

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К АНАЛОГАМ НУКЛЕОЗ(Т)ИДОВ M204I/V У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

Е.А. Елпаева, А.Б. Комиссаров, М.М. Писарева, М.П. Грудинин, О.И. Киселев

ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Для лечения хронического гепатита В (ХГВ) широко используются аналоги нуклеоз(т)идов (АН), такие как ламивудин (ЛАМ), телбивудин (ТБВ), адефовир (АДФ), энтекавир (ЭНТ). Однако длительное применение этих препаратов часто приводит к развитию лекарственной устойчивости. Наиболее часто встречаются замены метионина на валин в 204 положении обратной транскриптазы (rtM204V), либо метионина на изолейцин (rtM204I). Раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ. В настоящее время существует много высокочувствительных технологий обнаружения мутаций устойчивости, таких как секвенирование нового поколения, метод обратной гибридизации с использованием олигонуклеотидных зондов (LiPA), масс-спектрометрический метод. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, поэтому их использование в клинических лабораториях пока не получило широкого применения. Целью данной работы было разработать простой и точный метод для определения мутации rtM204I/V, основанный на ПЦР в реальном времени. Разработанный метод показал высокую специфичность и чувствительность (1000 копий/мл), он менее трудоемок, не нуждается в дополнительном оборудовании, более быстрый и экономичный в сравнении с другими методами. Мутации устойчивости ВГВ к АН определяли в 5 группах пациентов с ХГВ. Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (n = 12), второй группы — ламивудином (n = 10), третьей группы — телбивудином (n = 7), четвертой группы — энтекавиром (n = 15). В пятую группу вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (n = 3). Среди обследованных 47 пациентов с ХГВ распространенность мутаций в YMDD-мотиве полимеразы у пациентов, получавших ламивудин, составила 10%, энтекавир — 20%, телбивудин — 28%. У двух пациентов были выявлены последовательности YIDD/YVDD и у одного — YMDD/YIDD. ПЦР-метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН с детекцией в режиме реального времени может быть использован для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение АН. Применение данного метода ограничит число образцов для углубленного изучения первичных и компенсаторных мутаций устойчивости к АН методом секвенирования. При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и способен выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

Ключевые слова: вирус гепатита В, ПЦР, мутации, секвенирование, хронический гепатит В, аналоги нуклеоз(т)идов.

Адрес для переписки:

Елпаева Екатерина Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.
Тел.: 8 (921) 584-76-90; 8 (812) 499-15-20.
E-mail: elpaeva@influenza.spb.ru

Contacts:

Ekaterina A. Elpaeva
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Professor Popov str., 15/17, Research Institute of Influenza.
Phone: +7 (921) 584-76-90; +7 (812) 499-15-20.
E-mail: elpaeva@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Елпаева Е.А., Комиссаров А.Б., Писарева М.М., Грудинин М.П., Киселев О.И. Новый метод определения мутации устойчивости вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов M204I/V у пациентов с хроническим гепатитом В // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 265–272. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-265-272

Citation:

Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Grudin M.P., Kiselev O.I. New method for determining hepatitis B virus resistance mutations M204I/V to nucleos(t)ide analogues in patients with chronic hepatitis B // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 265–272. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-265-272

NEW METHOD FOR DETERMINING HEPATITIS B VIRUS RESISTANCE MUTATIONS M204I/V TO NUCLEOS(T)IDE ANALOGUES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Elpaeva E.A., Komissarov A.B., Pisareva M.M., Grudinina M.P., Kiselev O.I.

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Analogues of nucleos(t)ides (AN) such as lamivudine (LAM), telbivudine (TBV), adefovir (ADP), entecavir (ENT) are widely used for the treatment of chronic hepatitis B (CHB). However, the prolonged treatment using these drugs often leads to the development of drug resistance. The most common substitutions in the reverse transcriptase are methionine for valine (rtM204V), or methionine for isoleucine (rtM204I) at position 204. Early AN-resistant mutations detection is of great importance to determine the treatment strategy of patients with CHB. Currently there are many highly sensitive methods for detection of drug resistance mutations, such as next-generation sequencing, reverse hybridization-based line probe assay (LiPA), mass spectrometry. However, these methods require expensive equipment and reagents, and they are not widely used in clinical laboratories. The aim of this study was to develop a simple and accurate real-time PCR method for detection of rtM204I/V mutation. This method showed high specificity and sensitivity (1000 copies/ml), it is less laborious and does not require additional equipment, fast and cost effective compared to other methods. HBV mutations of resistance to AN were determined in 5 groups of patients with CHB. Patients of the first group received monotherapy with pegylated interferon (n = 12), the second group — lamivudine (n = 10), the third group — telbivudine (n = 7), the fourth group — entecavir (n = 15). The fifth group consisted of patients who did not receive antiviral therapy (n = 3). The frequency of mutations in HBV polymerase YMDD-motif was determined among 47 patients with CHB: it was 10% for lamivudine treated patients, 20% — for entecavir, 28% — for telbivudine. YIDD/YVDD motifs were identified in two patients and YMDD/YIDD — in one patient. Real-time PCR method for the detection of AN-resistant rtM204I/V mutations in HBV polymerase can be used in routine diagnostics for primary screening of patients not responding to AN treatment. The application of this method can reduce the number of samples for in-depth study of primary and compensatory mutations of resistance to AN by sequencing method. The developed method versus Sanger-sequencing is fast, economical, and provides the detection of minor variants of HBV populations.

