

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

28.06.2019

Регистрационный № 075-0519

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

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

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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Необходимое оборудование:

термоциклер для ПЦР;
центрифуга для микропробирок;
центрифуга с охлаждением для микропробирок на 14 000 об/мин;
ламинарные боксы;
аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;

гель-документирующая система;

3 комплекта автоматических дозаторов переменного объема (от 0,1 до 10; от 20 до 200; от 100 до 1000 мкл);

вортекс;

твердотельный термостат;

генетический анализатор;

холодильник с морозильной камерой (от 4 до 8 °С, от -18 до -20 °С);

бактерицидная лампа.

Расходные материалы:

вакутайнеры с ЭДТА для забора крови;

наконечники с фильтром: 10; 100; 200; 1000 мкл;

пластиковые микропробирки одноразовые объемом 0,2; 0,5; 1,5 мл;

штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников.

Реагенты для ПЦР, электрофоретической детекции и секвенирования:

Пробоподготовка и выделение РНК ВГС:

набор реагентов для выделения РНК из образцов крови любого производителя.

Постановка ПЦР и секвенирования:

праймеры;

реагенты для ПЦР (Taq-полимераза с 10х буфером, Mg²⁺, смесь дезоксирибонуклеотидов, деионизованная вода);

реагенты для секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5х буфер, деионизованная вода);

формаид для молекулярной биологии (HiDi Formamid).

Электрофоретическая детекция:

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 молекулярно-биологических
исследований.

Программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей

Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.1, LaserGene и др.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала

1.1. Получение периферической венозной крови

Периферическую венозную кровь следует брать натощак или через 3 ч 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 до 25 °С хранятся в течение 6 ч с момента получения материала; при температуре от 2 до 8 °С — не более 1 сут.

Замораживание образцов цельной крови не допускается.

1.2. Получение плазмы крови

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10–20 мин при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желателно 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 до 8 °С — хранятся в течение 5 сут; при температуре от -16 до -20 °С — в течение 1 года.

Забор крови и ее транспортировка осуществляются 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», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2.

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 до 8 °С. При невозможности немедленной отправки — в течение 4 ч после забора — пробы замораживают при -20 °С и далее транспортируют в замороженном виде. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

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

2.1. Выделение РНК ВГС

Осуществляется в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения РНК из плазмы/сыворотки крови.

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

Выделяют 3 класса лекарственных средств 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, приводят 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, выполняется биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей.

Реакция обратной транскрипции и амплификации NS3/4A, NS5A, NS5B участков генома 1b подгенотипа ВГС

Реакция обратной транскрипции осуществляется в общем объеме 10 мкл со случайными гексамерами по следующей прописи: 0,2 мкг праймера, 1 мМ dNTPs, 20U ингибитора РНКаз, 40U обратной транскриптазы и 5 мкл исследуемой РНК. Обратная транскрипция проходит в следующем режиме: 65 °С — 10 мин при 25 °С; 60 мин при 37 °С и 10 мин при 70 °С.

Для амплификации используют праймеры, представленные в таблице 1. Объем реакционной смеси 25 мкл со следующими компонентами ПЦР: ПЦР-буфер — 2,5 мкл, MgCl₂ (25 мМ) — 2,0 мкл, смесь дНТФ (25 мМ) — 0,2 мкл, праймеры (прямой и обратный) (10 мМ) — 0,5 мкл, полимеразы (5 Ед/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	CATCACCTGGGGGGCAGACAC	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	

Амплификацию выполняют 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 – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин (35 повторов); 72 °С – 7 мин
	2	F_NS3/ R_NS3	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (35 повторов); 72 °С – 7 мин.
NS5A	1	6279/ 6650	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин (35 повторов); 72 °С – 7 мин
	2	6318/ 6618	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (35 повторов); 72 °С – 7 мин
NS5B	1	8460/ 1700	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 2 мин (35 повторов); 72 °С – 7 мин
	2	8522/ 1700	95 °С – 5 мин; 95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 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.

