

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«27» июня 2019 г.

Регистрационный № 075-0519



МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ 1В  
ПОДГЕНОТИПА ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ЛЕКАРСТВЕННЫМ  
СРЕДСТВАМ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-  
практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Бунас А.С., Гудель А.С.,

Канончик Е.С.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения мутаций резистентности вируса гепатита С (ВГС) к лекарственным средствам прямого противовирусного действия с амплификацией NS3/4A, NS5A, NS5B участков генома вируса с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВГС-инфекцией.

## **ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

### **1. Показания к применению:**

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику ВГС-инфекции.

### **2. Противопоказания:** отсутствуют.

### **3. Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, расходных материалов**

#### **Необходимое оборудование:**

- термоциклер для проведения ПЦР;
- центрифуга для микропробирок;
- центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14000 об/мин;
- ламинарные боксы;
- аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;
- гельдокументирующая система;
- 3 комплекта автоматических дозаторов переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);

- вортекс;
- твердотельный термостат;
- генетический анализатор;
- холодильник с морозильной камерой (от +4<sup>0</sup>С до +8<sup>0</sup>С, от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С);
- бактерицидная лампа.

### **3.2 Расходные материалы:**

- вакутайнеры с ЭДТА для забора крови;
- наконечники с фильтром: 10 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пластиковые микропробирки одноразовые объемом 0,2, 0,5, 1,5 мл;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников;

### **3.3 Реагенты для проведения ПЦР, электрофоретической детекции и секвенирования:**

#### *Пробоподготовка и выделение РНК ВГС:*

- набор реагентов для выделения РНК из образцов крови любого производителя;

#### *Проведение ПЦР-реакции и секвенирования:*

- праймеры;
- реагенты для проведения ПЦР (Taq-полимераза с 10х буфером, Mg<sup>2+</sup>, смесь дезоксинуклеотидов, деионизованная вода);
- реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5х буфер, деионизованная вода);
- формамид для молекулярной биологии (HiDi Formamid);

#### *Проведение электрофоретической детекции:*

- агароза для гель-электрофореза;
- буфер для электрофореза 10х ТБЭ или 50х ТАЭ;
- маркер молекулярного веса (от 100 до 1000 п.о.);
- колонки для очистки продуктов ПЦР или аналогичные реагенты;

– реагенты и материалы для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (наборы для очистки продуктов ПЦР колоночным, преципитационным или ферментативным методами).

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

**3.4 Программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей:** стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.1, LaserGene и др.

**4. Описание технологии используемого метода для выявления мутаций резистентности ВГС к лекарственным средствам прямого противовирусного действия в плазме крови.**

**4.1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала.**

**4.1.1. Получени периферической венозной крови пациентов**

Взятие периферической венозной крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа Vacutainer (6% ЭДТА). После взятия крови шприц следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Условия хранения материала: образцы цельной крови: при температуре от 20°C до 25°C хранятся в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток.

Замораживание образцов цельной крови не допускается.

**4.1.2. Получение плазмы крови:**

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин., после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл.) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желательно разлить небольшими (0,5 - 0,8 мл.) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл. с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения материала:

– образцы плазмы крови: при температуре от 2°C до 8°C – хранятся в течение 5 суток; при температуре от (-16°C) до (-20°C) – в течение года.

Забор крови и ее транспортировка производятся в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

#### ***4.1.3. Транспортирование биологического материала***

Транспортирование материала осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом в возможно короткий срок при температуре от +4°C до +8°C. При невозможности немедленной отправки – в течении 4 часов после забора – пробы замораживают при (минус 20°C) и далее транспортируют в замороженном виде. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

## ***4.2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления мутаций резистентности 1b подгенотипа ВГС к лекарственным средствам прямого действия***

### ***4.2.1. Выделение РНК ВГС***

Выделение РНК ВГС из плазмы проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения РНК из плазмы/сыворотки крови

### ***4.2.2. Диагностическая амплификация NS3/4A, NS5A, NS5B участков генома 1b подгенотипа ВГС с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием***

Выделяют три класса лекарственных прямого противовирусного действия (ингибиторы NS3/4A-протеазы, ингибиторы NS5A и NS5B-полимеразы), основными мишенями которых являются вирусные белки ВГС, необходимые для его размножения. Появление субтипзависимых мутаций в NS3/4A, NS5A и NS5B участках генома вируса способствует сохранению жизнедеятельности возбудителя и приводит к неэффективности лечения.

