

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 616.579.61.

©Коллектив авторов

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С.

*Е.Н. Ильина¹, М.В. Малахова¹, Э.В. Генерозов¹, В.М. Говорун^{1,2}, А.И. Арчаков²,
В.И. Покровский³*

¹НИИ физико-химической медицины Рос Здрава, 119992, Россия, Москва,
ул. Малая Пироговская, 1а, тел.: (095) 2454236, эл. почта: elena.ilina@lytech.ru.

²ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119832, Россия, Москва, ул. Погодинская, 10.

³ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ,
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а.

Определение генотипа вируса гепатита С (ВГС) давно стало рутинной процедурой при лабораторной диагностики ВГС инфекции. Установление генотипа ВГС позволяет прогнозировать течение заболевания и назначить адекватный курс противовирусной терапии. В настоящее время на основании особенностей нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой области вирусного генома выявлены 11 основных генотипов и более 70 подтипов ВГС. В России наиболее распространены генотипы вируса 1а, 1в, 2а, 3а, более редко встречаются 4 и 5 типы. Хотя "золотым стандартом" генотипирования является определение нуклеотидной последовательности, разработаны разнообразные тесты, включая гибридизацию с типоспецифичными зондами и типоспецифичную амплификацию, позволяющие проводить типирование ВГС более быстро и дешево. Тем не менее, все эти методы позволяют выявлять типоспецифичные контексты с определенной степенью достоверности и уступают по точности прямому определению нуклеотидной последовательности интересующих локусов вирусной РНК. Для типирования ВГС нами реализован принцип детекции типоспецифичных точечных мутаций в 5'-нетранслируемой области вирусного генома с использованием технологии минисеквенирования и определения молекулярных масс продуктов реакции на MALDI-TOF масс-спектрометре Reflex-IV ("Bruker Daltonics", Германия). Предложенный метод использован для типирования ВГС в 69 образцах, среди них 1а генотип выявлен в 4.5% случаях, 1в - 48%, 2а - 4.5%, 3а - 29%, 4 - 1.5%. В 9 (13%) образцах зарегистрирована микст-инфекция. Правильность установления генотипа с использованием технологии минисеквенирования и определения молекулярных масс продуктов реакции на времяпролетном масс-спектрометре подтверждена секвенирование анализируемого фрагмента кДНК ВГС.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотипирование, минисеквенирование, SNP, масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ. Лабораторная диагностика и мониторинг вирусных гепатитов, занимающих одно из ведущих мест в инфекционной патологии печени, представляют традиционно трудную глобальную проблему, все еще далекую от

своего решения. В современной лабораторной диагностике вируса гепатита С (ВГС) основная роль отводится выявлению серологических маркеров вируса: антител к ВГС и геномной РНК ВГС.

Особенностью существования ВГС в организме пациента является генетическая разнородность внутри популяции вируса. Сегодня по классификации Simmonds разграничивают 11 типов вируса, которые подразделяются на 70 подтипов [1]. Выявление всего многообразия генотипов вируса представляет интерес в первую очередь для эпидемиологических исследований, в клинической практике достаточно различать ВГС первых пяти типов.

Установлены существенные географические различия в распространении разных генотипов. Так, в Японии, на Тайване, частично в Китае, регистрируются преимущественно генотипы 1b, 2a, 2b. Тип 1b даже называют "японским". В Африканских государствах значительно чаще, чем в Европейских странах и Америке регистрируются редкие типы вирусов - 4, 5 и 6. В США доминирует 1a - "американский" генотип. В Европейских странах преобладает генотип ВГС 1a, в Южной Европе заметно возрастает доля генотипа 1b [2]. На территории Российской Федерации в основном представлены генотипы вируса 1b, 1a, 3a, и 2a, причем их соотношение постоянно меняется [3].

Кроме того, генотипирование ВГС имеет прогностическую ценность при мониторинге ВГС инфекции и способствует назначению адекватной противовирусной терапии. В настоящий момент показаны отличия в клинической картине заболевания у пациентов, инфицированных ВГС, принадлежащим к разным генотипам. Так, ВГС 2 или 3 типов вызывают менее тяжелое течение заболевания, как правило, более низкий уровень виремии и существенно лучше поддаются традиционной противовирусной терапии (интерферонотерапии), чем вирусы 1b или 1a генотипов [4, 5]. Обычным методологическим подходом для типирования ВГС является обнаружение характерных генетических изменений (мутаций) в консервативных областях вирусного генома - 5'-нетранслируемой, Core, NS5A областях [6-8].

При таком подходе генотипирование ВГС сводится к выявлению отдельных кластеров строго детерминированных отличий в вирусной РНК. Широкое применение для генотипирования получил анализ амплифицированных фрагментов вирусного генома методом RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК) [9], амплификации с типоспецифичными праймерами [10, 11] и обратной гибридизации с типоспецифичными зондами [12]. Последний подход был использован при создании коммерческой системы типирования ВГС "InnoLiPA" фирмы "Innogenetics". Недавно появились сообщения о выявлении, с помощью метода dHPLC тех или иных нуклеотидных отличий, характерных для определенного генотипа вируса [13]. Тем не менее, все эти методы позволяют выявлять типоспецифичные контексты с определенной степенью достоверности и уступают по точности прямому определению нуклеотидной последовательности интересующих локусов вирусной РНК.

В настоящий момент ведущими зарубежными биотехнологическими лабораториями затрачивается много усилий на разработку новых оптимальных подходов определения однонуклеотидных полиморфизмов - SNP. Одной из технологий, претендующих на роль референс-метода, является масс-спектрометрия продуктов реакции минисеквенирования, реализуемая на платформе времяпролетных масс-спектрометров MALDI-TOF [14]. Метод, основанный на селективном ферментативном дигестии олигонуклеотидных праймеров, по точности идентификации однонуклеотидного полиморфизма сопоставим с прямым определением нуклеотидной последовательности интересующих локусов, при этом является значительно более дешевым в исполнении. Существенным преимуществом этого метода является низкая стоимость расходных материалов, сопоставимая со стоимостью стандартной ПЦР-реакции. Уже сейчас в формате полностью автоматизированных систем фирмы Sequenom (США) достигнута производительность 200000 анализов в день.

В своем исследовании для типирования ВГС нами реализован принцип детекции типоспецифичных точечных мутаций в 5'-нетранслируемой области вирусного генома с использованием технологии минисеквенирования и определения молекулярных масс продуктов реакции на времяпролетном масс-спектрометре Reflex-IV (Bruker Daltonics, Германия).

МЕТОДИКА *Клинические образцы.* Материалом для исследования служили ВГС-позитивные образцы сыворотки или плазмы крови, взятые из лабораторного банка [3]. До использования все пробы хранились при температуре -110°C .

Выделение РНК ВГС, проведение полимеразной цепной реакции. Выделение РНК ВГС и амплификацию фрагментов 5'-нетранслируемой области вирусного генома проводили с использованием набора "Полигеп С" НПФ "Литех" (ТУ -9398-409-17253567-97) согласно инструкции фирмы-производителя.

Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Дефосфорилирование продуктов амплификации. Дефосфорилирование 5'-концевых фосфатных групп dNTP в прошедшей амплификацию реакционной смеси проводили в ходе инкубации с 0,5 ед щелочной фосфатазы арктических креветок (Shrimp Alkaline Phosphatase ("Fermentas", Литва)) в течение 20 минут при 37°C и последующей инактивации фермента прогреванием в течении 10 мин при 85°C .

Реакция минисеквенирования. Для идентификации типоспецифичных нуклеотидных контекстов в 5' нетранслируемой области генома ВГС использовали три олигонуклеотидных праймера: HC1 5' gggcgtgccccgc 3', HC2 5' gaggacaccggaatgc 3', HC21 5' tgagtacaccggaattgc 3'.

Реакцию термоциклического минисеквенирования проводили в реакционной смеси 66 mM трис-HCl pH 9,0; 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM dATP; 0,2 mM TTP; 0,2 mM dCTP; 0,2 mM ddGTP; по 20 пмоль каждого праймера и 2 ед TermiPol DNA Polymerase ("Solis Biodyne", Эстония), используя в качестве матрицы амплифицированные фрагменты РНК ВГС. Нарботку продуктов минисеквенирования осуществляли по профилю: 94°C - 20 сек, 58°C - 20 сек, 72°C - 15 сек, 70 циклов.

Очистка продуктов минисеквенирования. Очистку продуктов минисеквенирования проводили с помощью SpectroCLEAN Kit (Sequenom, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Входящий в состав набора сорбент в количестве 8 мг растворяли в 15 мкл ультрачистой воды (Merck, Германия), после чего полученную суспензию вносили в пробирку с продуктами реакции минисеквенирования. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Сорбент осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа.

