

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



С.В. Нечай

« 27 » 2026 г.

Регистрационный № 007-1225

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА SARS-CoV-2 К РЕМДЕСИВИРУ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р. биол. наук, доц. Гасич Е.Л., Булда К.Ю., Коско А.Д., Дорофеева Е.А., чл.-корр., д-р. мед. наук, проф. Карпов И.А.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения резистентности вируса *SARS-CoV-2* к ремдесивиру на основе секвенирования участка гена, кодирующего РНК-зависимую РНК полимеразу вируса, и биоинформационного анализа, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний и патологических состояний, вызванных *SARS-CoV-2*.

Инструкция предназначена для научных работников, врачей-лаборантов и иных специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, а также врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с COVID-19 в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

Показания к применению

1. Определение резистентности *SARS-CoV-2* к действию ремдесивира.
2. Инфекция COVID-19 (U07.1, U07.2), не имеющая терапевтического эффекта.

Противопоказания к применению

Отсутствуют.

Перечень медицинских изделий, реактивов, расходных материалов и др.

термоциклер с возможностью проведения ПЦР в режиме реального времени;

центрифуга для микропробирок;

центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14000 об/мин;

ламинарные боксы;

аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;

гель-документирующая система;

дозаторы механические переменного объема, комплект (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл);

мини-центрифуга-вортекс;

твердотельный термостат;

генетический анализатор;

холодильник с морозильной камерой (от +2°C до +8°C, от минус 18°C до минус 25°C);

бактерицидная лампа;

пробирки стерильные пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл);

микропробирки для проведения ПЦР (0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;

микропробирки с транспортной средой;

наконечники для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;

набор реагентов для экстракции РНК методом сорбции на магнитных частицах;

набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом одностадийной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;

набор реагентов для обратной транскрипции;

реагенты для проведения ПЦР;

реагенты для проведения электрофоретической детекции (агароза, маркер молекулярного веса 50 – 1500 п.н., загрузочный буфер, ТАЕ-буфер, бромистый этидий);

реагенты для проведения ферментативной очистки продуктов после ПЦР;

реагенты для проведения секвенирующей ПЦР и очистки продуктов после секвенирующей ПЦР;

штативы для пробирок;

магнитный штатив;

халаты, респираторы, перчатки нитриловые;

программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей: Geneious Prime 2020, BioEdit V.7.2 или иные программы, предназначенные для сборки и анализа нуклеотидных последовательностей.

Технология использования метода

1. Выделение РНК вируса SARS-CoV-2

Материалом для исследования является РНК *SARS-CoV-2* (далее – образец), выделенная из клинического материала (мазки из зева, мазки из носа, бронхо-альвеолярный лаваж, мокрота и др.).

Выделение РНК *SARS-CoV-2* проводится методом сорбции на магнитных частицах в соответствии с инструкцией производителя набора для выделения РНК из клинического материала. Допускается хранение

выделенной РНК при температуре от минус 16°C до минус 20°C до 6 месяцев, при минус 70°C – до 1 года. Многократное замораживание-оттаивание не допускается.

2. Обратная транскрипция РНК и амплификация участка гена ORF1ab SARS-CoV-2

2.1 Обратная транскрипция

Для этапа обратной транскрипции готовится реакционная смесь следующего состава: случайный гексамер – 1 мкМ, смесь дНТФ – 0,5 мМ, ОТ-буфер – 1×, MgCl₂ – 3 мМ, MMLV-ревертаза – 1,6 ед/мкл, ингибитор РНКаз – 0,8 ед/мкл, 10 мкл выделенной РНК вируса SARS-CoV-2, деионизированная вода – до конечного объема. Конечный объем реакционной смеси 25 мкл. Условия проведения реакции обратной транскрипции: ревертирование при 25°C – 10 мин и 54°C – 40 мин, инаktivация ревертазы при 85°C – 5 мин, хранение при 4°C. Полученную кДНК используют для амплификации участка гена ORF1ab, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу.

2.2 Амплификация участка гена ORF1ab SARS-CoV-2 и анализ продуктов амплификации

Амплификацию участка гена ORF1ab вируса SARS CoV-2 проводят с использованием специфических праймеров:

NSP12_1F 5' – CACATATATCACGTCAACGTC – 3' (Прямой);
NSP12_1R 5' – GTGCATCTTGATCCTCATAAC – 3' (Обратный);
NSP12_2F 5' – ACTTCTTCTTTGCTCAGGATGG – 3' (Прямой);
NSP12_2R 5' – TTCAATCATAAGTGTACCATCTG – 3' (Обратный).

Амплификацию целевых фрагментов проводят в объеме 25 мкл со следующим составом реакционной смеси: буфер для ПЦР – 1×, MgCl₂ – 2 мМ, смесь дНТФ – 0,2 мМ, праймеры – по 0,4 мкМ прямого и обратного

(для фрагмента NSP12_1: NSP12_1F и NSP12_1R, для NSP12_2: NSP12_2F и NSP12_2R), Taq-полимераза – 0,04 ед/мкл, кДНК-матрица – 2,5 мкл, деионизированная вода – до конечного объема. Временные и температурные режимы для амплификации участков гена ORF1ab SARS CoV-2: начальная денатурация при 95°C 2 мин, 35 циклов (денатурация 95°C – 10 сек, отжиг праймеров 52°C (для фрагмента NSP12_1) и 54°C (для фрагмента NSP12_2) – 10 сек, элонгация 72°C – 1 мин 10 сек), конечная элонгация при 72°C – 5 мин, хранение при 4°C.

2.3 Анализ продуктов амплификации

Анализ продуктов амплификации осуществляется методом электрофореза в 1,7% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (1 мкг/мл). Детекция амплифицированных фрагментов осуществляется с использованием гель-документирующей системы. Продукты амплификации представлены двумя участками: NSP12_1 и NSP12_2 размером 1245 п.н. и 1256 п.н., соответственно.

3. Секвенирование по Сэнгеру и биоинформационный анализ

3.1 Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации участка ORF1ab проводится с использованием набора реагентов для ферментативной очистки продуктов ПЦР согласно инструкции производителя.

3.2 Проведение секвенирующей ПЦР

Секвенирующая ПЦР проводится в объеме 10 мкл с использованием 2 мМ прямого или обратного праймера для каждого из фрагментов, 10 нг ПЦР-продукта и реагентов в составе набора для проведения секвенирующей ПЦР. Температурные и временные условия

проведения реакции секвенирующей ПЦР устанавливаются в соответствии с инструкцией производителя.

3.3 Очистка продуктов амплификации после секвенирующей ПЦР и секвенирование по Сэнгеру

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом спиртовой преципитации. К очищенной пробе добавляют 10 мкл высокоочищенного формамида и инкубируют 2 минуты при температуре 95°C. Подготовленные пробы вносят в планшет для генетического анализатора.

Секвенирование очищенных фрагментов проводится на генетическом анализаторе.

4. Учет и интерпретация результатов

Биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза выполняется с помощью стандартного программного обеспечения. Для получения последовательности используются программы SeqScape v.2.4, BioEdit v.6, BLAST, находящиеся в открытом доступе в Интернете либо аналогичные программы.

Для установления мутаций резистентности SARS-CoV-2 к ремдесивиру используется программное обеспечение covdb.stanford.edu (<https://covdb.stanford.edu/sierra/sars2/by-sequences>), находящиеся в открытом доступе в Интернет или аналогичные программы. Среди таких замен ключевыми являются – V166L, A376V, F480L, D484Y, V557L, G671S, S759A, V792I, E796G, C799F, C799R, E802A и другие. Установление клинически значимых мутаций в анализируемых участках генома SARS-CoV-2 свидетельствует об обнаружении варианта вируса, устойчивого к действию ремдесивира.

5. Перечень возможных ошибок при выполнении исследования и пути их устранения

5.1 Полное отсутствие ПЦР-продукта при электрофоретической детекции может свидетельствовать о деградации РНК и/или низком содержании исходной РНК, погрешности в проведении реакции амплификации. Рекомендуется провести количественное определение вирусной РНК в исследуемых образцах, выполнить контроль качества реагентов путем использования в ПЦР контрольных образцов, выполнить повторное выделение РНК.

5.2 Невозможность определения нуклеотидных последовательностей на генетическом анализаторе из-за отсутствие четкого сигнала (детекции смешанного сигнала) может свидетельствовать о наличии смеси из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования. Рекомендуется повторить процедуру выделения РНК, амплификацию и секвенирующую ПЦР, провести тщательную очистку ее продуктов.

5.3 Невозможность определения нуклеотидных последовательностей на генетическом анализаторе из-за полного отсутствия сигнала может свидетельствовать о погрешностях при постановке секвенирующей ПЦР или очистке продуктов реакции секвенирования. Необходимо повторить реакцию секвенирующей ПЦР, провести тщательную очистку ее продуктов.

5.4 При сравнении нуклеотидной последовательности с электронным ресурсом <https://covdb.stanford.edu> нет гомологии с известными вариантами SARS-CoV-2, что может свидетельствовать о контаминации исследуемого образца, поверхностей ламинарного бокса или реактивов, используемых для приготовления реакционной смеси. Рекомендуется повторно провести выделение РНК из исследуемых образцов, заменить компоненты ПЦР-смеси на новые и повторить

исследование после проведения обработки рабочих поверхностей ламинарного бокса средствами, оказывающими разрушающее действие на нуклеиновые кислоты.

Для снижения риска контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов при утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР, запрещается открывание пробирок и разбрызгивание содержимого.

При каждой постановке реакции следует использовать отрицательный контрольный образец для подтверждения отсутствия контаминации реактивов или расходных материалов. В качестве отрицательного контроля может выступать деионизированная вода, ТЕ-буфер.