

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневич  
2015 г.  
Регистрационный №227-1215



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА  
ГЕПАТИТА С К ИНТЕРФЕРОНУ И РИБАВИРИНУ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ – РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: к.б.н., доцент Гасич Е.Л., д.м.н. Еремин В.Ф., Домнич С.В.,  
Немира А.С.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
21.12.2015  
Регистрационный № 227-1215

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ  
ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ИНТЕРФЕРОНУ И РИБАВИРИНУ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. Е.Л. Гасич, д-р мед. наук В.Ф. Еремин,  
С.В. Домнич, А.С. Немира

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод секвенирования core и NS5A участков генома ВГС, позволяющего определить мутации резистентности ВГС к лекарственным средствам противовирусной терапии (интерферону и рибавирину). Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение вирусного гепатита С.

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**

### **Оборудование и материалы для сбора клинических образцов:**

Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.

### **Оборудование для проведения ПЦР и секвенирования:**

1. Термоциклер.
2. Центрифуги с охлаждением на 14000 об./мин.
3. Центрифуга типа «Эппендорф».
4. ПЦР-боксы.
5. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания.
6. Гельдокументирующая система.
7. Три комплекта автоматических дозаторов.
8. Вортекс.
9. Твердотельный термостат.
10. Генетический анализатор.
11. Морозильник с температурой  $-20^{\circ}\text{C}$ .
12. Пластиковые пробирки (1,5; 0,2; 2 мл) и наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов (1–10; 10–100; 100–1000 мкл).

### **Реагенты для проведения ПЦР и секвенирования**

1. Праймеры.
2. Реагенты для обратной транскрипции (рэндом-гексамеры, обратная транскриптаза, ингибитор РНКаз, 5x буфер, смесь дезоксинуклеотидов, деионизированная вода).
3. Реагенты для проведения ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером,  $\text{Mg}^{2+}$ , смесь дезоксинуклеотидов, деионизированная вода).
4. Реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизированная вода).
5. HiDi Formamid.
6. Агароза.
7. Маркер молекулярного веса.
8. Колонки для очистки продуктов ПЦР.
9. Реагенты для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (смесь нуклеаз и фосфатаз).
10. Комплект реагентов для выделения РНК ВГС любого производителя.

11. Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Вирус гепатита С, устойчивый к действию интерферона и рибавирина.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Для определения мутаций резистентности ВГС к интерферону и рибавирину проводится секвенирование ПЦР-амплифицированной области участков генов core и NS5A.

#### *1. Правила забора, транспортировки и хранения клинических образцов*

Забор крови с ЭДТА и ее пробоподготовку осуществляют общепринятыми методами.

#### *2. Молекулярно-генетические исследования с целью определения мутаций резистентности ВГС к интерферону и рибавирину*

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

*Обратная транскрипция.* Обратная транскрипция по участкам генов core и NS5A ВГС проводится с рэндом-гексамерами в объеме 20 мкл по следующей прописи: смесь № 1: рэндом гексамеры — 100 пкмоль, исследуемый образец — 10 мкл. Добавить исследуемую РНК ВГС к праймеру, осторожно перемешать, поместить в термостат при температуре 65°C и прогреть пробу в течение 5 мин, охладить до 25°C. Приготовить смесь №2: 5x РТ-буфер, обратная транскриптаза — 40 U, смесь трифосфатов — 1 mM, ингибитор РНКаз — 20 U, бидистиллированная вода — 7,7 мкл. Осторожно перемешать и центрифугировать смеси №№ 1 и 2, поставить в амплификатор при 25°C на 10 мин, затем при 37°C в течение 60 мин, поместить на лед.

#### *Амплификация по участку гена core ВГС*

С полученной кДНК выполнены 2 раунда амплификации с парами праймеров, специфичных для участка гена, кодирующего core участок генома ВГС:

- для проведения 1 раунда ПЦР:

fw E14 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3' (поз. 60–624)

rw Cc11 5'-GCC ATA GTG GTC TGCGGA AC-3' поз.

- для проведения 2 раунда ПЦР:

fw E14 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3' (поз 172–604)

rw Cc9 5'-GCT AGC CGA GTA GTG TT-3'.