Key words: hepatitis B virus, real-time PCR, mutations, sequencing, chronic hepatitis B, analogues of nucleos(t)ides.

Введение

Для лечения хронического гепатита В широко используются аналоги нуклеозидов/нуклеотидов (АН), такие как ламивудин (ЛАМ), телбивудин (ТБВ), адефовир, энтекавир (ЭНТ). Однако длительное применение этих препаратов приводит к развитию лекарственной устойчивости [5, 8, 10].

Мутации устойчивости к АН определяются, прежде всего, заменами в высококонсервативном мотиве тирозин—метионин—аспарагиновая кислота—аспарагиновая кислота (YMDD) С-домена полимеразы ВГВ (rt203-206). Наиболее часто встречаются замены метионина на валин в 204 положении обратной транскриптазы (rtM204V), либо метионина на изолейцин (rtM204I) [9, 14]. Раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ [2].

В настоящее время существует много высокочувствительных технологий обнаружения мутаций устойчивости, таких как секвенирование нового поколения [7], метод обратной гибридизации с использованием олигонуклеотидных зондов (LiPA) [11], масс-спектрометрический метод [12], технология микрочипов [6]. Однако эти методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, поэтому их использование в клинических лабораториях пока не получило широкого применения. В 2013 году стала доступна отечественная коммерческая тест-система для

выявления мутаций устойчивости к АН «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq». Этот метод основан на амплификации фрагмента гена полимеразы с последующим определением нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сенжеру. Однако данный метод имеет ряд недостатков. Во-первых, трудоемкость и использование ДНК-анализатора приводит к высокой конечной стоимости анализа. Во-вторых, невозможность определить минорные варианты популяции вируса, а также присутствие в одном образце различных вариантов ВГВ.

Использование метода ПЦР в реальном времени для выявления мутаций устойчивости в рутинной диагностике оправдано для первичного скрининга пациентов, не отвечающих на лечение АН. Однако для назначения соответствующей терапии у пациентов с заменой rtM204I/V необходимы данные о других заменах в области обратной транскриптазы, что может быть исследовано другими методами [1, 2, 10].

Материалы и методы

Обследовано 47 пациентов с ХГВ. Мутации устойчивости ВГВ к АН определяли в 5 группах пациентов с ХГВ. Пациенты первой группы получали монотерапию пегилированным интерфероном (PEG-IFN), средний возраст в этой группе составил 38±17,3 лет, соотношение мужчин и женщин — 10 (83%) к 2 (17%); пациенты второй группы [средний возраст 23,9±16,6 лет,

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

Аминокислота Праймаер	Метионин (M, Met)		Изолейцин (I, Ile)		Валин (V, Val)	
	Pr1	ПЦР(-)	ATN	ПЦР(-)	ATN	ПЦР(+)
Pr2	ПЦР(+)	ATG	ПЦР(-)	ATN	ПЦР(+)	GTG
					ПЦР(-)	GTN

по половому составу: мужчин — 7 (70%), женщин — 3 (30%) принимали ламивудин (ЛАМ), пациенты третьей группы [средний возраст 36,7±14,4 лет, мужчин — 5 (86%), женщин — 1 (14%)] — телбивудин (ТБВ); пациенты четвертой группы [средний возраст 33,8±11,3 лет, мужчин — 10 (67%), женщин — 5 (33%)] — энтекавир (ЭНТ). В пятую группу [средний возраст 43±17 лет, мужчин — 2 (67%), женщин — 1 (33%)] вошли пациенты, не получавшие противовирусную терапию (ПВТ).

ПЦР в реальном времени. Для определения мутаций устойчивости к аналогам нуклеозидов был разработан метод, основанный на ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При дизайне оригинальных праймеров был модифицирован метод выявления YMDD-мутантов, использующий универсальную матрицу для ПЦР-РВ [4, 13, 15].