Регистрация результатов типирования ВГС. Масс-спектры получали на приборе Reflex IV ("Bruker Daltonics", Германия) MALDI-TOF в линейном режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Hz в режиме положительных ионов. Время задержки анализатора - 200 нсек, напряжения на электроде ускорителя - 20,0 кВ, накапливающем электроде - 17,1 кВ, фокусирующей линзе - 9,4 кВ. Параметры масс-спектрометра были оптимизированы для диапазона m/z от 1000 до 10000, используя для определения калибровочных констант масс-спектры пептидов. Полученные масс-спектры олигонуклеотидов дополнительно калибровали по внутренним стандартам по известным массам. Каждый масс-спектр олигонуклеотидов получали при 30 накоплениях с постоянной мощностью лазерного излучения на уровне порогового значения для увеличения разрешения.

Аликвоту образца (0,2 - 1 мкл) с концентрацией олигонуклеотидов 10-30 пмоль/мкл, полученного после процедуры очистки, наносили на высушенную на мишени AnchorChip (400 мкм, "Bruker Daltonics") матрицу, приготовленную из

насыщенного раствора 3-гидроксипиколиновой кислоты (Fluka, Германия) в 50% ацетонитриле ("Merck") с добавлением 10 г/л цитрата аммония двухосновного ("Fluka") и высушивали на воздухе. Все использованные растворители, включая воду ("Merck"), были только аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии.

По наличию в масс-спектрах продуктов реакции ионов определенной молекулярной массы выносили суждение о присутствии в исходном образце ВГС того или иного генотипа (табл. 1).

Определение нуклеотидной последовательности. Продукты амплификации подвергали очистке на Wizard PCR Preps DNA Purification System ("Promega", США) согласно инструкции фирмы-производителя. Определение нуклеотидной последовательности фрагментов 5'-нетранслируемой области РНК ВГС проводили модифицированным методом Сенгера с использованием ABI Prism® BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit и прибора ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США; "Hitachi", Япония) в соответствии с прилагаемыми инструкциям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. По результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей амплифицируемого фрагмента 5'-нетранслируемой области вирусного генома (рис. 1) выбраны две области полиморфизма, идентификация нуклеотидных замен в которых позволяет установить принадлежность исследуемого ВГС к одному из шести наиболее часто встречающихся на территории Российской Федерации генотипов.

Для регистрации обозначенных нуклеотидных замен предложен новый, высокопроизводительный способ, включающий реакцию минисеквенирования с последующим определением продуктов реакции с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Дискриминирующая способность метода основана на селективном ферментативном достраивании олигонуклеотидных праймеров на 1, 2 или 3 нуклеотидных звена в зависимости от нуклеотидной последовательности в точке полиморфизма. Аналитические возможности используемого нами MALDI-TOF масс-спектрометра Reflex IV позволяют эффективно дискриминировать олигонуклеотиды длиной 10 - 30 нуклеотидов, отличающиеся минимум на одно нуклеотидное звено (~300 Da), что полностью удовлетворяет поставленной задаче. Исходя из проведенного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей амплифицируемых фрагментов ВГС, подобраны три олигонуклеотидных праймера (рис. 1), достраивание которых по 3' концу на несколько нуклеотидных звеньев позволяет выявлять типоспецифичные нуклеотидные контексты РНК ВГС. Ожидаемые массы продуктов реакции минисеквенирования для каждого конкретного генотипа представлены в таблице 1

Таблица. Ожидаемые массы продуктов реакции минисеквенирования в зависимости от генотипа ВГС.

Генотип ВГС	Масса продукта при достраивании праймера HC1 (4242 Da)	Масса продукта при достраивании праймера HC2 (5205 Da)	Масса продукта при достраивании праймера HC21 (5524 Da)
1a	5198 Da (+dAAG)	*5205 Da	6456 Da (+dCAG)
1в	4571 Da (+ddG)	*5205 Da	6456 Da (+dCAG)
2a	5198 Da (+dAAG)	*5205 Da	6142 Da (+dCG)
3a	4571 Da (+ddG)	5838 Da (+dTG)	*5524 Da
4	5198 Da (+dAAG)	5823 Da (+dCG)	*5524 Da
5	4571 Da (+ddG)	*5205 Da	6142 Da (+dCG)

Примечание: * - с данным зондом ферментативного достраивания нет

Для установления генотипа ВГС оптимизированы условия проведения мультипраймерной реакции минисеквенирования, в ходе которой идет

	1					60
1a	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	CA ggacgacc	gggtcctttc
1b	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	CA ggacgacc	gggtcctttc
2a	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	CG ggaagact	gggtcctttc
3a	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	TG gggtgacc	gggtcctttc
4	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	CG gatgacc	gggtcctttc
5	ccatagtggt	ctgcggaacc	ggtgagtaca	<u>ccggaattgc</u>	CG gatgacc	gggtcctttc
						120
1a	ttggataaac	ccgctcaatg	cctggagatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcA agac	tgctagccga
1b	ttggatcaac	ccgctcaatg	cctggagatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcG agac	tgctagccga
2a	ttggataaac	ccactctatg	cccggccatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcA agac	tgctagccga
3a	ttggagcaac	ccgctcaata	cccagaaatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcG agat	cactagccga
4	ttggattaac	ccgctcaatg	cccggaaatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcA agac	tgctagccga
5	ttggataaac	ccgctcaatg	cccggagatt	<u>tgggcgtgcc</u>	cccgcG agac	tgctagccga
						164
1a	gtagtgttgg	gtcgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	
1b	gtagtgttgg	gtcgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	
2a	gtagcgttgg	gttgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	
3a	gtagtgttgg	gtcgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	
4	gtagtgttgg	gtcgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	
5	gtagtgttgg	gtcgcgaaag	gccttggtgt	actgcctgat	aggg	

Рисунок 1.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов 5'-нетранслируемой области РНК ВГС, относящихся к разным генотипам. Выделены курсивом и подчеркнуты места посадки олигонуклеотидных праймеров, участвующих в реакции минисеквенирования. Точки нуклеотидного полиморфизма обозначены жирными прописными буквами.

одновременная достройка 3-х олигонуклеотидных зондов по двум сайтам нуклеотидного полиморфизма, идентификация нуклеотидных контекстов в которых позволяет однозначно установить генотип вируса. Варианты масс-спектров продуктов реакции для каждого конкретного генотипа представлены на рисунке 2. Как видно из приведенных масс-спектров, праймеры для типирования подобраны таким образом, что продукты реакции минисеквенирования, образующиеся при анализе РНК различных генотипов ВГС, были однозначно отличимы друг от друга. Это позволяет эффективно выявлять как моноинфекцию, так и микст-инфекцию, когда в клиническом образце присутствует более одного генотипа вируса.

Предложенный нами метод типирования РНК ВГС апробирован на РНК-позитивных образцах из лабораторного банка сывороток, протестированных ранее аллельспецифичной амплификацией для установления генотипа вируса. Среди исследованных 69 образцов генотип вируса 1a выявлен в 4,5% случаях, 1b - 48%, 2a - 4,5%, 3a - 29%, 4 - 1,5%. В 9 (13%) образцах регистрируется микст-инфекция, из них сочетание 3a+4 - 3 образца, 3a+1b - 2 образца, 1a+1b - 2 образца, 1a+3a - 1 образец, 2a+5 - 1 образец. Случаи выявления редких генотипов (4 и 5) подтверждены секвенированием амплифицируемого фрагмента генома ВГС. Сравнительный анализ настоящих результатов генотипирования и полученных ранее с использованием аллельспецифичной амплификации показал высокий процент соответствия между ними (97%), в том числе и при выявлении микст-инфекции. В 2х образцах (3%) зарегистрировано несоответствие выявленных генотипов ВГС. По результатам секвенирования подтверждена правильность установления генотипа с использованием технологии минисеквенирования и определения молекулярных масс продуктов реакции на времяпролетном масс-спектрометре Reflex-IV.

Масс-спектры продуктов реакции минисеквенирования выявляемых генотипов ВГС
 А - исходные олигонуклеотидные праймеры, В - продукты достраивания праймеров при анализе 1а генотипа ВГС, С - продукты достраивания праймеров при анализе 1в генотипа ВГС, D - продукты достраивания праймеров при анализе 2а генотипа ВГС, Е - продукты достраивания праймеров при анализе 3а генотипа ВГС, F - продукты достраивания праймеров при анализе 4ого типа ВГС

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Simmonds P, Alberti A, Alter H J, Bonino F, Bradley D W, Brechot C, Brouwer J T, Chan S W, Chayama K, Chen D S* (1994) *Hepatology*, **19**, 1321-1324
- 2 *Zein N N, Persing D H* (1996) *Mayo Clin Proc*, **71**, 458-464

