, alongside well-established immunological methods, are being sought. Qualitative detection of HBV DNA in blood by polymerase chain reaction (PCR) has become an essential tool in evaluation and treatment of infection. This article describes the development of a reagent kit for the detection of HBV by PCR. Diagnostic sensitivity and specificity of the developed kit is 100%, these results were obtained on samples from 200 patients with confirmed and negative HBV results. A review of the literature shows that the mutation rate in the genome for HBV is higher than for most DNA viruses. In this regard, the POL gene was used as the region for primer seeding, after alignment of HBV genotypes, including those with acquired mutations. The endogenous internal control included in the kit, targeting the human gene (beta-globulin), will judge the actual presence of human cells in the sample and the correctness of the sample preparation step.

Key words: hepatitis B virus (HBV); real-time polymerase chain reaction (PCR-RT); PCS; IES; primers; detection; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a PCR reagent kit for qualitative identification of hepatitis B virus DNA. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 775-779 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-775-779>

For correspondence: Zhigaleva O'l'ga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department PCR CJSC «EKOLab»; 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.L., <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 15.11.2023

Accepted 30.11.2023

Published 10.12.2023

Введение. Гепатит В — это вирусное инфекционное заболевание, поражающее печень и протекающее в острой или хронической форме [1]. Вирус гепатита В (HBV) входит в состав семейства *Hepadnaviridae* рода *Orthohepadnavirus*.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2019 году в мире насчитывалось 296 млн. человек, живущих с хроническим гепатитом В, при этом ежегодно происходит около 1,5 млн. новых случаев инфицирования. По оценкам, в том же году от гепатита В умерло 820 000 человек, главным образом в результате цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (первичного рака печени) [2]. По статистике в России в 2020 году заболеваемость гепатитом В среди населения составила 4,7 человека на 100 000 населения, в 2021 году 4,8 человека на 100 000 населения, что почти в 2 раза меньше чем в 2019/2018 годах, где заболеваемость составляла 9,9/9,3 человека на 100 000 населения [3].

Вирус гепатита В является уникальным среди вирусных патогенов человека, поскольку он представляет собой ДНК-вирус, который реплицируется через РНК-посредник, и, таким образом, относится к ДНК- и РНК-вирусам с обратной транскрипцией [4,5]. Молекула ДНК представлена короткой нитью, которая является плюс-нитью, длинная нить ДНК минус-нитью. Длинная цепь связана с ДНК-полимеразой, которая достраивает плюс-цепь до полноценной структуры. ДНК-полимераза способствует синтезу новых цепей ДНК на матрице как ДНК, так и РНК [6].

Инфекционный вирион HBV имеет сферическую структуру с двойной оболочкой диаметром 42 нм, состоящую из липидной оболочки. Геномная структура HBV, содержащаяся внутри капсулы вируса, является одновременно компактной и сложной, при этом она способна кодировать семь различных белков, занимая всего 3,2 килобазы (кб) [6]. HBV содержит четыре открытые рамки считывания ((С (ядро), Р (полимераза), S (поверхностный антиген), Х (белок)) и семь белков (HBeAg, HBcAg, LHBs, МНВs, SHBs, полимераза, HBx)) [7]. Гетерогенность последовательностей является характерной чертой HBV. Однако в результате ограничений, связанных с перекрывающимися открытыми рамками считывания и наличием вторичных структур РНК, таких как эILON, кодируемых перекрывающимися областями, скорость мутаций в различных областях генома HBV варьируется. По оценкам, геном HBV эволюционирует со скоростью примерно от 10^{-4} до 10^{-6} нуклеотидных замен/год [8-10].

На сегодняшний день, основываясь на межгруппо-

вой дивергенции по всему геному, HBV филогенетически классифицирован на 10 генотипов, обозначенных латинскими буквами от А до J, имеющих строгое географическое распределение. Каждый генотип характеризуется также своим субгенотипом, однако, у таких генотипов как: Е, G, H, I, J субгенотипов нет. В Российской Федерации доминирующими являются генотипы D (около 90% случаев) и А (около 10%), однако, на разных территориях частота генотипов может различаться [11]. Наряду с генотипом для субгенотипа также характерно четко сложившееся географическое распространение, которое может меняться в связи с миграцией населения. Такие присутствующие различия между генотипами и их субтипами имеют клиническую значимость для проведения эффективной антиретровирусной терапии [1, 12].

Диагностика и мониторинг HBV-инфекции основаны на выявлении вирусных антигенов и специфических анти-HBV-антител, а также обнаружения нуклеиновых кислот, нацеленных на геномный материал вируса. Наличие ДНК HBV в периферической крови является надежным маркером активной репликации вируса. По сравнению с иммуноанализами, обнаружение и количественная оценка ДНК HBV признаны на сегодняшний день более актуальными для диагностики инфекции, принятия терапевтических решений и оценки ответа на проводимую терапию антиретровирусными препаратами [13]. На сегодняшний день разработан ряд методов обнаружения ДНК HBV, таких как ПЦР, в том числе количественная ПЦР в режиме реального времени (qPCR-RT), петлевая изотермическая ПЦР (LAMP), амплификация по катящемуся кругу (RCA) и др. [14]. Большинство, присутствующих на рынке коммерческих наборов для выявления и количественного определения HBV в основном основаны на ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией, обладающей хорошей стабильностью, чувствительностью, специфичностью и точностью. Таким образом, высокочувствительные методы определения ДНК HBV необходимы для целей прогноза, диагностики и мониторинга лечения.

В наборах, присутствующих на рынке в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО), используется экзогенная синтетическая конструкция. При разработке набора была реализована система с использованием эндогенного ВКО для диагностики HBV.

Цель исследования - разработать набор реагентов для качественного выявления ДНК HBV методом ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. Для разработки набора биологический материал в количестве 200 образцов был получен от компании INVITRO (Москва). Образцы плазмы и сыворотки крови от пациентов с HBV хранились при температуре -20 °С.

Экстракция нуклеиновых кислот из сыворотки и плазмы крови проводилась с использованием набора «КовидЭК Экстракт» - РУ № РЗН 2022/18013 от 17.08.2022 (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) в соответствии с протоколом [15].

Внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген *β-глобулин*. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала, а также позволяет оценить правильность и точность проведения анализа.

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

Амплификация, детекция и обработка результатов оценивалась с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаб-оратории» (США).

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank был проведен с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Праймеры были выбраны после анализа литературных данных, зонды были разработаны с использованием программного обеспечения Primer Express (Applied Biosystems, США). Для предсказания поведения подобранных праймеров была использована программа AmplifX (CNRS, Aix-

Marseille Université). Специфичность подобранных праймеров на ДНК HBV определялась с помощью анализа *in silico* с использованием программы BLAST online [16].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [17].

Результаты и обсуждение. Был разработан набор «ГепаЭК В» для выявления ДНК HBV в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

При разработке набора метод проведения исследований состоял из нескольких этапов: выделение ДНК HBV, реакции амплификации с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

Экстрагирование ДНК проводилось из 250 мкл образца. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) входили 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО) и положительный контроль ПЦР (ПКО).

Конечный объем смеси для амплификации составлял 25 мкл, включая 20 мкл предварительной смеси для ПЦР (Master mix) и 5 мкл концентрированного образца ДНК.

Для создания праймеров был выбран ген (*POL*) вируса HBV. Последовательности праймеров и зондов, использованных при разработке набора, представлены в таблице. Праймеры были подобраны после изучение литературных данных [18-20].

Полное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных участков в последовательностях HBV с использованием биотехнологических программ.

Используемые праймеры

Мишень	Ген	Последовательность (5'-3')	Ориентация праймера
HBV	<i>POL</i>	GTAGTCTGCATTGCGTTTTATCA	Прямой
		GACAGTTCGCGCAACATACAATT	Обратный
		GGAGGCGGAGCTGGCAA	Флуоресцирующий зонд
Homo sapiens	<i>β-глобулин</i>	ATCTTGGCTCACTGCAACCT	Прямой
		CCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC	Обратный
		ACAGCGCGTTGTCTATGTG	Флуоресцирующий зонд

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

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению вируса методом ПЦР стало использование гена самого человека [21].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена *β-глобулин*, взятых в базе данных GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [22].

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 эк-

зогенный ВКО (рис. 1, а, б).

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).

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

Результаты сравнительной детекции HBV + ген человека и HBV 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.

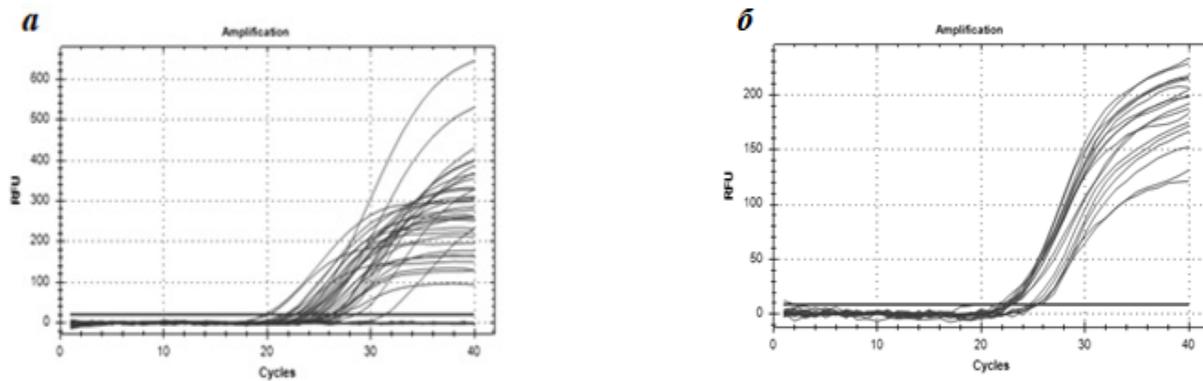


Рис. 1. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО.