Мутации устойчивости к АН определяли при помощи набора реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green (НПК «СИНТОЛ», Россия). ПЦР смесь (смесь-1) содержит реакционный буфер с SYBR Green, 200 мкМ каждого dNTP, 3 мМ MgCl₂, 2 ед. Taq-полимеразы, 100 пкМ праймера PrF (5'-ATACAACACCTGTATGCCATCCCAT). Образец ДНК вносили параллельно в 3 пробирки, содержащие смесь-1 и праймеры Pr1 (5'-CCCCCAATACCACATCATCNAC), Pr2 (5'-CCCCCAATACCACATCATCC) и PrC (5'-CCCCCAATACCACATCATC) соответственно. Праймеры Pr1 и Pr2 подобраны таким образом, чтобы выявить замену в YMDD-мотиве гена полимеразы (табл. 1). Праймер PrC является положительным контролем на наличие ДНК ВГВ и не зависит от наличия или отсутствия мутации.

Аmplification проводили в термоциклере Rotor-Gene (Corbett Research, Австралия). Термальный профиль реакции: 1) начальная денатурация 95°C — 5 мин; 2) 95°C — 15 с, 62°C — 20 с, 62°C — 20 с (измерение флуоресценции на каждом цикле), уменьшение температуры отжига праймеров (Touch Down) с шагом 1°C, 7 циклов; 3) 95°C — 15 с, 55°C — 20 с, 62°C — 20 с (измерение флуоресценции на каждом цикле), 30 циклов. По окончании реакции была построена кривая плавления в диапазоне от температуры отжига праймеров до температуры полной денатурации — примерно 95°C.

Расчет эффективности ПЦР проводили по формуле $E = 10^{-1/K}$, где E — показатель эффективности ПЦР, K — угол наклона прямой зависимости разведения ДНК от значения Ct.

Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих YMDD/YIDD/YVDD-мотивы в вектор pUC18. Клонирование последовательностей ДНК, кодирующих M, I и V в 204 положении обратной транскриптазы, в вектор pUC18 проводили по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII. Рестрикционную смесь очищали при помощи коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США). Для проведения реакции лигирования использовали реагенты фирмы «Fermentas» (Литва). Для трансформации плазмидами pUC18-YMDD, pUC18-YVDD и pUC18-YIDD были использованы бактериальные клетки *E. coli* штамм DH5 α , который выращивали на питательной среде LB (Luria-Bertani) с ампициллином (50 мкг/мл). Плазмидную ДНК выделяли набором QIAGEN Plasmid Kit (Qiagen, США). Полученную плазмидную ДНК секвенировали методом Сэнжера при помощи праймеров M13F и M13R.

Секвенирование. Амплификацию фрагмента генома ВГВ для определения мутаций проводили с помощью оригинальных праймеров (YMDD-F: 5'-CTCCAATCACTCACCAAC; YMDD-R: 5'-GGGTTTAAATGTATACCCA) методом, разработанным в НИИ гриппа [2]. Анализ и очистку продуктов ПЦР для секвенирования проводили электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромида этидия. ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили методом Сэнжера при помощи набора реагентов ABI prism BigDye Terminator v3.1 Kit с использованием оригинальных праймеров на приборе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Анализ последовательностей и построение выравниваний проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Результаты

Специфичность метода

Для оценки специфичности праймеров были сконструированы плазмиды pUC18 со вставкой из последовательностей ДНК, кодирующих M, I и V в 204 положении обратной транскриптазы. Наличие вставки в данных плазмидах было подтверждено секвенированием с использованием праймеров M13F и M13R. Расчет статистически достоверной разницы в среднем значении Ct для pUC-18-YMDD [разница достоверна между Pr1 и Pr2 (P = 0,0079), между Pr1 и PrC (P = 0,0079)