3. Ильина Е.Н., Артемов Е.К., Говорун В.М., Иванова Л.М., Иваников И.О. (2002) Кремлевская Медицина Клинический вестник, №1, 38 - 41
4. Hayashi J., Kishihara Y., Yoshimura E., Tam Y., Yamaji K., Ikematsu H., Ishiko H., Kashiwagi S. (1995) J Infect, **30**, 235-239
5. Hayashi J., Ohmiya M., Kishihara Y., Tam Y., Kinukawa N., Ikematsu H., Kashiwagi S. (1994) The Amer J Gastroenter, **89**, 2151-2156
6. Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H. (1992) Proc Natl Acad Sci USA, **89**, 4942-4946
7. Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H. (1994) Proc Natl Acad Sci USA, **91**, 8239-8243.
8. Chan S.W., McOmish F., Holmes E.C., Dow B., Peuhterer J.F., Follett E., Yap P.L., Simmonds P. (1992) J Gen Virol, **73**, 1131-1141
9. Davidson F., Simmonds P., Ferguson J.C., Jarvis L.M., Dow B.C., Follett E.A., Seed C.R., Krusius T., Lin C., Medgyesi G.A. (1995) J. Gen Virol, **76**, 1197-1204
10. Okamoto H., Kojima M., Sakamoto M., Izuka H., Hadaewandowo S., Suwignyo S., Miyakawa Y., Mayumi M. (1994) J Gen Virol, **75**, 629-635
11. Okamoto H., Sugiyama Y., Okada S., Kurai K., Akahane Y., Sugai Y., Tanaka T., Sato K., Tsuda F., Miyakawa Y. (1992) J Gen Virol, **73**, 673-679.
12. Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Heuverswyn H., Maertens G. (1993) J Gen Virol, **74**, 1093-1102
13. Liew M., Erali M., Page S., Hillyard D., Wittwer C. (2004) J Clin Microbiol, **42**, 158-163
14. Storm N., Darnhofer-Demar B., van den Boom D., Rodi C.P. (2002) Meth Mol Biol, **212**, 241-262.

Поступила 24 06 2004

USING THE MASS SPECTROMETRY ANALYSIS FOR HEPATITIS C VIRUS TYPING.

E.N. Ilina¹, M.V. Malahova¹, E.V. Genozov¹, V.M. Govorun^{1,2}, A.I. Archakov², V.I. Pokrovsky³

¹Institute of Physico-Chemical Medicine Ministry of Public Health.
Malaya Pyrogovskaya str, 1a, Moscow, 119992, Russia tel (095) 2454236,
e-mail elena.ilina@lytech.ru

²Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str, 10, Moscow, 119832, Russia.

³Institute of Epidemiology of Russia Federation Ministry of Public Health,
Novogyreevskaya str, 3a, Moscow, 111123, Russia

Determination of the hepatitis C virus (HCV) genotype has become the standard procedure in laboratory diagnostics of HCV infection. Genotype elucidation has prognostic value assignment helps in assessing disease prognosis and promotes establishing appropriate duration of treatment. Now 11 major genotypes and more than 70 subtypes of HCV have been identified using the sequence variability within 5' non-coding region (5' NCR). In Russia the most common subtypes are 1a, 1b, 2a, 3a and more rare - 4 and 5 types. While the "gold standard" for testing is nucleic acid sequencing, a variety of other assays, including the line probe assay or type-specific amplification, has been developed to provide more rapid and cheaper forms of testing. The aim of this study was to determine the type-specific single nucleotide polymorphism (SNP) in 5' NCR HCV by the classical three-step minisequencing method with followed MALDI-TOF mass spectrometry detection. The fragments of 5'NCR of HCV genomes were amplified by the nested RT-PCR. The removal of excess nucleotides and primers was performed. Three oligonucleotide primers were design to detect two sets of type-specific SNP in 5' NCR HCV. The primer extension reaction was performed using modified thermostable DNA polymerase and in the presence of ddNTP. The molecular weights of primers extension reaction products were analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry. The HCV genotype was determined according the presence in analyses sample the molecules with expected molecular weights. The suggested method was used to type HCV from 69 HCV-positive sera. The 1a genotype was determined in 45% samples, 1b - 48%, 2a - 45%, 3a - 29%, 4 - 1,5%. The mixes of two genotypes were found in 13% samples. All data confirmed by direct nucleic acid sequence. Thus, the new method for HCV typing has been developed using the minisequencing reaction and mass spectrometry for the determination of nucleic acid molecular weight.

Key words hepatitis C virus, genotyping, minisequencing, SNP, mass spectrometry