

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный №163-1214

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1  
К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

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

Авторы:

д.м.н. В.Ф. Еремин, к.б.н. Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович, М.В. Домнич,  
д.м.н. И.И. Кучеров, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
07.05.2015  
Регистрационный № 163-1214

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1  
К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук В.Ф. Еремин, канд. биол. наук Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович,  
М.В. Домнич, д-р мед. наук И.И. Кучеров, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод определения мутаций резистентности в геноме ВИЧ-1, изолированного от пациентов с ВИЧ/СПИД, находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) и без таковой.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов и врачей-вирусологов.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.
2. Морозильная камера с температурой не ниже  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Прилавок с температурой  $-70^{\circ}\text{C}$ .
4. Специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом.
5. Твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл,  $25-100^{\circ}\text{C}$ .
6. Микроцентрифуги (5000–12000 об./мин) под пробирки типа 1,5; 0,5 мл — 2 шт.
7. Центрифуга/вортекс (1500–3000 об./мин) под пробирки 0,5; 1,5 мл — 2 шт.
8. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема — 3 комплекта.
9. Амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой).
10. УФ-трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением.
11. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания.
12. Специализированные ПЦР-боксы (ламинарные шкафы) с бактерицидной лампой.
13. Халаты и одноразовые резиновые перчатки.
14. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5; 0,5 и 0,2 мл.
15. Штативы для микропробирок и наконечников.
16. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 10; 100; 200 и 1000 мкл.
17. Одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром до 10; 100; 200 и 1000 мкл.
18. Холодильники с рабочей температурой  $+2-8^{\circ}\text{C}$  с морозильной камерой.
19. Емкости с дезинфицирующим раствором.
20. Наборы для выделения РНК.
21. Агароза.
22. 50x TAE-буфер.
23. Дистиллированная вода.
24. 1% раствор бромистого этидия.
25. Генетический анализатор.
26. Программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования.
27. Персональный компьютер (2).
28. Ацетат натрия.

29. Этиловый спирт.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

- впервые выявленные случаи ВИЧ-инфекции;
- пациенты на ВААРТ, не отвечающие на терапию;

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

#### **Забор материала и его транспортировка в ПЦР-лабораторию.**

В качестве материала для исследований используется плазма крови. Забор крови осуществляется путем венозной пункции общепринятыми методами. Получение плазмы крови осуществляют центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин.

Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в ПЦР-лабораторию по возможности непосредственно в день забора материала. Хранить плазму можно не более 1 недели при температуре от 18 до 25°C и в течение 20 сут при температуре +2–8°C.

Транспортировка клинического материала должна осуществляться в соответствии с требованиями по перевозке биологического материала в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосах со льдом в течение 1 сут. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

#### **Основные правила безопасности**

1. Персонал допускается к работе только после инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

2. Все работы проводятся в изолированных помещениях (зонах), аккредитованных для работы методом ПЦР. Посторонние лица в лабораторию не допускаются. Во время работы двери боксов и предбоксов должны быть закрыты; выход из бокса во время работы запрещается.

3. При работе обязательно использование сменных медицинских халатов, сменной обуви, защитных масок и перчаток. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде.

4. Работа с ДНК должна проводиться в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

5. При работе с патогенным материалом следует четко выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности» (постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

6. Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

зона 1 — выделение РНК;

зона 2 — проведение ОТ и ПЦР;

зона 3 — очистка полученных фрагментов и проведение секвенирующей ПЦР;

зона 4 — секвенирование полученных фрагментов.

Каждая зона содержит свой набор оборудования и расходных материалов. При переходе из одной зоны в другую следует менять халаты, перчатки. Потенциально

основной источник контаминации РНКазами — руки исследователя. Необходимо одевать и менять перчатки.

Перед началом работы проводят обработку пола, стен, мебели боксового помещения дезинфицирующими средствами и облучение ультрафиолетом за 1 ч до начала работы в течение 30 мин. Рабочее пространство ламинарного шкафа и автоматические дозаторы перед работой обрабатывают с использованием спиртосодержащих антисептиков и ультрафиолетовых облучателей в течение 30 мин.

### **Получение фрагментов РНК ВИЧ для последующего секвенирования и филогенетического анализа**

#### ***Выделение РНК/ДНК ВИЧ***

Для выделения РНК/ДНК ВИЧ используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК/ДНК, любого производителя. Выделение проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору.

#### ***Проведение реакции***

##### ***4.2.1. Обратная транскрипция***

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ для участка гена *pol* (протеаза и 2/3 обратной транскриптазы) проводят в объеме 20 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер — 4,0 мкл, рэндом праймер или праймер RP1A — 1,0 мкл, смесь трифосфатов — 2,0 мкл (10 mM), ингибитор РНКаз — 0,5 мкл (20 Ед.), обратная транскриптаза — 1,0 мкл (200 Ед), РНК — 10мкл, бидистиллированная вода — 1,5 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводят в следующем режиме: 42°C — 60 мин; 70°C — 10 мин. После 1-го раунда ПЦР пробирки помещают в специальный штатив и оставляют в зоне 3 при +4°C (не более 12 ч) либо оставляют на хранение при -15–25°C не более 1 недели. Пробирки готовы к проведению второго раунда ПЦР («гнездовая» ПЦР).

##### ***4.2.2 Амплификация***

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК.
2. Праймер RP1S, 20 мМ.
3. Праймер RP1A, 20 мМ.
4. Деионизированная вода.
5. ПЦР-буфер, 10х.
6. MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ.
7. Смесь дНТФ, 25 мМ.
8. Taq-полимераза, 5 U/мкл.

Протокол реакции:

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток готовят ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

Аккуратно перемешивают ПЦР-смесь, затем необходимо кратко осадить.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец, мкл	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	18,7	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5	1x
3.	MgCl <sub>2</sub>	2	2 мМ
4.	Праймер RP1S	0,25	0,2 мМ
5.	Праймер RP1A	0,25	0,2 мМ
6.	Смесь дНТФ	0,2	0,2 мМ
7.	Тaq-полимераза	0,125	0,625 Ед

Добавляют по 24 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Вносят 1 мкл исследуемой кДНК после реакции ОТ в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин 10–15 с.

Помещают пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси — 25 мкл.

Программа амплификации:

95°C — 5 мин

95°C — 30 с

55°C — 30 с

72°C — 1 мин 30 с

72°C — 7 мин

4°C — хранение.

} x35

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК.

2. Праймер PROS2, 20 мМ.

3. Праймер RTOA, 20 мМ.

4. Деионизированная вода.

5. ПЦР-буфер, 10x.

6. MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ.

7. Смесь дНТФ, 25 мМ.

8. Таq-полимераза, 5 U/мкл.

Протокол реакции:

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, готовят ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

Аккуратно перемешивают ПЦР-смесь, затем необходимо кратко осадить.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец, мкл	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	18,7	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5	1x
3.	MgCl <sub>2</sub>	2	2 мМ
4.	Праймер RP1S	0,25	0,2 мМ
5.	Праймер RP1A	0,25	0,2 мМ
6.	Смесь дНТФ	0,2	0,2 мМ
7.	Тaq-полимераза	0,125	0,625 Ед

Добавляют по 24 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Вносят 1 мкл исследуемой ДНК после первого раунда ПЦР в каждую пробирку.

Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин 10–15 с.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси — 25 мкл.

Программа амплификации:

95°C — 5 мин	} x 35
95°C — 30 с	
55°C — 30 с	
72°C — 1 мин 30 с	
72°C — 7 мин	
4°C — хранение.	

#### 4.2.3. Электрофорез продуктов амплификации

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидиума в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля — 1,8%, рисунок.

Буфер для электрофореза — 0,5%.

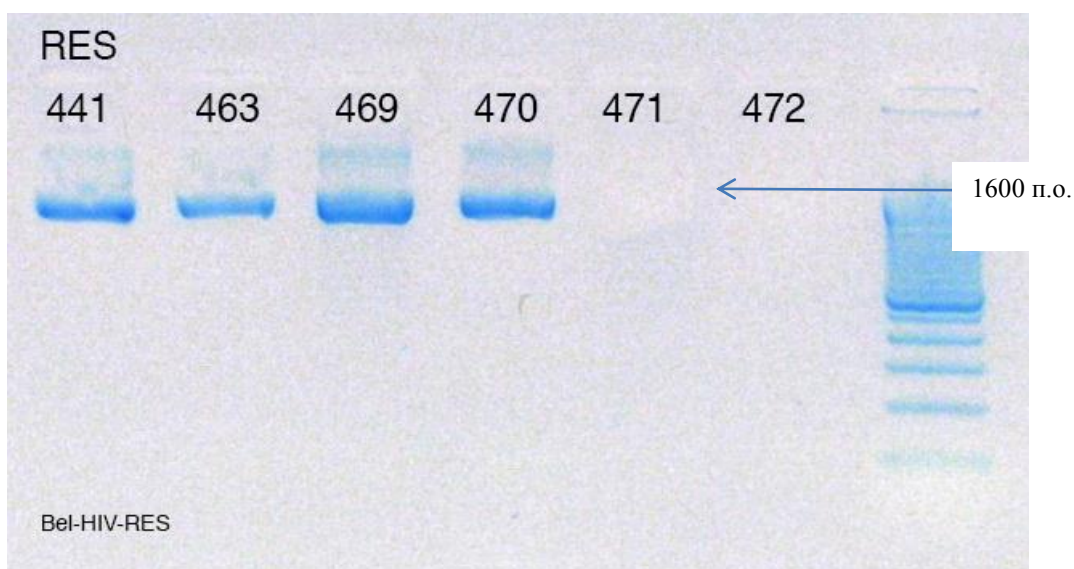
Tris [оксиметил]аминометан (Tris).

Борная кислота.

Na<sub>2</sub>EDTA.

Объем ДНК для электрофореза — 5 мкл.

Объем загрузочного буфера — 1 мкл.



**Рисунок — Электрофорез продуктов ПЦР**

### **Очистка продуктов амплификации**

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК.

### **Секвенирующая ПЦР**

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

ддН <sub>2</sub> О	4 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5x буфер	7 мкл
Bigdye Terminator	1 мкл
ДНК	4 мкл
Общий объем 20 мкл	

Секвенирующую ПЦР проводят в следующем режиме:

96°C — 10 с	} 25 циклов
96°C — 10 с	
50°C — 5 мин	
72°C — 4 мин	
4°C — хранение.	

Аmplицированные пробы очищают методом преципитации, вносят 20 мкл HiDi Formamid и загружают в генетический анализатор.

### **Анализ полученных результатов по определению мутаций резистентности ВИЧ-1.**

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.



Для определения мутаций резистентности используется база данных из интернета:

- Стэнфордская база данных (<http://hivdb.stanford.edu>);
- Лос-Аламосские базы данных (<http://hiv.net/link.php?id=25>);
- база данных "geno2pheno" (<http://geno2pheno.org>) или аналогичные компьютерные программы.