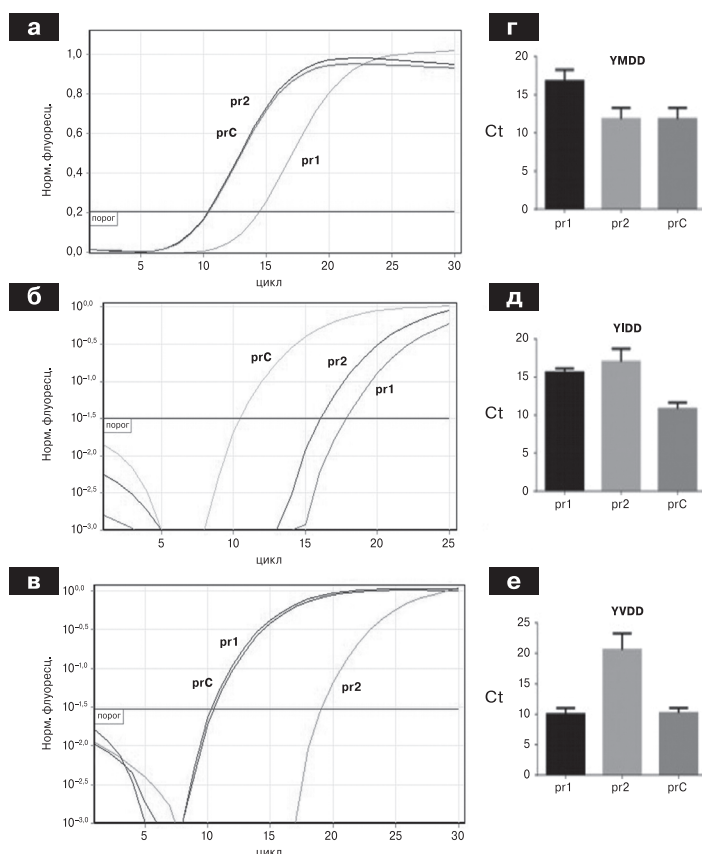


Рисунок 1. Специфичность праймеров для анализа мутаций утойчивости *rtM204I/V* и расчет статистически достоверной разницы в значении *Ct* для *pUC-18-YMDD*, *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD*

Примечание. Амплификация плазмид *pUC-18-YMDD* в концентрации 10^4 копий/мл (а), *pUC-18-YIDD* в концентрации 10^3 копий/мл (б), *pUC-18-YVDD* в концентрации 10^3 копий/мл (в). Средние значения *Ct* для *pUC-18-YMDD* (г), для *pUC-18-YIDD* (д), для *pUC-18-YVDD* (е).

и не достоверна между Pr2 и PrC ($P > 0,9999$), *pUC-18-YIDD* [разница достоверна между Pr1 и PrC ($P = 0,0079$), между Pr2 и PrC ($P = 0,0079$) и не достоверна между Pr1 и Pr2 ($P = 0,1429$)] и *pUC-18-YVDD* [разница достоверна между Pr1 и Pr2 ($P = 0,0079$), между Pr2 и PrC ($P = 0,0079$) и не достоверна между Pr1 и PrC ($P > 0,9999$)] позволил определить положительные результа-

ты ПЦР: для *pUC-18-YMDD* $\Delta Ct1 \geq 5$, $\Delta Ct2 < 5$; для *pUC-18-YIDD* $\Delta Ct1 \geq 5$, $\Delta Ct2 \geq 5$; для *pUC-18-YVDD* $\Delta Ct1 < 5$, $\Delta Ct2 \geq 5$, где $\Delta Ct1 = Ct Pr1 - Ct PrC$, $\Delta Ct2 = Ct Pr2 - Ct PrC$. Результаты представлены на рисунке 1.

Для оценки специфичности праймеров в образцах, содержащих различные варианты ВГВ, плазмиды *pUC-18-YIDD* и *pUC-18-YVDD* были смешаны с плазмидой *pUC-18-YMDD* («дикий тип») в конечной концентрации 10^5 копий/мл (табл. 2). Было показано, что праймеры, выявляющие замену *rtM204V* специфичны, если образец содержит 30 и более процентов плазмиды *pUC-18-YVDD*. В случаях, если образец содержит 10 и менее процентов плазмиды *pUC-18-YVDD* замена *rtM204V* не выявляется, а регистрируется только «дикий» тип вируса. Праймеры, выявляющие замену *rtM204I*, показали аналогичные результаты. Было показано, что в образцах, содержащих три плазмиды: 30% *pUC-18-YIDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 40% *pUC-18-YMDD*, выявлялись три варианта последовательности ВГВ (*rtM204M/I/V*) с преобладанием «мутантных» типов вируса (*rtM204I* и *rtM204V*). В образцах, содержащих 60% *pUC-18-YMDD*, 30% *pUC-18-YVDD* и 10% *pUC-18-YIDD*, регистрировались только последовательности с заменой *rtM204V*

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ В ОБРАЗЦАХ СО СМЕШАННОЙ ПОПУЛЯЦИЕЙ ВИРУСА

№	Образец	Итоговый результат
1	50% <i>pUC-18-YVDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
2	30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
3	10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
4	50% <i>pUC-18-YIDD</i> + 50% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
5	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 70% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I
6	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 90% <i>pUC-18-YMDD</i>	M
7	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 40% <i>pUC-18-YMDD</i>	V/I/M
8	10% <i>pUC-18-YIDD</i> + 30% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/V
9	30% <i>pUC-18-YIDD</i> + 10% <i>pUC-18-YVDD</i> + 60% <i>pUC-18-YMDD</i>	M/I

и «дикий» тип вируса. Аналогично, в образцах, содержащих 60% pUC-18-YMDD, 30% pUC-18-YIDD и 10% pUC-18-YVDD, выявлялись только последовательности с заменой rtM204I и «дикий» тип вируса.

Чувствительность метода

Чувствительность метода ПЦР оценивали с помощью серии разведений плазмид pUC-18-YMDD, pUC-18-YIDD и pUC-18-YVDD до конечных концентраций 1 млн, 100 тыс., 10 тыс., 1 тыс. и 100 копий/мл (пять повторов для каждого разведения). Результаты представлены на рисунках 2–4.

Расчет эффективности ПЦР

Во всех исследуемых образцах для серии разведений был рассчитан показатель эффективности ПЦР (E). Во всех случаях $E = 2$, что подтверждает специфичность данных реакций без образования побочных продуктов или димеров праймеров (рис. 2–4). Отсутствие побочных продуктов также подтверждает анализ кривых плавления для данных реакций (данные не приводятся).

Сравнение результатов ПЦР и секвенирования по Сенжеру

В сыворотке крови от пациентов первой и пятой групп вирусов, содержащих мутации устойчивости rtM204I/V к АН, выявлено не было (табл. 3). В сыворотке крови от пациентов второй группы у одного человека после 18 месяцев лечения ламивудином были выявлены вирусы с заменой в 204 положении обратной транскриптазы. Причем методом секвенирования по Сенжеру была определена только замена метионина на изолейцин, в то время как методом ПЦР в реальном времени выявлена смесь последовательностей, кодирующих как замену метионина на изолейцин, так и — на валин. Данный пациент после неэффективной терапии ламивудином получал в течение 14 месяцев телбивудин, что привело к выявлению вирусов только с заменой rtM204V обоими методами. Интересно отметить, что через месяц лечения телбивудином у этого пациента методом секвенирования обнаружена субпопуляция ВГВ с заменой rtM204V, в то время как методом ПЦР выявляли ВГВ с заменами метионина и на изолейцин, и на валин. У одного пациента после 58 месяцев лечения ТБВ была

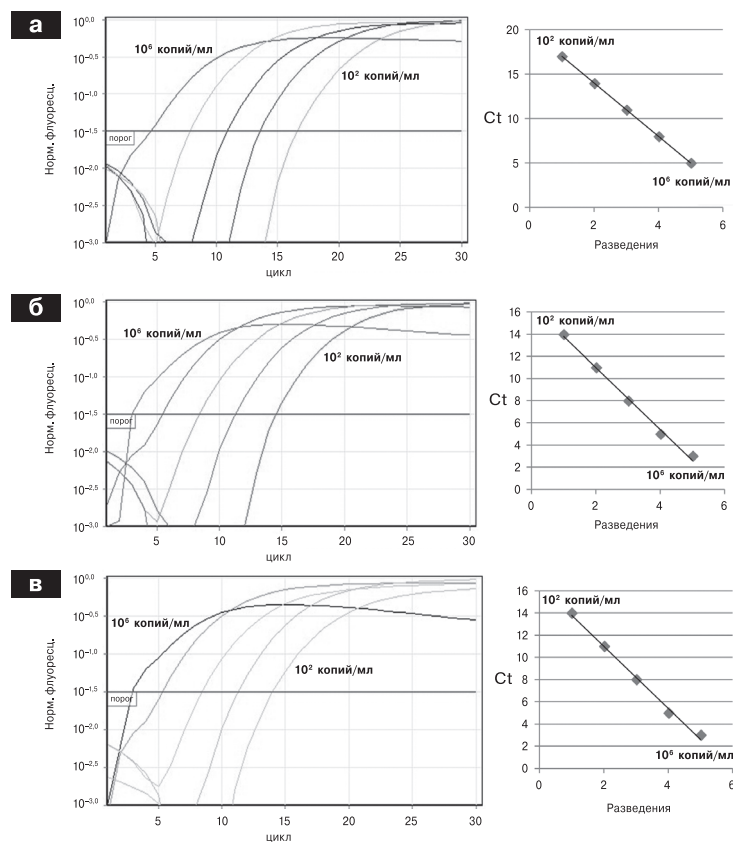


Рисунок 2. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YMDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл

Примечание. (а) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -3X + 20$. Slope = -3. $R^2 = 1$. $E = 2$.

(б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,8X + 16,6$. Slope = -2,8. $R^2 = 0,99$. $E = 2$.