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).

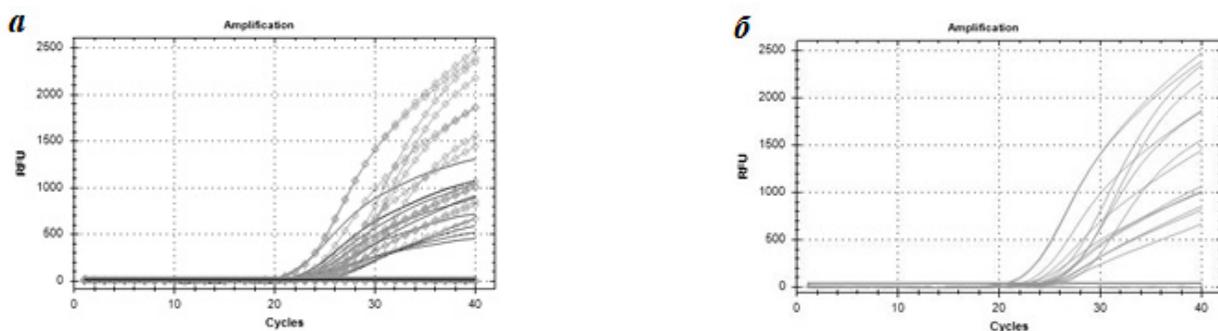


Рис. 2. Результаты сравнительной детекции HBV + ген человека и HBV.

а - результаты детекции по двум каналам в ПЦР в одной пробирке (HBV + эндогенный ВКО). Кривые с ромбами – выявление ДНК HBV (специфика), кривые без обозначений – выявление ДНК гена человека (ВКО); б - результаты детекции по одному каналу в ПЦР в одной пробирке (HBV).

Специфичность набора «ГепАЭК В» обеспечивается выбором специфических праймеров и зондов. Это также обеспечивается жесткими условиями реакции, праймеры и зонды были подвергнуты обработке на предмет возможной гомологии со всеми последовательностями, опубликованными в GenBank. Было установлено, что праймеры и зонды очень специфичны для последовательностей HBV. Специфичность набора оценивалась на панели нуклеиновых кислот других вирусов: РНК вирусов HCV, HAV, HDV, HGV, SARS-CoV-2, HIV, ДНК вирусов EBV, HCMV. 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 была создана серия разведений от 10^5 МЕ/мл до 10^1 МЕ/мл HBV с использованием набора «ГепАЭК В». Анализ был проведен в трех параллелях, на 100 положительных пробах с HBV. Предел обнаружения для каждой проводимой параллели составил 6×10^2 МЕ/мл. Это означает, что с вероятностью 100 % будет обнаружено 6×10^2 МЕ/мл.

Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК HBV были установлены путем тестирования положительных и отрицательных образцов крови и плазмы крови.

Условия повторяемости включали: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Условия воспроизводимости – тестирование в разных 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 %.

Заключение. Разрабатываемый набор реагентов для анализа методом ПЦР в реальном времени представляет собой быстрый и высокоспецифичный набор для выявления вируса HBV в крови. В сравнении с традиционными иммунологическими методами, ПЦР в реальном времени позволит снизить вероятность выдачи ложноотрицательных результатов. Постоянный пересмотр и анализ на возможные мутации в гене *POL* обеспечит работоспособность набора реагентов. Выявление вируса в крови позволит своевременно проводить терапию лекарствами, проводить скрининг донорской крови и способствует уменьшению распространения HBV. Включенный в набор эндогенный ВКО повысит точность проводимого анализа ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-10, 10-14, 16, 18-20, 22 с.м. REFERENCES)

1. Рубрикатор клинических рекомендаций (Острый гепатит В (ГВ) у взрослых); 2023. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1 (2 мая 2023 г.).
2. Всемирная организация здравоохранения (Гепатит В); 2023. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/>

- hepatitis-b (2 мая 2023 г.).
3. Федеральная служба государственной статистики (Росстат); 2023. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/search?q=заболеваемость+гепатитом> (7 мая 2023 г.).
 11. Ивашкин В.Т., Юшук Н.Д., Маевская М.В., Знойко О.О., Дудина К.Р., Кареткина Г.Н. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 3: 58-88.
 15. ЗАО «ЭКОлаб» (Отделение ПЦР-диагностики - КовидЭК Экстракт); 2023. Режим доступа: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (дата обращения 4 мая 2023 г.).
 17. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94.
 21. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного обнаружения РНК вируса ВИЧ-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 298-304. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304.
-
- ## REFERENCES
1. Rubric of clinical guidelines (Acute hepatitis B (HB) in adults) 2023. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1 (2 мая 2023). (in Russian)
 2. World Health Organization (Hepatitis B) 2023. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (2 мая 2023). (in Russian)
 3. Federal State Statistics Service (Rosstat) 2023. Available at: https://eng.rosstat.gov.ru/search?q=incidence+of+hepatitis+&date_from=&content=on&date_to=&search_by=all&sort=relevance (7 мая 2023). (in Russian)
 4. Liang T. J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(5): S13–S21. DOI: 10.1002/hep.22881.
 5. Venkatakrisnan B., Zlotnick A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual review of virology*. 2016; 3(1): 429–51. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042238.
 6. Zhao K., Liu A., Xia Y. Insights into Hepatitis B Virus DNA Integration-55 Years after Virus Discovery. *The Innovation*. 2020; 1(2): 1-10. DOI: 10.1016/j.xinn.2020.100034.
 7. Ho J. K., Jeevan-Raj B., Netter H. J. Hepatitis B Virus (HBV) Subviral Particles as Protective Vaccines and Vaccine Platforms. *Viruses*. 2020; 12(2): 1-26. DOI: 10.3390/v12020126.
 8. Zehender G., Ebranati E., Gabanelli E., Sorrentin, C., Lo Presti A., Tanzi E. et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient traveling companion or a recent encounter?. *World journal of gastroenterology*. 2014; 20(24): 7622–34. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7622.
 9. Spitz N., Mello F. C. A., Moreira A. S., Gusatti C. S., Martins R. M. B., Gomes S. A. et al. Reconstruction of the spatial and temporal dynamics of hepatitis B virus genotype D in the Americas. *PloS One*. 2019; 14(7): 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0220342.
 10. Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive analysis of clinically significant hepatitis B virus mutations in relation to genotype, subgenotype and geographic region. *Frontiers in microbiology*. 2020; 11: 1-22. DOI: 10.3389/fmicb.2020.616023.
 11. Ivashkin V.T., Yushchuk N.D., Maevskaia M.V., Znoyko O.O., Dudina K.R., Karetkina G.N. et al. Clinical guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Society for the Study of the Liver on the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis B. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2014; 3: 58-88. (in Russian)
 12. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World journal of gastroenterology*. 2014; 20(18):5427–34. DOI: 10.3748/wjg.v20.i18.5427.
 13. Wu B., Xiao F., Li P., Du Y., Lin J., Ming K. et al. Ultrasensitive detection of serum hepatitis B virus by coupling ultrafiltration DNA extraction with real-time PCR. *PLoS One*. 2017; 12(2): 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0170290.
 14. Wang S., Li H., Ko Z., Ren F., Jin Y., Yang L. et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021; 27(3): 443–50. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.04.018.
 15. CJSC «EKOlab» (PCR diagnostic department - CovidEK Extract); 2023. Available at: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (accessed 4 May 2023). (in Russian)
 16. Basic Local Alignment Search Tool 2023. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 30 April 2023).
 17. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a reagent kit for the quantitative determination of hepatitis B virus (HBV) DNA in clinical material by PCR with hybridization-fluorescence detection. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94. (in Russian)
 18. Portilho M. M., Mendonça A. C. D. F., Bezerra C. S., do Espirito-Santo M. P., de Paula V. S., Nabuco L. C. et al. Usefulness of in-house real time PCR for HBV DNA quantification in serum and oral fluid samples. *Journal of virological methods*. 2018; 256: 100–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.03.001.
 19. Naito H., Hayashi S., Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(1): 362–4. DOI: 10.1128/JCM.39.1.362-364.2001.
 20. Ding L., Rui C., Zhansheng J., Xiangling W., Pin, L., Zhen Y. et al. Detection of hepatitis B virus genotypes A to D by the fluorescence polarization assay based on asymmetric PCR. *Journal of virological methods*. 2010; 168(1-2): 31–7. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.04.011.
 21. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu. Development of the reagent kit for qualitative realtime detection of HIV-1 RNA by polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (5): 298-304. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304. (in Russian)
 22. International Nucleotide Sequence Database Collaboration; 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 8 May 2023).