Для накопления фрагментов ДНК NS3/4A, NS5A и NS5B участков генома ВГС выполняется обратная транскрипция и амплификация. В последующем специфические фрагменты генома ВГС секвенируются и проводится биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей.

#### ***4.2.2.1. Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации NS3/4A, NS5A, NS5B участков генома 1b подгенотипа ВГС***

Реакция обратной транскрипции выполняется в общем объеме 10 мкл со случайными гексамерами по следующей прописи: 0.2 µg праймера, 1 mM dNTPs, 20U ингибитора РНКаз, 40U обратной транскриптазы и 5 мкл

исследуемой РНК. Обратная транскрипция проводится в следующем режиме: 65°C – 10 минут при 25°C, 60 минут при 37°C и 10 минут при 70°C.

Для амплификации используют праймеры, представленные в таблице 1. Объем реакционной смеси 25 мкл со следующими компонентами ПЦР: ПЦР буфер – 2,5 мкл, MgCl<sub>2</sub> (25мМ) – 2,0 мкл, смесь дНТФ (25мМ) – 0,2мкл, праймеры (прямой и обратный) (10мМ) – 0,5 мкл, полимеразы – (5Ед/мк) – 0,125 мкл, деионизованная вода – 17,175 мкл.

Таблица 1 – Пары праймеров для амплификации NS3/4A, NS5A и NS5B участков генома ВГС

Участок генома ВГС	Номер раунда ПЦР	Код праймера	Последовательность, 3' – 5'	Размер фрагмента
NS3/4A	1	F_NS2	CGAGACCTGCGGTGCAGT	1122
		R_NS2	CAGCCGTYTCCGCTTGGTC	
	2	F_NS3	CATCACCTGGGGGGGCAGACAC	1016
		R_NS3	TCAGTTGAGTGGCTCATCAC	
NS5A	1	6279	GTTTGGGACTGGATATGCAC	371
		6650	CCGTCACGTAGTGGAAATC	
	2	6318	TGGCTCCAGTCCAAGCTCC	317
		6618	CCTCCACGTA CTCTCAG	
NS5B	1	8460	ACYAGCTGCGGTATCACC	820
		1700	CACGAGACAGGCTGTGATA	
	2	8522	GCTCCAGGACTGCACGAT	740
		1700	CACGAGACAGGCTGTGATA	

Аmplификацию проводят в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 2.

Таблица 2 – Программы амплификации NS3/4A, NS5A и NS5B участков генома ВГС

Участок генома ВГС	Номер раунда ПЦР	Название праймера	Временные и температурные режимы ПЦР
NS3/4A	1	F_NS2/ R_NS2	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30с, 58°С – 30с, 72 °С – 2 мин (35 повторов); 72°С – 7 мин.
	2	F_NS3/ R_NS3	95°С – 5мин; 95°С – 30с, 60°С – 30с, 72°С – 1мин (35 повторов); 72 °С – 7мин.
NS5A	1	6279/ 6650	95°С – 5 мин; 95°С – 30с, 55°С – 30с, 72°С – 2 мин (35 повторов); 72°С – 7 мин
	2	6318/ 6618	95°С – 5мин; 95°С – 30с, 58°С – 30с, 72°С – 1мин (35 повторов); 72 °С – 7мин.
NS5B	1	8460/ 1700	95°С – 5мин; 95°С – 30с, 60°С – 30с, 72°С – 2 мин (35 повторов); 72°С – 7 мин.
	2	8522/ 1700	95°С – 5мин; 95°С – 30с, 58°С – 30с, 72°С – 2 мин (35 повторов); 72°С – 7 мин.

Анализ продуктов амплификации осуществлялся методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Результаты электрофоретической детекции фрагментов NS3/4A, NS5A и NS5B участков генома ВГС представлены на рисунке 1.



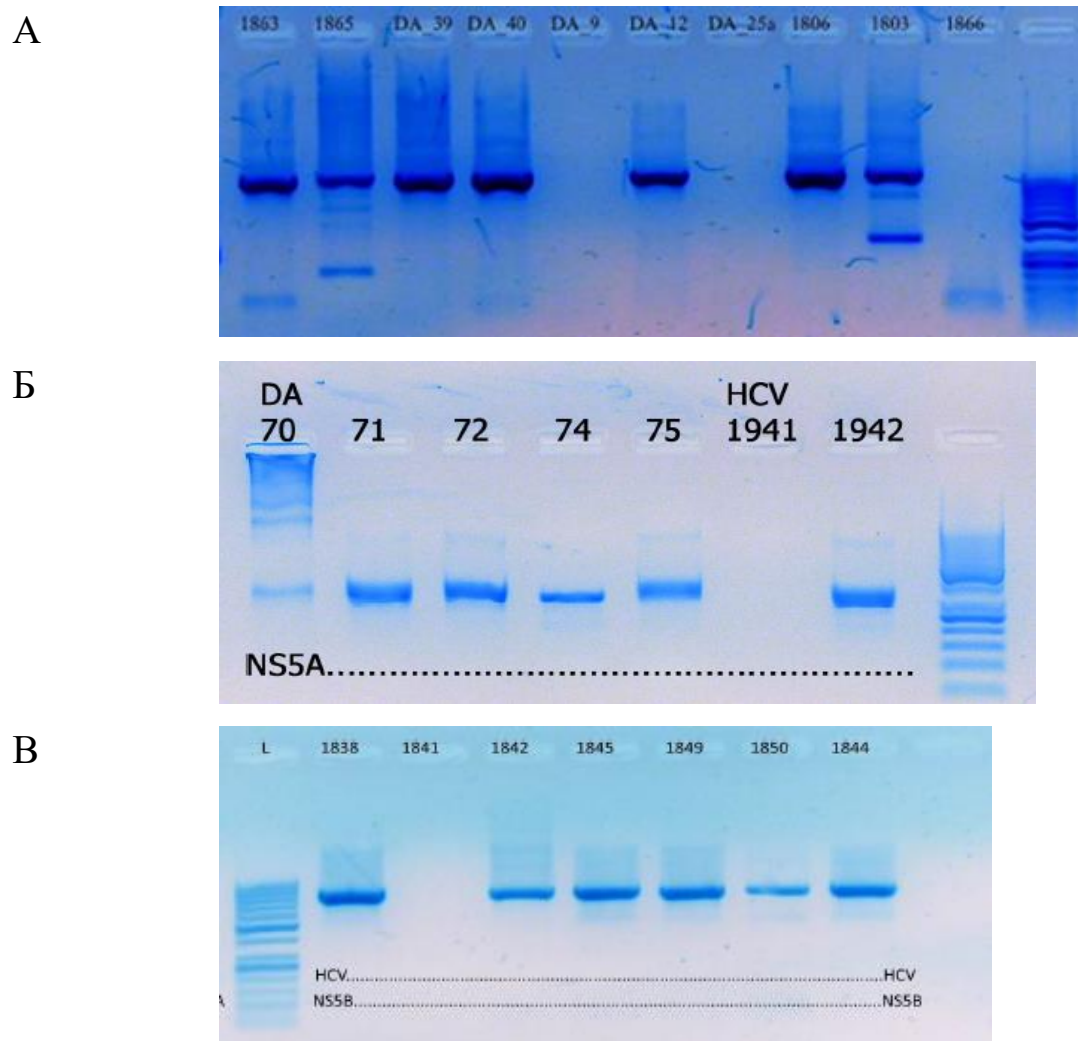


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции амплифицированного фрагмента NS3/4A (А), NS5A (Б) и NS5B (В) участков генома 1b подгенотипа ВГС

#### **4.2.2.5. Очистка продуктов амплификации**

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК или реагентом для очистки “clean up” любого производителя.

#### **4.2.2.6. Секвенирующая ПЦР**

Секвенирующая ПЦР в объеме 20 мкл по следующей прописи: 4,0 мкл прямого или обратного праймера (10 пкМ), 1 мкл Big dye terminator v.3.1, 1,5 мкл ПЦР продукта (концентрация 10 нг), 7 мкл Big Dye буфера, 6,5 мкл деионизованной воды. Режим амплификации: 96°C – 5 мин; 95°C – 10 с,

50°C – 5с, 60°C – 2 мин (25 повторов); 4°C – хранение. Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

Секвенирование продуктов ПЦР:

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешать 5с на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Поместить пробирки в термостат при 95°C на 2 мин. Немедленно образцы поместить на лед. Подготовленные пробы внести по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

## **5. Определение мутаций резистентности к лекарственным средствам прямого действия**

Выполняют биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза с помощью стандартного программного обеспечения.