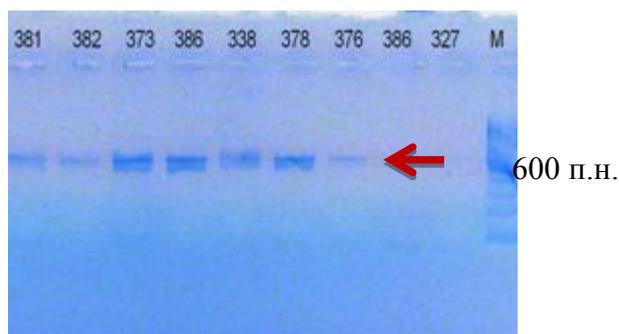
В состав реакционной смеси (25 мкл), необходимой для исследования одного образца ДНК, входят следующие компоненты:

1 раунд: MgCl<sub>2</sub> — 2,0 mM, смесь трифосфатов — 0,2 mM, праймеры по 0,5 — mM, 1x ПЦР-буфер, Taq-полимераза — 1,25 U, кДНК — 1 мкл. Режим

амплификации: 95°C — 5 мин; 95°C — 1 мин, 55°C — 1 мин, 72°C — 2 мин (35 повторов); 72°C — 7 мин.

2 раунд: MgCl<sub>2</sub> — 2,0 мМ, смесь трифосфатов — 0,2 мМ, праймеры по 0,5 мМ, 1x ПЦР-буфер, Таq-полимераза — 1,25 U, кДНК — 2 мкл. Режим амплификации: 95°C — 5 мин; 95°C — 1 мин, 55°C — 1 мин, 72°C — 2 мин (35 повторов); 72°C — 7 мин. В качестве отрицательного контроля используется деионизированная вода.

Результаты электрофоретической детекции амплификации фрагмента core участка генома ВГС представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1. — Результаты электрофоретической детекции core участка генома ВГС (381, 382, 373, 386, 338, 378, 376, 386, 327 исследуемые пробы; М — маркер молекулярного веса)**

#### *Амплификация по участку гена NS5A ВГС*

Праймеры для определения мутаций резистентности в NS5A участке ВГС разработаны для постановки в «гнездовом» варианте:

- для проведения 1 раунда ПЦР:

ISDR1 5'-ATG CCC ATG CCA GGT TCC AG-3' (поз. 6662–6681)

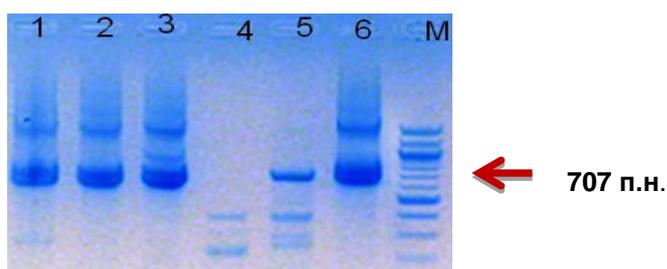
ISDR2 5'-AGC TCC GCC AAG GCA GAA GA-3' (поз. 7350–7369)

- для проведения 2 раунда ПЦР:

ISDR3 5'-ACC GGA TGT GGC AGT GCT CA-3' (поз. 6824–6843)

ISDR4 5'-GTA ATC CGG GCG TGC CCA TA-3' (поз. 7189–7268)

Концентрации ПЦР смеси и режим амплификации аналогичны амплификации core участка генома ВГС. Размер амплифицированного продукта составляет 707 п.н. (рисунок 2).



**Рисунок 2. — Результаты электрофоретической детекции: 1–5 — исследуемые пробы; М — маркер молекулярного веса**

### *Секвенирующая ПЦР:*

Специфические ампликоны очищают после ПЦР стандартными методами и проводят секвенирующую ПЦР. Состав реагентов:

- Big Dye terminator v.3.1;
- BD Dilution Buffer для ABI генетического анализатора;
- прямой и обратный праймеры (10 пкмоль) к core участку генома ВГС:  
fw E14 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3'  
rw Cc9 5'-GCT AGC CGA GTA GTG TT-3'
- прямой и обратный праймеры (10 пкмоль) к NS5A участку генома ВГС  
ISDR3 5'-ACC GGA TGT GGC AGT GCT CA-3'  
ISDR4 5'-GTA ATC CGG GCG TGC CCA TA-3'
- амплифицированный и очищенный образец;
- деионизированная вода.

### *Работа проводится на льду!*

Секвенирующая ПЦР в объеме 20 мкл по следующей прописи: 4,0 мкл прямого или обратного праймера (10 пкмоль), 1 мкл Bigdye terminator v.3.1, 1,5 мкл ПЦР продукта (концентрация 10 нг), 7 мкл Bigdye буфера, 6,5 мкл деионизированной воды. Режим амплификации: 96°C — 5 мин; 95°C — 10 с, 50°C — 5 с, 60°C — 2 мин (25 повторов); 4°C — хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от невключенных нуклеотидов методом преципитации.

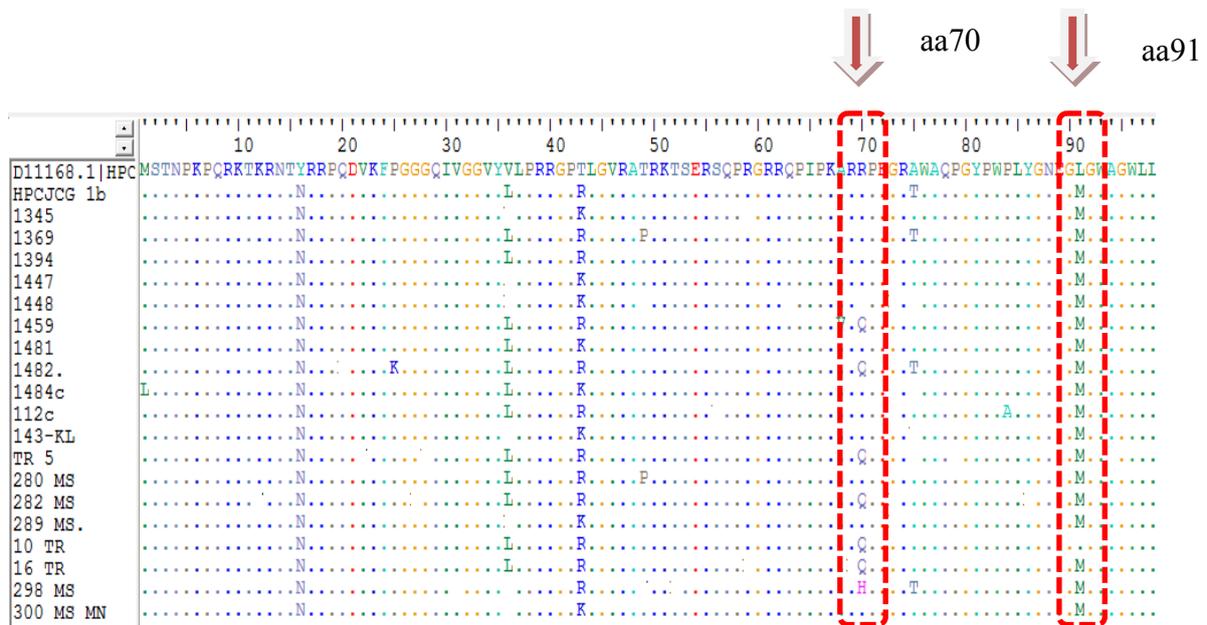
### *Секвенирование продуктов ПЦР*

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

### *Определение мутаций резистентности ВГС к рибавирину и интерферону*

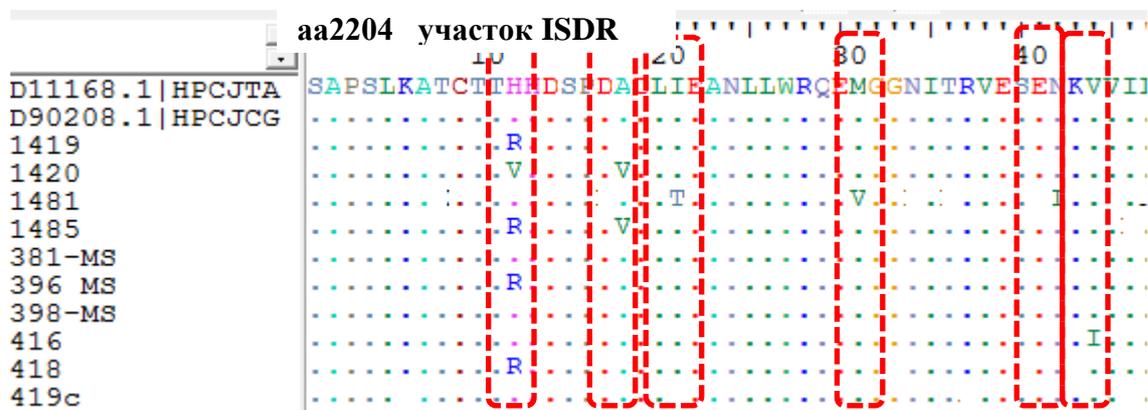
Выполнить биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза с помощью стандартного программного обеспечения. Для определения мутаций резистентности ВГС используются референсная нуклеотидная последовательности D11168.1|HPCJTA из Международной базы данных GenBank (рисунок 3).

В случае замены в позиции aa70 Arg на Gln/His и/или aa 91Leu на Met91 в core участке ВГС ожидается плохой ответ на терапию интерфероном и рибавирином (рисунок 3).