(в) Амплификация с праймерами PrF и prC, стандартные кривые: $Y = -2,8X + 16,6$. Slope = -2,8. $R^2 = 0,99$. $E = 2$.

обнаружен вирус с заменой rtM204I, причем методом ПЦР кроме «мутантного» был обнаружен и «дикий» тип вируса. Еще через 7 месяцев у данного пациента обоими методами обнаруживался только «мутантный» тип вируса (rtM204I). У трех пациентов четвертой группы были выявлены вирусы, содержащие мутации устойчивости к энтекавиру (rtM204V).

Обсуждение

В последние десятилетия в России для лечения ХГВ широко применяются аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин и энтекавир). Однако длительная терапия данными препаратами в ряде случаев не была эффективна из-за возникновения мутации устойчивости rtM204I/V, которые разрушают YMDD (тирозин, метионин, аспарат, аспарат) locus в каталитическом центре гена полимеразы и создают стерические препятствия для нужного связывания с АН [3, 10]. Применение аналогов нуклеотидов (адефовир и тенофовир) у пациентов с устойчивостью к ламивудину, телбивудину и энтекавиру показало высокую эффективность [2, 9]. В связи с этим,

раннее выявление мутаций устойчивости к АН имеет большое значение для определения стратегии лечения пациентов с ХГВ.

В последние годы все больше исследований связаны с разработкой новых методов для выявления мутаций устойчивости. К наименее трудоемким, быстрым и доступным методам относятся различные варианты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [4, 13, 15]. Поэтому был разработан метод, основанный на ПЦР-РВ, для определения мутации устойчивости rtM204I/V.

Разработанный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью (1000 копий/мл) и позволяет определять различные варианты популяции ВГВ. Было показано, что данный метод выявляет «мутантные» варианты вируса, составляющие 30% и более от общей популяции ВГВ.

Общая распространенность мутаций в YMDD-мотиве полимеразы у пациентов, получавших ламивудин, составила 6%, энтекавир — 3%, телбивудин — 20%. У двух из 83 пациентов были выявлены последовательности YMDD/YIDD и у одного человека — YIDD/YVDD.

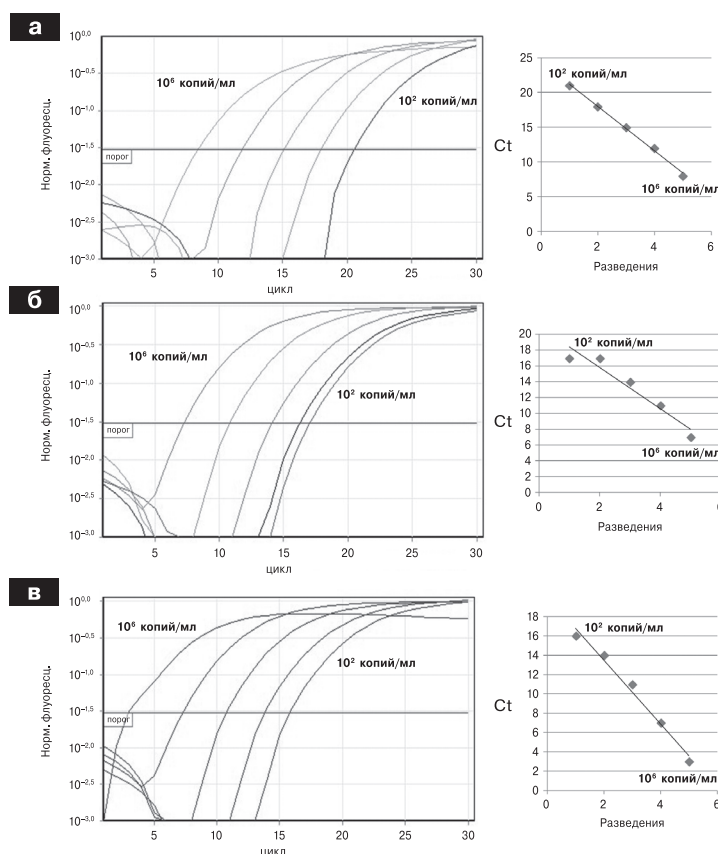


Рисунок 3. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YIDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 копий/мл

Примечание. (а) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -2,2X + 24,4$. Slope = $-3,2$. $R^2 = 0,99$. E = 2. (б) Амплификация с использованием праймеров PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 21$. Slope = $-2,6$. $R^2 = 0,93$. E = 2. (в) Амплификация с использованием праймеров PrF и prC, стандартные кривые: $Y = -3,3X + 20,1$. Slope = $-3,3$. $R^2 = 0,98$. E = 2.

Предложенный метод не позволяет дифференцировать последовательности для прямого определения rtM204I. В дальнейшем данный метод может быть модифицирован для обнаружения YIDD путем добавления праймеров в смесь-1. Преимуществом данного метода является простота анализа. Выявление последовательностей ВГВ с заменой rtM204V может быть рассчитано по разнице между Ct значения образца (Pr1) и контроля (PrC) без дополнительных количественных стандартов. Неспецифический отжиг праймеров, как рассчитано выше, исключается при значениях $\Delta Ct < 5$.

Заключение

Метод обнаружения мутаций устойчивости ВГВ rtM204I/V к АН при помощи ПЦР в реальном времени — быстрый и точный инструмент для первичного скрининга пациентов с ХГВ, не отвечающих на лечение. При сравнении разработанного метода с широко используемым секвенированием по Сенжеру, данный метод более быстрый, экономичный и способен выявлять минорные варианты популяции ВГВ.

ТАБЛИЦА 3. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ХГВ

	Замена rtM204I/V методом секвенирования по Сенжеру (n, %)	Замена rtM204I/V методом ПЦР в реальном времени (n, %)
Группа I PEG-IFN, n = 12	M (12, 100%)	M (12, 100%)
Группа II ЛАМ, n = 10	M (9, 90%)	M (9, 90%)
	I (1, 10%)	V/I (1, 10%)
Группа III ТБВ, n = 7	M (5, 72%)	M (5, 72%)
	I	I/M
	(1, 14%)	I
	(1, 14%)	(1, 14%)
Группа IV ЭНТ, n = 15	M (12, 80%)	M (12, 80%)
	V (3, 20%)	V (3, 20%)
Группа V без ПВТ, n = 3	M (3, 100%)	M (3, 100%)

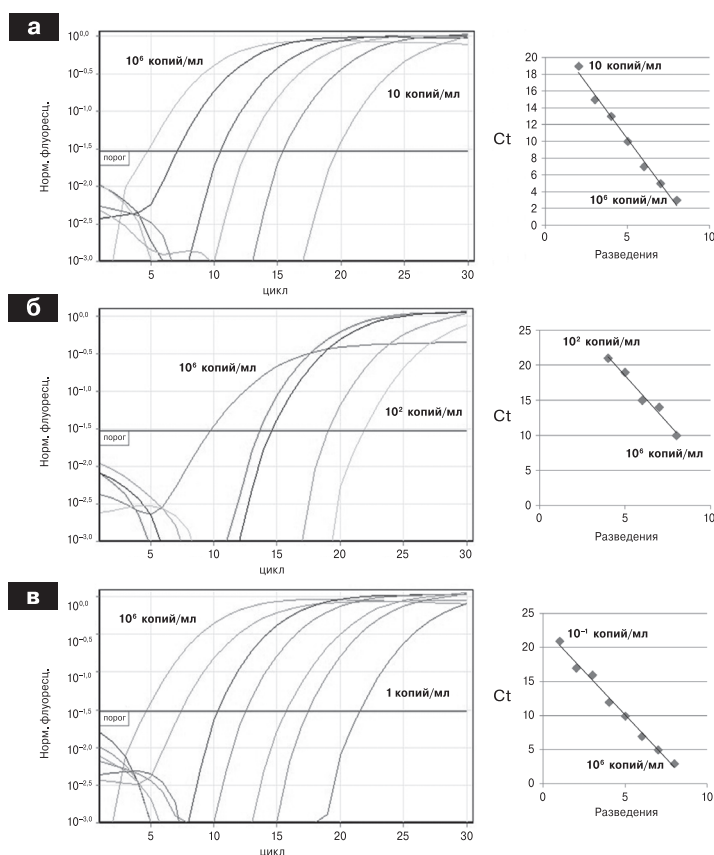


Рисунок 4. Чувствительность и анализ эффективности метода ПЦР для плазмиды pUC-18-YVDD в концентрациях 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} копий/мл

Примечание. (а) Амплификация с праймерами PrF и Pr1, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 23,5$. Slope = -2,6. $R^2 = 0,99$. E = 2.
(б) Амплификация с праймерами PrF и Pr2, стандартные кривые: $Y = -2,7X + 32$. Slope = -2,7. $R^2 = 0,97$. E = 2.
(в) Амплификация с праймерами PrF и prC, стандартные кривые: $Y = -2,6X + 22,9$. Slope = -2,6. $R^2 = 0,99$. E = 2.

Список литературы/References

1. Елпаева Е.А., Порецкова Е.А., Ковеленов А.Ю., Аликян И.С., Гальбрайт Р.Б., Грудинин М.П., Эсауленко Е.В. Генотипическая характеристика вируса гепатита В у хронически инфицированных больных // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009. № 15. С. 56–59. [Elpaeva E.A., Poretzkova E.A., Kovelenov A.Yu., Alikyan J.S., Galbraikh R.B., Grudin M.P., Esaulenko E.V. Genotypic characterization of the hepatitis B virus in chronically infected patients. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii = Far Eastern Journal of Infection Pathology*, 2009, no. 15, pp. 56–59. (In Russ.)]
2. Елпаева Е.А., Писарева М.М., Никитина О.Е., Кижло С.Н., Грудинин М.П., Дуданова О.П. Роль мутантных форм вируса гепатита В в прогрессирующем течении хронического гепатита В // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Естественные и технические науки. 2014. Т. 143, № 6. С. 41–46. [Elpaeva E.A., Pisareva M.M., Nikitina O.E., Kizhlo S.N., Grudin M.P., Dudanova O.P. The role of the mutant forms of hepatitis B virus in the progressive course of chronic hepatitis B. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye i tekhnicheskie nauki = Scientific Notes of Petrozavodsk State University. Natural and Engineering Sciences*, 2014, vol. 143, no. 6, pp. 41–46. (In Russ.)]
3. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*, 2012, vol. 61, no. 1, pp. 6–17. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302056
4. Feng Z.L., Yu X.Y., Lu Z.M., Geng D.Y., Zhang L., Chen S.J. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using AllGlo™ probes. *Clin. Chim. Acta.*, 2011, vol. 412, iss. 11–12, pp. 1018–1021. doi: 10.1016/j.cca.2011.02.012
5. Gao S. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 8, pp. 1086–1096. doi: 10.4254/wjh.v7.i8.1086
6. Hua W., Zhang G., Guo S., Li W., Sun L., Xiang G. Microarray-based genotyping and detection of drug-resistant HBV mutations from 620 Chinese patients with chronic HBV infection. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 291–295. doi: 10.1016/j.bjid.2015.03.012
7. Ko S.-Y., Oh H.-B., Park C.-W., Lee H.C., Lee J.-E. Analysis of hepatitis B virus drug-resistant mutant haplotypes by ultra-deep pyrosequencing. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 10, pp. 404–411. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03951.x
8. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, vol. 5, no. 5, pp. a021436–a021436. doi: 10.1101/cshperspect.a021436
9. Locarnini S., Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir. Ther.*, 2010, vol. 15, no. 3, pp. 451–461. doi: 10.3851/IMP1499
10. Locarnini S., Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir. Ther.*, 2010, vol. 15, no. 3, pp. 3–14. doi: 10.3851/IMP1619
11. Niesters H.G.M., Zoulim F., Pichoud C., Buti M., Shapiro F., D'Heuvaert N., Celis L., Doutreloigne J., Sablon E. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 3, pp. 1283–1289. doi: 10.1128/AAC.00970-09
12. Rybicka M., Stalke P., Dreczewski M., Smiatacz T., Bielawski K.P. High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative approach to monitoring drug resistance of hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 1, pp. 9–14. doi: 10.1128/JCM.01891-13
13. Shi M., Yang Z.J., Wang R.S., Zhang H., Zhu Y.F., Xu Y.P., Lin Q.Y., Jin L.J. Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in lamivudine treated and untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin. Chim. Acta.*, 2006, vol. 373, iss. 1–2, pp. 172–175. doi: 10.1016/j.cca.2006.05.023
14. Stuyver L.J., Locarnini S.A., Lok A., Richman D.D., Carman W.F., Dienstag J.L., Schinazi R.F. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 2001, vol. 33, no. 3, pp. 751–757. doi: 10.1053/jhep.2001.22166
15. Wang R.S., Zhang H., Zhu Y.F., Han B., Yang Z.J. Detection of YMDD mutants using universal template real-time PCR. *World J. Gastroenterol.*, 2006, vol. 12, no. 8, pp. 1308–1311. doi: 10.3748/wjg.v12.i8.1308

Авторы:

Елпаева Е.А., научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Комиссаров А.Б., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Писарева М.М., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Грудинин М.П., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной вирусологии и генной инженерии, зам. директора по науке и развитию ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Киселев О.И., академик РАН, д.б.н., профессор, директор ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Elpaeva E.A., Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Komissarov A.B., Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Pisareva M.M., PhD (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Grudin M.P., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Deputy Director for Research and Development, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Kiselev O.I., PhD, MD (Biology), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.07.2015
Отправлена на доработку 22.07.2015
Принята к печати 13.08.2015

Received 17.07.2015
Revision received 22.07.2015
Accepted 13.08.2015