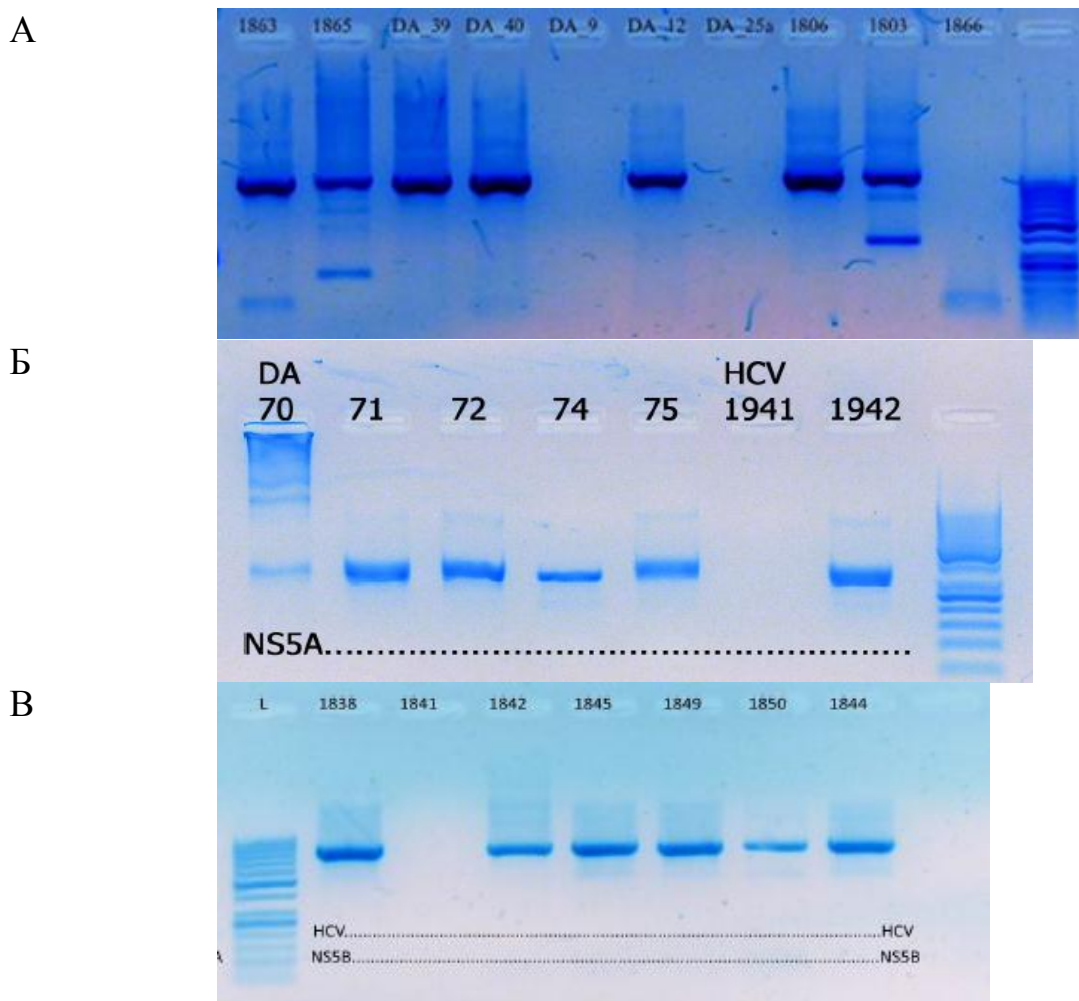


Рисунок 1. — Результаты электрофоретической детекции амплифицированного фрагмента NS3/4A (А), NS5A (Б) и NS5B (В) участков генома 1b подгенотипа ВГС

Очистка продуктов амплификации

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

Секвенирующая ПЦР

Секвенирующая ПЦР в объеме 20 мкл по следующей прописи: 4,0 мкл прямого или обратного праймера (10 пкМ), 1 мкл BigDye Terminator v.3.1, 1,5 мкл ПЦР-продукта (концентрация 10 нг), 7 мкл BigDye буфера, 6,5 мкл деионизованной воды. Режим амплификации: 96 °С — 5 мин; 95 °С — 10 с, 50 °С — 5 с, 60 °С — 2 мин (25 повторов); 4 °С — хранение. Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от невключенных нуклеотидов методом преципитации.

Секвенирование продуктов ПЦР

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешивают 5 с на вортексе, сбрасывают кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Помещают пробирки в термостат при 95 °С на 2 мин. Немедленно образцы помещают на лед. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

Для определения 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 используют программное обеспечение geno2pheno (<http://hbv.geno2pheno.org/index.php>), находящееся в открытом доступе в сети 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		
Drug Resistance			
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 ВГС

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

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ 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

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Дегградация РНК и/или низкое содержание исходной РНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения РНК
	Дегградация РНК/кДНК	Использовать пробы РНК сразу после выделения
	Погрешности в постановке реакции амплификации	Контроль качества реагентов путем использования в реакции контрольных образцов
	Вирусная нагрузка менее 2000 копий РНК/мл	Тестирование вирусной нагрузки до 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 произвести тщательную очистку ее продуктов
При сравнении сиквенса в программе Blast нет гомологии с ВГС	Ложноположительная ПЦР из-за нарушения условий выполнения	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов