

Разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

О. Н. Жигалева¹, С. Г. Марданлы^{1,2}, Т. Ю. Гашенко^{1,2}, И. И. Ермолаев^{*1,2}

¹ ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск

² ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», г. Орехово-Зуево

Резюме

Актуальность. Гепатит В (ГВ) является одной из наиболее распространенных вирусных инфекций, поражающих людей во всем мире. ГВ может привести к хроническому гепатиту, циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме. В настоящее время 3% населения мира инфицированы вирусом гепатита В (ВГВ) и подвержены риску развития опасных для жизни заболеваний печени. На сегодняшний день в лабораторной диагностике обнаружения ВГВ используют иммунологические и молекулярно-биологические методы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на сегодняшний день является высокочувствительным методом для обнаружения и количественной оценки содержания вируса гепатита В в организме человека. Количественное определение ДНК ВГВ необходимо для мониторинга эффективности противовирусного лечения инфекции. **Цель.** Разработать набор ПЦР в режиме реального времени для количественного определения ДНК ВГВ. **Материалы и методы.** В разработке использовано 200 образцов плазмы и сыворотки крови с положительным и отрицательным результатом на ВГВ. Сравнение разрабатываемого набора проводилось с использованием других коммерческих зарегистрированных на территории России наборов по диагностике вируса гепатита В. Дополнительно произведен анализ нуклеотидных последовательностей всех существующих генотипов вируса для подбора праймеров по системе GeneBank. **Результаты и обсуждение.** Анализ результатов диагностической чувствительности разрабатываемого набора составляет 100%, специфичность – 100%. Разработанные праймеры были специфично подобраны в области гена POL. Набор способен выявлять все виды генотипов вируса. **Выводы.** Разработанный набор реагентов позволяет проводить выявление вируса гепатита В и определять его количество в течение 70 мин. Помимо большого количества генотипов и субгенотипов, вирус характеризуется мутационными изменениями в геноме, что затрудняет его диагностику и, как следствие, проведение адекватной лекарственной терапии. В разработке были учтены консервативные области генома вируса для подбора праймеров и зондов, полученные последовательности применимы ко всем генотипам ВГВ. Набор реагентов разработан для мониторинга ВГВ-инфицированных пациентов и вирусной нагрузки во время проводимого лечения.

Ключевые слова: вирус гепатита В (ВГВ), полимеразная цепная реакция, положительный контрольный образец, внутренний контрольный образец, праймеры, аналитическая специфичность, диагностическая чувствительность/специфичность
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Жигалева О. Н., Марданлы С. Г., Гашенко Т. Ю. и др. Разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2023;22(4):86-94. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94>

Development of a Reagent Kit for the Quantitative Determination of Hepatitis B Virus (HBV) DNA in Clinical Material by PCR with Hybridization-Fluorescence Detection

ON Zhigaleva¹, SG Mardanly^{1,2}, Tyu Gashenko^{1,2}, II Ermolaev^{*1,2}

¹ CJSC «EKOlabor», Russia

² GGTU, Russia

Abstract

Relevance. Hepatitis B virus (HBV) is one of the most common viral infections affecting people worldwide and can lead to chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Currently 3% of the world's population are infected with hepatitis B virus and are at risk of developing life-threatening liver disease. Immunological and molecular biological methods of detection of HBV are currently used in laboratory diagnostics. The polymerase chain reaction (PCR) is currently the most sensitive method for the detection and quantification of HBV. HBV DNA quantification is widely used to monitor the antiviral treatment of HBV infection. **Aim.** To develop

* Для переписки: Ермолаев Илья Игоревич, лаборант научно-производственного отделения ПЦР, ЗАО «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1. +7 (901) 595-13-82, ilermolaev962@gmail.com. ©Жигалева О. Н. и др.

**For correspondence: Ermolaev Ilya I., laboratory assistant of research and production department PCR, CJSC «EKOlabor», 1 St. Budyonnogo, Hse., Elektrogor'sk, Moscow Region, 142530, Russia. +7 (901) 595-13-82, ilermolaev962@gmail.com. ©Zhigaleva ON, et al.

a real-time PCR kit for the quantification of HBV DNA. **Materials and methods.** A total of 200 plasma and serum samples positive and negative for HBV were used in the development. The performance of the developed kit was compared with the use of other commercially registered HBV diagnostic kits in Russia. Additionally, the nucleotide sequences of all existing virus genotypes analysed for the selection of primers using GeneBank system. **Results and discussion.** Comparison analysis of the results of quantitative determination by real-time PCR in 200 clinical serum and blood plasma samples showed that the diagnostic sensitivity of the developed kit was 100% and specificity 100%. The primers developed specific to the POL gene region. The kit is capable of detecting all types of virus genotypes. **Conclusions.** The developed reagent kit allows detection of hepatitis B virus and determination of its quantity within 70 minutes. In addition to a large number of genotypes and subgenotypes, the virus is characterized by mutational changes in the genome, which complicates its diagnosis and, as a consequence, the ongoing therapy with drugs. Conservative regions for primer and probe selection taken into account in the development, and the sequencing results obtained are applicable to all HBV genotypes. The reagent kit is designed to monitor HBV infected patients and will allow the analysis of different HBV viral loads.

Keywords: hepatitis B virus (HBV), polymerase chain reaction, positive control sample, internal control sample, primers, analytical specificity, diagnostic sensitivity/specificity.

No conflict of interest to declare.

For citation: Zhigaleva ON, Mardanly SG, Gashenko TYu, et al. Development of a reagent kit for the quantitative determination of Hepatitis B Virus DNA in clinical material by PCR with hybridization-fluorescence detection. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(4):86-94 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94>

Введение

Гепатит В – вирусное заболевание, вызываемое возбудителем с выраженными гепатотропными свойствами – вирус гепатита В (ВГВ, HBV) из семейства гепаднавирусов. ВГВ является основной причиной развития острого гепатита и хронической вирусной инфекции и считается одним из самых распространенных в мире. По оценке Всемирной организации здравоохранения, в 2015 г. от последствий хронического гепатита В умерло 887 000 человек [1].

Вирус гепатита В представляет собой небольшой ДНК-содержащий вирус семейства *Hepadnaviridae* [2,3]. Внешняя липидная оболочка вируса содержит три поверхностных антигена: большой (L), средний (M) и малый (S), которые покрывают вирусный капсид, так называемую частицу Дейна. Нуклеокапсид образован 240 вирусными капсидными белками диаметром 27 нм, имеет икосаэдрическую структуру и содержит геном ВГВ длиной 3,2 килобазы (кб) в виде релаксированной кольцевой ДНК (кДНК) и частично двуцепочечной молекулы циркулярной ДНК (ркДНК) [4–6]. Некоторые клеточные белки, включая протеинкиназы, также упакованы в структуру нуклеокапсида [7,8]. Одной из уникальных характеристик генома ВГВ является асимметричная структура двух цепей. Отрицательная цепь длиннее положительной на 1/3. Длинная минус-цепь связана с ДНК-полимеразой, которая достраивает плюс-цепь до полноценной структуры. Вирусный геном содержит перекрывающиеся и открытые рамки считывания (ORF) для генов S, С, Р и Х, кодирующих четыре различных белка. PreS1/PreS2 и S ген (кодирует 3 оболочечных белка, а именно L-, M- и S), ген Precore/core (кодирует нуклеокапсидный белок; HBcAg и неструктурно секретируемого белка; HBeAg), ген полимеразы (обратная транскриптаза, РНКазы Н и терминальные белковые домены), ген Х (кодирует малый регуляторный Х-белок) [9,10]. В дополнение к инфекционной вирусной частице

(то есть ДНК-содержащему вириону или полному вириону) инфицированные гепатоциты также продуцируют пустые вирионы, состоящие из поверхностных антигенов и капсида. Родственные вирусы были обнаружены у сурков, сусликов, древесных белок, пекинских уток и цапель. Филогенетический анализ на основе сравнения последовательностей ВГВ цепей геномов позволил выделить десять генетических групп, обозначенных латинскими буквами от А до J [11]. Каждый генотип имеет свое географическое распространение [12].

Для подтверждения инфицирования ВГВ и уточнения периода заболевания определяют антигены вируса, антитела к ним и ДНК вируса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью и качественно или количественно определяет ДНК вируса. Благодаря качественному методу подтверждается присутствие вируса ВГВ в организме и его активное размножение. Количественное определение вирусной нагрузки позволяет оценить интенсивность развития болезни, эффективность проводимой терапии, выявить развитие устойчивости к противовирусным препаратам.

Цель исследования – разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса ВГВ методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

При разработке набора было использовано 200 образцов сыворотки и плазмы крови, полученных от пациентов, инфицированных ВГВ. Образцы были предоставлены ООО «Независимая лаборатория «Инвитро»» (Москва). Образцы плазмы и сыворотки крови от пациентов хранились при температуре –20 °С. Все образцы, полученные для лабораторного исследования, считаются потенциально инфицированными и при работе с ними учитывались требования СанПин 3.3686-21,

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

СанПиН 2.1.3684-21 и методические указания МУ 1.3.2569-09.

Для разработки набора были использованы следующие реагенты:

- Буфер ПЦР – 100 mM Трис-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 0,4 mM каждого нуклеозидтрифосфата, 10 mM MgCl₂, 0,1 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК полимеразы, 0,025% Tween 20, стабилизаторы Taq ДНК-полимеразы, 50 ед. ревертазы.
- Смесь генспецифичных олигонуклеотидных праймеров, 25 пмоль/мкл, в деионизированной воде (ЗАО «ЭКОлаб», Россия).
- Внутренний контрольный образец (ВКО) – олигонуклеотид модифицированный в деионизированной воде (ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

ДНК ВГВ была выделена из образцов сыворотки и плазмы крови с использованием коммерческого набора «КовидЭК Экстракт» по инструкции производителя (РУ № РЗН 2022/18013 от 17.08.2022, ЗАО «ЭКОлаб», Россия) [13].

Праймеры для ПЦР были разработаны на основе выравнивания полных геномов ВГВ из GeneBank. В разработке праймеров и зондов Taqman были проанализированы генотип-специфические нуклеотидные последовательности, консервативные в каждом из десяти генотипов ВГВ с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Анализ проводился с использованием биотехнологических программ с последующим выравниванием вручную. Выбранные последовательности праймеров были дополнительно проанализированы с помощью программы Oligo Calc (калькулятор свойств олигонуклеотидов, позволяющий получить пары праймеров с одинаковой температурой плавления). Специфичность выбранных олигонуклеотидов была изучена с помощью компьютерной программы BLAST online [14].

Аmplification, детекцию и обработку результатов проводили с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель «Био-Рад Лабораториз, Инк.» (США).

Оценка аналитической надежности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия Стьюдента. Для оценки взаимосвязи показателей использовался корреляционный анализ Пирсона с вероятностной оценкой статистической зависимости 0,95.

Результаты и обсуждение

Разработан набор реагентов «ГепаЭК В-q» для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

Определение уровня концентрации ДНК ВГВ необходимо проводить еще до начала приема

терапевтических препаратов. Чувствительность обнаружения ДНК ВГВ существенно зависит от количества взятого для анализа образца. При разработке набора образцы плазмы крови и сыворотки крови в объеме, соответствующем 250 мкл, помещались в чистые эппендорфы, в дальнейшем проводился этап выделения.

Метод исследования состоит из нескольких этапов: выделение ДНК ВГВ и ПЦР-амплификации с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

Принцип метода основан на экстракции ДНК из плазмы крови совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО), проведении амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой Taq-полимеразой полинуклеотидных цепей с этих праймеров. В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта амплификации ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (следовательно и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации [15].

Праймеры и последовательность зондов была выбрана для гена (POL) ВГВ после анализа нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank на различные гены ВГВ. Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких как процент гуанина и цитозина (GC%), температура плавления (T_m), длина праймера и их взаимосвязи между собой. Последовательность праймеров на ген ВГВ и ген β-глобулина человека приведена в таблице 1.

Реакционная смесь (Master-Mix) была приготовлена путем смешивания в эппендорфе объемом 1,5–2 мл следующих реактивов по формуле:

$$10*(N+1) \text{ мкл реакционной смеси} + \\ 10*(N+1) \text{ мкл олигонуклеотидов,}$$

где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Допускается округление значений в большую сторону.

Эффективность пробоподготовки оценивалась путем внесения в каждую пробу 10 мкл ВКО, который проходил все этапы выделения вместе с образцом.

Далее приготовленный «Master-Mix» путем 5-кратного переворачивания осаждался кратковременным центрифугированием и вносился по 20 мкл

Таблица 1. Последовательности праймеров
Table 1. Primer sequences

Мишень Target	Ген Gene	Последовательность (5'–3') Sequence (5'–3')	Ориентация праймера Primer orientation	Длина Length	ГЦ-состав (гуанин- цитозинный состав), % GC-content (guanine-cytosine content), %
ВГВ	POL	CTCGCAGAGATT- GACGTGATGT	Прямой Forward	22	50
		GATCCTATGAAT- CCTGATGTTG	Обратный Reverse	22	40,9
		TCGTCTAAC- AGTCAGT	Флуоресцирующий зонд Fluorescent probe	16	43,75
<i>Homo sapiens</i>	β-глобулин β-globulin	ACTGAGTGCG- TCATCAG	Прямой Forward	17	52,94
		CTGATTGTCAC- GTACACTGTAGC	Обратный Reverse	23	47,82
		TGCACCACCAT- GTCAGATC	Флуоресцирующий зонд Fluorescent probe	19	52,63

в пробирки (допускается использование луночного планшета) для проведения ПЦР. Использовался наконечник с фильтром (PCR clean), с помощью которого в подготовленные пробирки добавлялось по 15 мкл ДНК исследуемых образцов.

Программа проведения амплификации адаптирована и является единой для амплификаторов планшетного и роторного типов, приведена в таблице 2.

Результаты детекции стандартов ПКО, ПКО2 и ВКО, используемых для количественного анализа, показаны на рис. 1, 2, где на рис. 1. по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс – количество циклов. На рис. 2 показаны кривые стандартов и ВКО, где по оси ординат обозначена средняя концентрация в дублях (Cq), по оси абсцисс значение логарифма концентрации (Log Starting Quantity).

Результаты количественного обнаружения ВГВ и ВКО показаны на рис. 3, где по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс – количество циклов.

Стандартная кривая на рис. 1 состоит из 2 стандартов с разной вирусной нагрузкой. Значения

ПКО, ПКО2 и ВКО используются для количественного расчета содержания ДНК ВГВ. Концентрация стандарта ПКО составляет 10⁶ МЕ/мл, для ПКО2 – 10³ МЕ/мл.

По каналу, соответствующему флуорофору FAM/Green, детектируется продукт амплификации ВКО, который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. По каналу, соответствующему флуорофору HEX/VIC/Yellow, детектируется продукт амплификации ДНК ВГВ. Положительные контрольные образцы ПКО и ПКО2 детектируются по двум каналам: FAM/Green (ВКО) и HEX/VIC/Yellow (ВГВ).

Для интерпретации результатов на графиках выбиралась логарифмическая шкала и визуально контролировалось пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. Пороговая линия перемещалась вручную до необходимого уровня при ее пересечении с кривой амплификации не в линейном участке.

ПЦР-исследование валидно, контрольные точки анализа соответствуют значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 2. Программа амплификации
Table 2. Amplification program

Этап Step	Температура Temperature	Время Time	Число повторов Cycles
1	95 °C	3 минуты 3 minutes	1
2	95 °C	15 секунд 15 seconds	40
3	59 °C	60 секунд 60 seconds	

Рисунок 1. Результаты детекции ПКО, ПКО2 + ВКО. Ромбовидные кривые – выявление ПКО, кривые с крестом – выявление ПКО2, прямые кривые – выявление ВКО

Figure 1. Results of detection PCS, PCS2 + ICS. Diamond curves – PCS detection, curves with a cross - PCS2 detection, straight curves – ICS detection

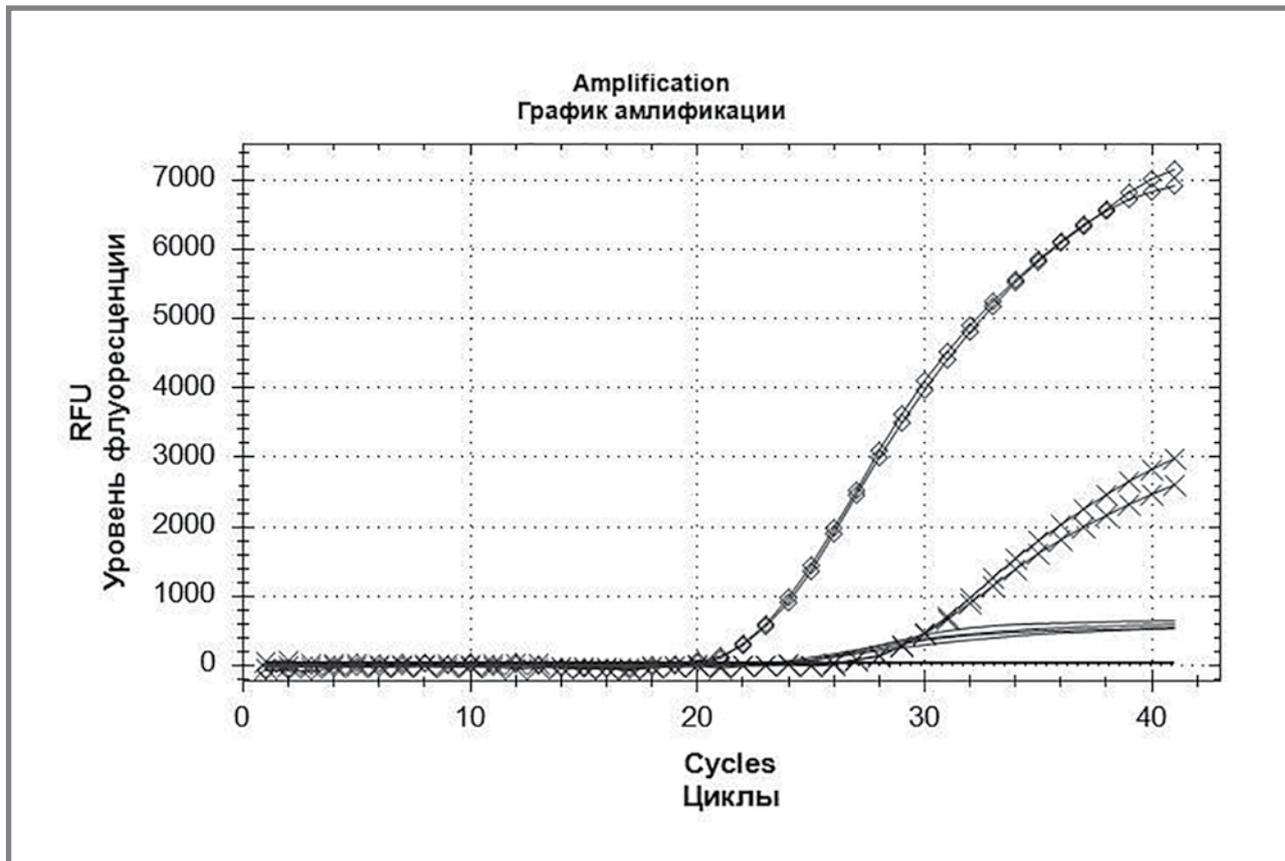


Рисунок 2. Кривая стандартов ПКО, ПКО2 и ВКО. 1 – ПКО, 2 – ПКО2, 3 – ВКО

Figure 2. The curve of the standards of PCS, PCS2 and ICS. 1 – PCS, 2 – PCS2, 3 – ICS

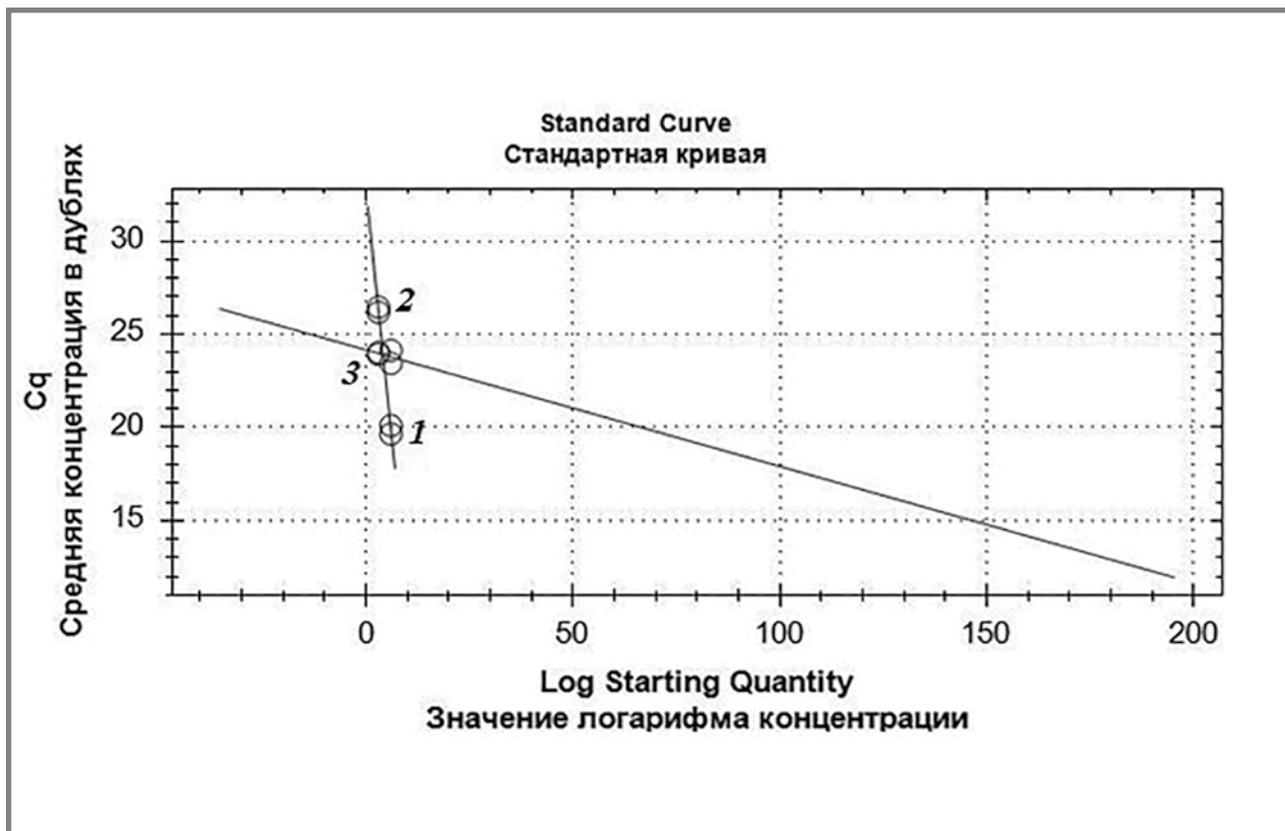


Рисунок 3. Результаты детекции ВГВ + ВКО. Кривые с кружком - выявляемый ВГВ, прямые линии – выявление ВКО

Figure 3. Results of detection HBV + ICS. Curves with a circle – HBV detection, straight lines are ICS detection

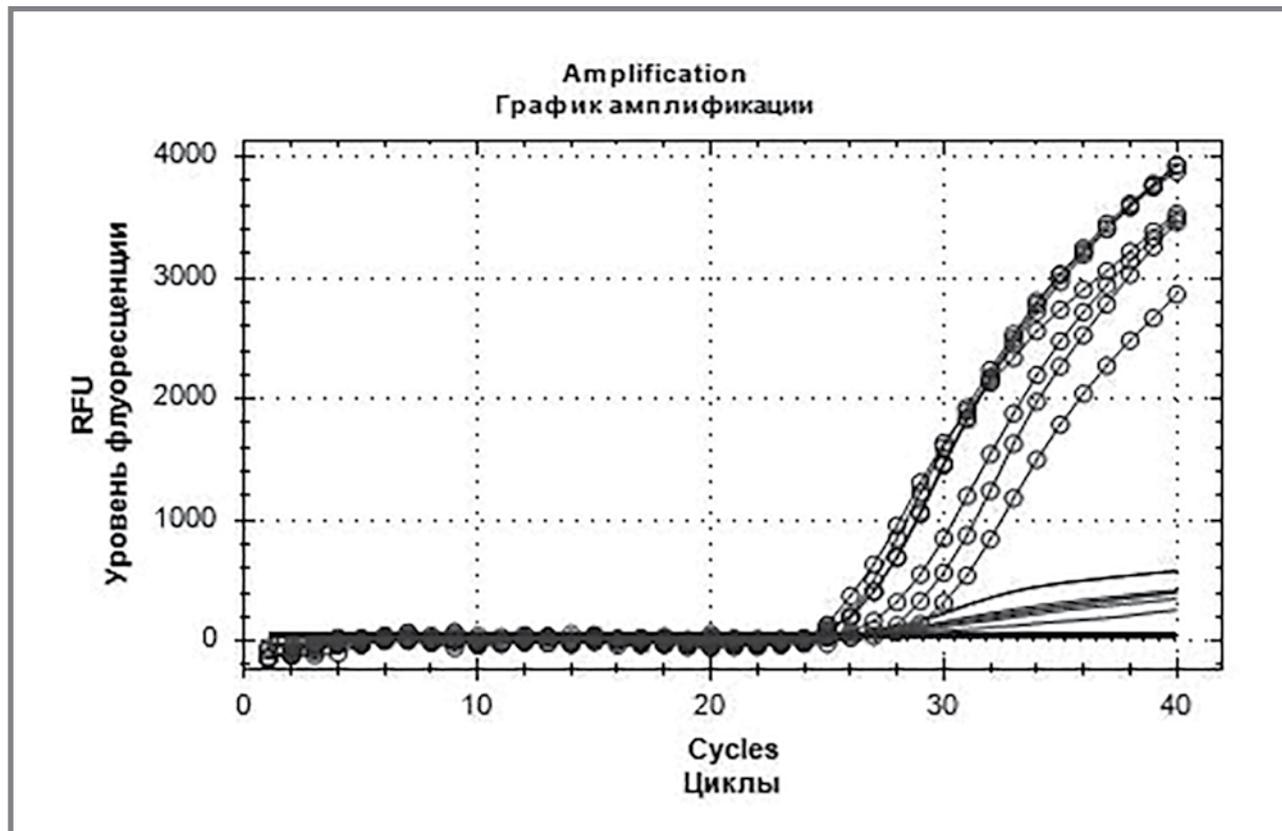


Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек
Table 3. Evaluating the results of a benchmark analysis

Контрольная точка Control point	Контролируемый этап анализа Controlled analysis phase	Значение «Ct» по каналу FAM/Green Ct value by channel FAM/Green	Значение «Ct» по каналу HEX/Yellow Ct value by channel HEX/Yellow
ОКО (отрицательный контрольный образец) NCS (negative control sample)	ПЦР PCR	Не детектируется Not detected	Не детектируется Not detected
ПКО (положительный контрольный образец), ПКО2 (положительный контрольный образец 2) PCS (positive control sample), PCS2 (positive control sample 2)	ПЦР PCR	≤ 35	≤ 35
ОКЭ (отрицательный контроль экстракции) NCE (negative extraction control)	ПЦР PCR	Не детектируется Not detected	Не детектируется Not detected

Количественный учет концентрации ДНК ВГВ проводился в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения (ПО), разработанного на основе Microsoft Excel.

Определение характеристик набора

Предел обнаружения ДНК вируса гепатита В человека с использованием «КОЧ ГепаВ-q» составил 5 МЕ/мл в реакции ПЦР.

Аналитическая специфичность набора реагентов была проверена на образцах, в которых не было ДНК ВГВ, но содержались НК вирусов гепатита С, А, цитомегаловируса, вирусов Эпштейна-Барр, ветряной оспы, вируса герпеса человека 6 типа и ДНК человека, неспецифических реакций выявлено не было. Результат по данному показателю достигал 100%.

Диагностическая чувствительность выявления, проверенная на 100 положительных образцах,

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

составляет 100%. Диагностическая специфичность выявления, проверенная на 100 отрицательных образцах, составила 100% [16].

Определение коэффициента вариации в 10 повторках проводилось путем тестирования искусственного специфического фрагмента ДНК ВГВ, внесенного в отрицательные образцы клинического материала, не содержащего ДНК вирус гепатита В.

Значение коэффициента вариации (К.В.), в процентах, рассчитывалось по формуле:

$$K.B. = \frac{100}{\bar{C}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}}$$

где: \bar{C} – средняя арифметическая величина концентрации ДНК гепатита В в МЕ/мл;
 C_i – концентрация ДНК гепатита В для каждого отдельного определения в МЕ/мл;
 n – число определений.

Значение коэффициента вариации не превышало 6%.

Разброс результатов (P_1, P_2, P_3) при параллельных определениях одного образца в процентах, рассчитывается по формуле:

$$P_1 = \frac{\bar{C}_1 - \bar{C}_2}{\bar{C}_1} \times 100 \text{ – для наборов № 1 – № 2;}$$

$$P_2 = \frac{\bar{C}_2 - \bar{C}_3}{\bar{C}_2} \times 100 \text{ – для наборов № 2 – № 3;}$$

$$P_3 = \frac{\bar{C}_3 - \bar{C}_1}{\bar{C}_3} \times 100 \text{ – для наборов № 1 – № 3.}$$

где \bar{C}_1, \bar{C}_2 и \bar{C}_3 , – средние арифметические величины концентрации ДНК гепатита В (МЕ/мл), полученные при использовании наборов № 1–3 соответственно.

Для удобства использования в лабораториях с различным оснащением разрабатываемый набор был адаптирован для работы на зарегистрированных в Российской Федерации амплификаторах планшетного и роторного типов: «CFX96» («Bio-Rad Laboratories Inc.»); Applied Biosystems QuantStudio 5 («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.»); Rotor-Gene Q («Qiagen»).

Заключение

Разработанный набор реагентов для количественного определения ДНК ВГВ на основе метода ПЦР является надежным, высокочувствительным, доступным. Метод может быть использован для сверхчувствительного определения ВГВ в сыворотке и плазме крови, а также как мощный инструмент для достижения оптимального мониторинга проводимой антивирусной терапии и своевременного начала лечения.

Новый разработанный набор после прохождения процедуры государственной регистрации медицинского изделия может быть рекомендован для количественного определения ДНК ВГВ.

Литература

1. *Genatim В.* Всемирная Организация здравоохранения. Доступно на: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Ссылка активна на 24 мая 2023.
2. Вилисова А. Н. Разработка набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита методом полимеразной цепной реакцией. Медицина и фармация, прошлое, настоящее, будущее: IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной Году педагога и наставника; 21 Апреля 2023; Орехово-Зуево, Россия. РИО ПТУ; 2023. С. 43-47
3. Ganem D., Prince A. M. Hepatitis B Virus Infection – Natural History and Clinical Consequences. *New England Journal of Medicine*. 2004; Vol. 350, №11. P. 1118–1129.
4. Hu J., Seeger C. Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015; Vol. 5, №7. P. 1–16.
5. Venkatakrishnan B., Zlotnick A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual review of virology*. 2016; Vol. 3, №1. P. 429–451.
6. Hui L., Junjun C., Usha V., et al. Amino acid residues at core protein dimer-dimer interface modulate multiple steps of hepatitis B virus replication and HBeAg biogenesis. *PLoS Pathog.* 2021; Vol. 17, №11. P. 1–34.
7. Eren E., Watts N. R., Dearborn A. D., et al. Structures of Hepatitis B Virus Core- and e-Antigen Immune Complexes Suggest Multi-point Inhibition. *Structure*. 2018; Vol. 26, №10. P. 1314–1326.
8. Selzer L., Zlotnick A. Assembly and Release of Hepatitis B Virus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015; Vol.5, №12. P. 1–17.
9. Teng C-F., Wu H-C., Su I-J., et al. Hepatitis B Virus Pre-S Mutants as Biomarkers and Targets for the Development and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Viruses*. 2020; Vol. 12, №9. P. 1–13.
10. Mendenhall M.A., Hong X., Hu J. Hepatitis B Virus Capsid: The Core in Productive Entry and Covalently Closed Circular DNA Formation. *Viruses*. 2023; Vol.15, №3. P. 1–11.
11. Острый Генатим В (ГВ) у взрослых. Рубрикатор клинических рекомендаций. Доступно на: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1. Ссылка активна на 24 мая 2023.
12. Зайцев И.А., Новак И.Н., Зайцева О.Е. и др. Значение генотипов вируса гепатита В в клинической практике. *Актуальная инфектология*. 2019. Т. 7, №2. С. 63–70.
13. ЗАО «ЭКОлаб». Отделение ПЦР-диагностики - КовидЭК Экстракт. Доступно по: <https://ekolab.ru/catalog/laboratomaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/>. Ссылка активна на 24 мая 2023.
14. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information. Доступно на: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Ссылка активна на 24 мая 2023.
15. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., и др. Разработка набора реагентов для качественного выявления РНК вируса гепатита С в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; Т. 68, №7. С. 437-442.
16. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., и др. Разработка набора реагентов для качественного выявления ДНК Вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; в печати.

References

1. Hepatitis B. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Accessed: 24 May 2023 (In Russ).
2. Vilisova A.N. Development of a kit of reagents for detection and quantitative determination of hepatitis virus DNA by polymerase chain reaction. *Medicine and pharmacy, past, present, future: IV All-Russian scientific-practical conference with international participation, devoted to the Year of teacher and mentor*; 21 Apr 2023; Orekhovo-Zuyevo, Russia. EPD GGTU; 2023. P. 43-47. (In Russ).
3. Ganem D., Prince A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(11):1118–1129. doi: 10.1056/nejmra031087
4. Hu J., Seeger C. Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015(7):1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a021386
5. Venkatakrishnan B., Zlotnick A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual review of virology*. 2016;3(1):429–451. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042238
6. Hui L., Junjun C., Usha V., et al. Amino acid residues at core protein dimer-dimer interface modulate multiple steps of hepatitis B virus replication and HBeAg biogenesis. *PLoS Pathog*. 2021;17(11):1–34. doi: 10.1371/journal.ppat.1010057
7. Eren E., Watts N. R., Dearborn A. D., et al. Structures of Hepatitis B Virus Core- and e-Antigen Immune Complexes Suggest Multi-point Inhibition. *Structure*. 2018;26(10):1314–1326. doi: 10.1016/j.str.2018.06.012
8. Selzer L., Zlotnick A. Assembly and Release of Hepatitis B Virus. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(12):1–17. doi: 10.1101/cshperspect.a021394
9. Teng C-F, Wu H-C, Su I-J, Jeng L-B. Hepatitis B Virus Pre-S Mutants as Biomarkers and Targets for the Development and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Viruses*. 2020;12(9):1–13. doi: 10.3390/v12090945
10. Mendenhall M.A., Hong X., Hu J. Hepatitis B Virus Capsid: The Core in Productive Entry and Covalently Closed Circular DNA Formation. *Viruses*. 2023;15(3):1–11. doi: 10.3390/v15030642
11. Acute hepatitis B (HB) in adults [Internet]. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1. Accessed: 24 May 2023 (In Russ).
12. Zaitsev IA., Novak IM., Zaitseva OYe., et al. Significance of hepatitis B virus genotypes in clinical practice. *Current Infectiology*. 2019;7(2):63–70. (In Russ). doi: 10.22141/2312-413x.7.2.2019.161150
13. CJSC «EKOlab». PCR diagnostic department – CovidEK Extract. Available at: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-dagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/>. Accessed: 24 May 2023 (In Russ).
14. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed: 24 May 2023.
15. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., et al. 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: 10.51620/0869-2084-2023-68-7-437-442.
16. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., et al. Development of a reagent kit for qualitative detection of Hepatitis B virus (HBV) DNA in clinical material by real-time PCR with hybridization-fluorescence detection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; in press.

Об авторах

- **Ольга Николаевна Жигалева** – руководитель научно-производственного отделения ПЦР, ЗАО «ЭКОлаб». +7 (916) 238-07-98, jigon@mail.ru. ORCID 0000-0002-5003-1089.
- **Сейфаддин Гашимович Марданлы** – директор по науке, ЗАО «ЭКОлаб». +7 (909) 992-14-94, ekolab-president@mail.ru. ORCID 0000-0003-3650-2363.
- **Татьяна Юрьевна Гашенко** – генеральный директор, ЗАО «ЭКОлаб». +7 (967) 104-44-73, tugashenko@yandex.ru. ORCID 0000-0001-6768-2251.
- **Илья Игоревич Ермолаев** – лаборант, ЗАО «ЭКОлаб». +7 (901) 595-13-82, iltermolaev962@gmail.com. ORCID 0000-0003-0982-3970.

Поступила: 31.05.2023. Принята к печати: 14.07.2023.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Ol'ga N. Zhigaleva** – head of research and production department PCR, CJSC «EKOlab». +7 (916) 238-07-98, jigon@mail.ru. ORCID 0000-0002-5003-1089.
- **Seyfaddin G. Mardanly** – head of science, CJSC «EKOlab». +7 (909) 992-14-94, ekolab-president@mail.ru. ORCID 0000-0003-3650-2363.
- **Tat'yana Yu. Gashenko** – general director, CJSC «EKOlab». +7 (967) 104-44-73, tugashenko@yandex.ru. ORCID 0000-0001-6768-2251.
- **Il'ya I. Ermolaev** – laboratory assistant, CJSC «EKOlab». +7 (901) 595-13-82, iltermolaev962@gmail.com. ORCID 0000-0003-0982-3970.

Received: 31.05.2023. Accepted: 14.07.2023.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.