**Рисунок 3. — Аминокислотная последовательность core региона ВГС (позиции в геноме D11168.1 342 п.н.)**

Для определения чувствительности к интерферону (ISDR) проанализировать участок от 2209 до 2248 аминокислот NS5A участка ВГС-1b подгенотипа. В случае выявления более 2-х мутаций по данной области генома по сравнению с прототипным вариантов вируса (HPCJTA) ожидается успешный ответ на терапию (рисунок 4).



**Рисунок 4. — Аминокислотные последовательности ISDR участка NS5A региона ВГС**

Для определения резистентности ВГС к интерферону проанализировать аминокислотный участок в позициях от 2334 до 2379 (IRRDR). Значение IRRDR  $\geq 6$  считается предиктором достижения устойчивого вирусологического ответа на лечение интерфероном, в то время как определение IRRDR  $\leq 5$  свидетельствует о возможном негативном ответе на лечение (рисунок 5).

aa2334 участок IRRDR

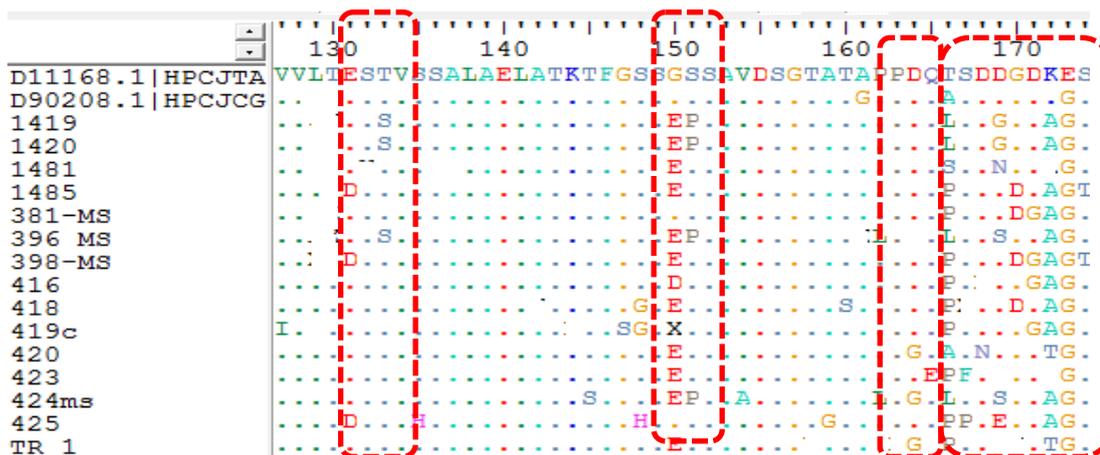


Рисунок 5. — Аминокислотные последовательности IRRDR участка NS5A региона ВГС

**ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Все реакции отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР-смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности
Ампликон в отрицательной пробе	Реагенты контаминированы
Нет специфического ампликона в исследуемой пробе несмотря на определяемую вирусную нагрузку	Вирусная нагрузка ниже 3000 копий РНК/мл