Для установления мутаций резистентности к лекарственным средствам прямого действия программное обеспечение geno2pheno (<http://hbv.geno2pheno.org/index.php>), находящиеся в открытом доступе в Интернет или аналогичные программы.

Наиболее значимыми в NS3/4A участке генома ВГС, влияющими на эффективность лечения ингибиторами интегразы (боцепревир, асуцнапревир и др.), являются замены Q80, R155 и D168. В NS5A участке генома ВГС, влияющими на эффективность лечения ингибиторами NS5A белка (даклатосвир, ледипасвир и др.), – замены M28, Q30, L31 и Y93. В NS5B участке генома ВГС, влияющими на эффективность лечения ингибиторами NS5B-полимеразы (софосбувир и дасабувир), – замены C316H/N/Y, Y448H/C, S556G/N/R и D559G. Результаты анализа нуклеотидной последовательности HCV\_1844, секвенированной по NS3/4A, NS5A и NS5B участкам генома ВГС с помощью on-line программы geno2pheno представлены на рисунках 2, 3 и 4.

Identifier:	HCV_1844 - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)		
Genetic region:	NS3		
Predicted subtype:	1b (Similarity of DNA to closest reference = 90.79%)		
Codons covered in NS3 region:	1 - 181		
Mutations in NS3 region:	S7A, V48I, A66G, P86Q, K87A, F147S		
Reference used:	M58335		
Drug Resistance			
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis	
Asunaprevir	none	susceptible	■
Boceprevir	none	susceptible	■
Glecaprevir	none	susceptible	■
Grazoprevir	none	susceptible	■
Paritaprevir	none	susceptible	■
Simeprevir	none	susceptible	■
Telaprevir	none	susceptible	■
Voxilaprevir	none	susceptible	■

Рисунок 2 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце HCV\_1844 к ингибиторам NS3/4A с использованием программы geno2pheno






Sequence Information			
Identifier:	HCV_1844 - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)		
Genetic region:	NS5A		
Predicted subtype:	1b (Similarity of DNA to closest reference = 93.6%)		
Codons covered in NS5A region:	22 - 120		
Mutations in NS5A region:	L31V, L34V, L37F, K44R, Q54H, K78R, T79A, Y93H		
Reference used:	D90208		
Drug Resistance			
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis	
Daclatasvir	31V,93H	resistant	
Elbasvir	31V,93H	resistant	
Ledipasvir	31V,93H	resistant	
Ombitasvir	31V,93H	resistant	
Pibrentasvir	none	susceptible	
Velpatasvir	93H	resistant	

Рисунок 3 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце HCV\_1844 с использованием программы geno2pheno по NS5A участку генома ВГС


Identifier:	HCV_1844 - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)		
Genetic region:	NS5B		
Predicted subtype:	1b (Similarity of DNA to closest reference = 93.57%)		
Codons covered in <i>NS5B</i> region:	314 - 561 (Important positions not covered: 282)		
Mutations in <i>NS5B</i> region:	C316N, T377S, T390I, V499A, A513S, K523R, S549N, S556G		
Reference used:	EU781827		
<b>Drug Resistance</b>			
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis	
Dasabuvir	316N,556G	resistant	
Sofosbuvir	none	susceptible	

Рисунок 4 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце HCV\_1844 с использованием программы geno2hrepo по NS5B участку генома вируса

Установление клинически значимых мутаций в анализируемых участках генома ВГС свидетельствует об обнаружении варианта вируса, устойчивого к действию лекарственных средств, действие которых направлено на ингибирование NS3/4A, NS5A и NS5B белков вируса.

### **Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения**

Проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

<b>Проблема</b>	<b>Возможная причина</b>	<b>Пути устранения</b>
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Деградация РНК и/или низкое содержание исходной РНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения РНК.
	Деградация РНК/кДНК	Использовать пробы РНК сразу после выделения.
	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
	Вирусная нагрузка менее 2000 копий РНК/мл	Тестирование вирусной нагрузки до проведения амплификации
Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе.	Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования	Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования
	Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку её продуктов
При сравнении сиквенса в программе Blast нет гомологии с ВГС	Ложноположительная реакция ПЦР из-за нарушения условий проведения	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов.