

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

А.А. Тарасенко

« 06 » 2022 г.

Регистрационный № 022-1221



МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ 1А И 3А ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С К
ИНГИБИТОРАМ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А.А. Тарасенко

10.06.2022

Регистрационный № 022-1221

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ 1А И 3А ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ИНГИБИТОРАМ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения мутаций резистентности вируса гепатита С (ВГС) 1a и 3a подгенотипов 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Для оказания комплекса медицинских услуг, направленных на диагностику ВГС-инфекции (МКБ В18.2).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ДР

Изделия медицинской техники:

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;

гельдетектирующая система;

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

вортекс;
твёрдотельный термостат;
генетический анализатор;
холодильник с морозильной камерой (от +4⁰С до +8⁰С, от минус 18⁰С до минус 20⁰С);
бактерицидная лампа.

Изделия медицинского назначения:

пробирки стерильные пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл);
микропробирки для проведения ПЦР (0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;
вакутайнеры с ЭДТА для забора крови;
наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;
набор реагентов для выделения РНК;
реагенты для проведения обратной транскрипции (10x TG-буфер, 20 мкМ случайный гексамер, 25 мМ dNTPs, 50 мМ MgCl₂, 40U ингибитор РНКаз, 200U обратная транскриптаза);
реагенты для проведения ПЦР (5 ед/мкл Taq полимераза; 10x буфер для полимеразы, хлорид магния 50 мМ, смесь дНТФ 2 мМ, олигонуклеотидные праймеры 10мМ, вода стерильная, свободная от нуклеаз);
реагенты для проведения электрофоретической детекции (агароза для электрофореза, маркер молекулярного веса 50-1500 п.о., ТАЕ-буфер, бромистый этидий);
реагенты для проведения очистки продуктов после ПЦР;
реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (2мМ прямой или обратный праймер, Big dye terminator v.1.1, 5x Big Dye буфер, деионизованная вода);

реагенты для проведения очистки продуктов после секвенирующей ПЦР;

штативы для пробирок;

халаты, перчатки резиновые;

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

ТЕХНОЛОГИЯ МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ 1А И 3А ПОДГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С К ИНГИБИТОРАМ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА

Этап 1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала.

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.

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». Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Образцы плазмы крови хранятся в течение 5 суток при температуре от 2°C до 8°C или 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.

Этап 2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления мутаций лекарственной устойчивости 3а и 1а подгенотипов ВГС к лекарственным средствам прямого действия

1. Выделение РНК ВГС из плазмы

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

2. Диагностическая амплификация *NS3/4A*, *NS5A*, *NS5B* участков генома 3а и 1а подгенотипов ВГС с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием

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

2.1 Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации *NS3/4A*, *NS5A*, *NS5B* участков генома 3а и 1а подгенотипов ВГС

Реакция обратной транскрипции выполняется в общем объеме 25 мкл со случайными гексамерами по следующе прописи: деионизированная вода, 10х TG-буфер, 20 мкМ случайного гексамера, 25 мМ dNTPs, 50 мМ MgCl₂, 40U ингибитора РНКаз, 200U обратной транскриптазы и 10 мкл исследуемой РНК.

Обратная транскрипция проводится в следующем режиме: 25°C – 10 минут, 54 °C – 15 минут при 85°C и 5 минут, хранение при 4°C.

Для амплификации используют праймеры, представленные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Пары праймеров для амплификации *NS3/4A*, *NS5A* и *NS5B* участков генома ВГС 3а подгенотипа

Участок генома ВГС	Номер раунда	Название праймера	Размер фрагмента	Последовательность
NS3	1	F_3a R_3a	1036	F 5'-GAYCACCTAGCRCCAATGCAACA-3' R 5'-TAGGTGGARTAGGTCAGTTTRGCAC CAGTTG-3'
	2	3a_F_NS3 3a_R_NS3	582	F 5'- GGCCTTCTTGGGACTATTGTGACC-3' R 5'- CGGTCGGGGCATGAAGRTACC -3'
NS5A	1	F5A_MC R5A_MC	979	F 5'- TGGATGAACAGGCTCATYGC -3' R 5'- ATGTTGCTGCCCATCTCTTG -3'
	2	F15A_MC R15A_MC	814	F 5'- GTYCCCGAGAGCGATGCTYGC -3' R 5'- AGTTGGCTGGCRGATGAGCTTGC -3'
NS5B	1	F5B_FC 1700_R	1493	F 5'- GGAGGTAAAGGAGCGAGCG -3' R 5'- GCACGAGACAGGCTGTG -3'
	2	F5B_JS 1700_R	1340	F 5'- CTCCGTM TGGGAGGACYTG -3' R 5'- GCACGAGACAGGCTGTG -3'

Таблица 2 – Пары праймеров для амплификации *NS3/4A*, *NS5A* и *NS5B* участков генома ВГС 1а подгенотипа

Участок генома ВГС	Номер раунда	Название праймера	Размер фрагмента	Последовательность
NS3/4A	1	3276_F 4421_R	1145	F 5'-ATGGAGACCAAGCTCATCAC-3' R 5'-CAAGGAACCTTGCCGTAGGT-3'
	2	3420_F 4038_R	618	F 5'-GCGTACGCCAGCAGAC-3' R 5'-CGGGACCTTGGTGCTCTTYCC-3'
NS5A	1	6279_F 6599_R	320	F 5'-GACATCTGGGACTGGATATGC-3' R 5'-ATTCCTCTGCAGACACCCTCC-3'
	2	6285_F 6590_R	305	F 5'-GACTGGATATGCGAGGTG-3' R 5'-CCACAGCGCGAACKTATAG-3'
NS5B	1	8445_F 1702_R	860	F 5'-AGCGGCGTACTGACAACCTAG-3' R 5'-CCGGGCATGAGACACGCTG-3'
	2	8467_F 1702_R	838	F 5'-GTGGTAACACCCTCACTTG-3' R 5'-CCGGGCATGAGACACGCTG-3'

Для амплификации *NS3/4A*, *NS5A* и *NS5B* фрагментов проводится «гнездовая» ПЦР. Объем реакционной смеси 25 мкл со следующими компонентами ПЦР: 10х буфер А, 50 мМ MgCl₂, 2 мМ смесь дНТФ, 10мМ праймеры (прямой и обратный), 5 Ед/мкл полимеразы, деионизованная вода. Временные и температурные режимы следующие: 95° 5 минут, затем 35 циклов 95° 30 секунд, Х° 30 секунд (где Х°С – это температура отжига праймеров, которые представлены в таблице 3 и 4 для ВГС 3а и 1а подгенотипов соответственно) и 72° 1 минута, затем 72° 7 минут.

Таблица 3 – Температуры отжига праймеров для фрагментов *NS3*, *NS5A*, *NS5B* генома ВГС 3а субтипа

Участок генома ВГС	Номер раунда ПЦР	Название праймера	Температуры отжига праймеров
NS3	1	F_3a_3217/R_3a_3217	63°C
	2	3a_F_NS3/3a_R_NS3	65°C
NS5A	1	3a_F5A_MC/3a_R5A_MC	63°C
	2	3a_F15A_MC/3a_R15A_MC	60°C
NS5B	1	3a_F5B_FC/1700_R	60°C
	2	3a_F5B_JS/1700_R	64°C

Таблица 4 – Температуры отжига праймеров для фрагментов *NS3*, *NS5A*, *NS5B* генома ВГС 1а субтипа

Участок генома ВГС	Номер раунда ПЦР	Название праймера	Температуры отжига праймеров
NS3	1	3276_F/4421_R	55°C
	2	3420_F/4038_R	57°C
NS5A	1	6279_F/6599_R	53°C
	2	6285_F/6590_R	58°C
NS5B	1	8445_F/1702_R	54°C
	2	8467_F/1702_R	54°C

Анализ продуктов амплификации осуществляется 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 3a и 1a подгенотипов представлены на рисунках 1, 2.

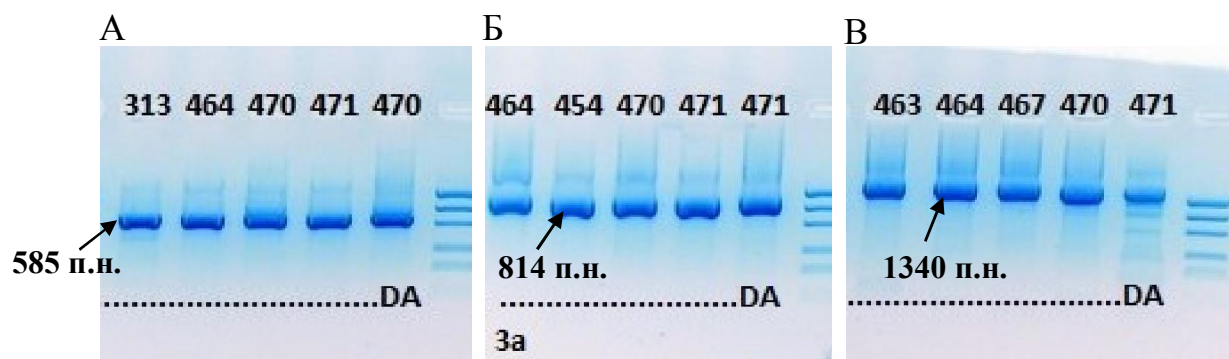


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции амплифицированных фрагментов *NS3/4A* (А), *NS5A* (Б) и *NS5B* (В) участков генома 3a

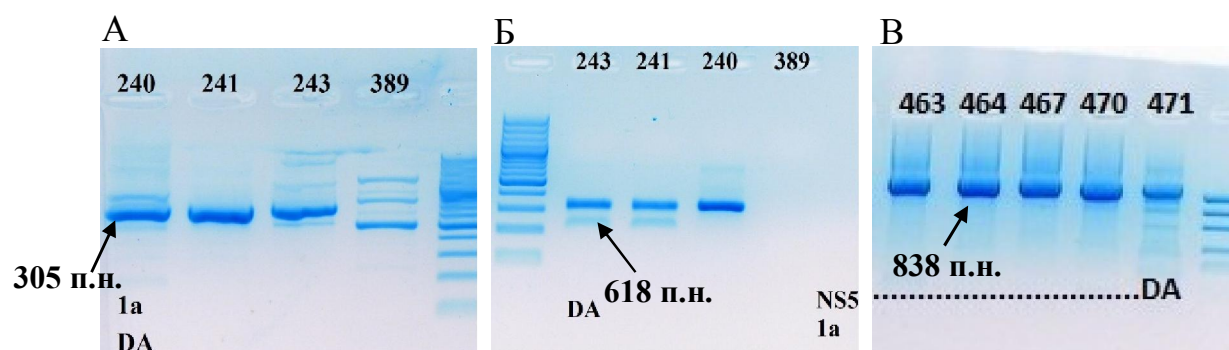


Рисунок 2 – Результаты электрофоретической детекции амплифицированных фрагментов *NS3/4A* (А), *NS5A* (Б) и *NS5B* (В) участков генома 1a

3. Очистка продуктов амплификации

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

4. Секвенирующая ПЦР

Секвенирующая ПЦР в объеме 10 мкл по следующей прописи: 2мМ прямого или обратного праймера, Big dye terminator v.1.1, 10 нг ПЦР продукта, Big Dye буфер, деионизованная вода. Режим амплификации: 96°C – 5 минут; 95°C – 10 секунд, 50°C – 5 секунд, 60°C – 2 минуты (25 повторов); 4°C – хранение. Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации. К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешать 5 секунд на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок эппендорфов. Поместить пробирки в термостат при 95°C на 2 минуты. Немедленно образцы поместить на лед. Подготовленные пробы внести по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

5. Определение мутаций резистентности к лекарственным средствам прямого действия

Биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза выполняется с помощью стандартного программного обеспечения.

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

В результате анализа определили спектр аминокислотных замен, характерных для 3а, в том числе замен, в результате которых появляется устойчивость к лекарственным средствам прямого противовирусного действия. Ниже представляется пример анализа секвенированных последовательностей по различным участкам генома ВГС 3а субтипа, полученных от образцов пациентов, проживающих в Республике Беларусь (Рисунки 2,3,4).

Sequence Information		
Identifier:	HCV_2019_NS3 - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	
Genetic region:	NS3	
Predicted subtype:	3a (Similarity of DNA to closest reference = 93.92%)	
Codons covered in <i>NS3</i> region:	1 - 181	
Mutations in <i>NS3</i> region:	V48I, I52M, A98T, S102A, S166A	
Reference used:	D17763	
Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	not available	not licensed for subtype
Boceprevir	not available	not licensed for subtype
Glecaprevir	none	susceptible
Grazoprevir	not available	not licensed for subtype
Paritaprevir	not available	not licensed for subtype
Simeprevir	not available	not licensed for subtype
Telaprevir	not available	not licensed for subtype
Voxilaprevir	none	susceptible
Detailed Mutation Information		

Рисунок 2 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце HCV_2019 к ингибиторам NS3/4A ВГС 3a субтипа с использованием программы geno2pheno

HCV_2019_NS5A - (Headerless_pasted_FASTA_sequence) - Ali		
ref nt: AGCGACGATTGGCTACGTACCATCTGGGACTGGGTTTGCTCGGTGTGGCCGACTTCAAGGCATGGCTCTCTGCTAAGATTATGCCAGCGCTCCCTGGGCTGCCCTTCATTTCCTGTCAA	120	
ref aa: S D D W L R T I W D W V C S V L A D F K A W L S A K I P A L P G L P F I S C Q	40	
query aa: S G D W L R T I W D W V I I V L S D F K I W L S A K I P A L P G L P F I S C Q		
query nt: AGCGGTGATTGGCTGCTACCATCTGGGACTGGGTTTACTACAGTATTGTCTGACTTCAAGACATGGCTCTCTGCTAAGATTATGCCAGCGCTCCCTGGGCTGCCCTTCATTTCCTGTCAA		
ref nt: AAGGGATACAAGGGCGTGTGGCGGGGGACGGTGTGATGTCAACACGCTGTCTTGGGGGACGCAATAACTGGCCATGTGAAGAAGCGGTCATGCGGCTTGACGGGCGCGTACATGT	240	
ref aa: K G Y K G V W R G D G V M S T R C P C G A A I T G H V K N G S M R L A G P R T C	80	
query aa: K G Y K G V W R G D G V M S T R C P C G A S I A G H V K N G S M R L A G P R T C		
query nt: AAGGGATACAAGGGCGTGTGGCGGGGGACGGTGTGATGTGACACGCTGTCTTGGGGGACATCAATAGCCGCCATGTGAAGAATGGGTCATGCGGCTGCGAGGGCGCGCACATGT		
ref nt: GCTAACATGTGGCACGGTACTTTCCCATCAATGAGTACACCCGACCCACGACACCTTGCCCATCACCAACTACACTCGCGCACTATGGCGCGTGGCTGCCAACAGCTACGTTGAG	360	
ref aa: A N M W H G T F P I N E Y T T G P S T P C P S P N Y T R A L W R V A A N S Y V E	120	
query aa: A N M W Y G T F P I N E H T T G P S T P C P S P N Y T R A L W R V A A N S Y V E		
query nt: GCCAACATGTGGTACGGCACCTTCCCATCAATGAGTACACCCGACCCAGTACACCTTGCCCATCACCAACTACACTCGCGCGCTATGGCGCGTGGCTGCCAACAGCTACGTTGAG		
ref nt: GTGCGTGGGTTGGGGGACTTCCATTACATCACGGGGGCCACAGAAGTAGAGCTCAAGTGTCCGTGCCAAGTGCCGGCTGCTGAGTTCTTTACTGAAGTGGATGGAGTGAGACTTCACCGC	480	
ref aa: V R R V G D F H Y I T G A T E D E L K C P C Q V P A A E F F T E V D G V R L H R	160	
query aa: V R R V G D F H Y I T G A T E D E L K C P C Q V P A A E F F T E V D G V R L H R		
query nt: GTGCGCGGGTGGGGGACTTCCATTACATTACAGGGGCTACAGAAGACGAGCTCAAGTGTCCGTGCCAAGTGCCGGCTGCTGAGTTCTTTACTGAAGTGGATGGGTTGAGGCTTCACCGC		
ref nt: TACGCCCCCTCCATGAAGCCCTGTTGAGAGATGATACATTTACGTAGGGTTGCATTCTACACGATAGGATCTCAACTCCCCTGTGAGCCAGAACCGGATGTCTCTGTGCTGACC	600	
ref aa: Y A P P C K P L L R D D I T F M V G L H S Y T I G S Q L P C E P E P D V S V L T	200	
query aa: Y A P P C K P L L R D E I T F I V G L N S Y A I G S Q L P C E P E P D V S V L T		
query nt: TACGCTCTCCATGTAACCCCTGTTGAGGGATGAGATCACTTACGGTAGGGTTGAATTCCTATGCAATAGGATCTCAACTCCCCTGTGAGCCGAACAGATGTCTCTGTGCTGACC		
ref nt: TCGATGTTGAGAGACCCCTTCCCATATCACCGCCGAGACG	639	
ref aa: S M L R D P S H I T A E T	213	
query aa: S M L R D P S H I T A E T		
query nt: TCGATGTTGAGAGACCCCTTCCCATATCACCGCCGAGACG		

Рисунок 3 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце HCV_2019 с использованием программы geno2pheno по NS5A участку генома ВГС 3a субтипа

Sequence Information		
Identifier:	DA_525_NS5B - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	
Genetic region:	NS5B	
Predicted subtype:	3a (Similarity of DNA to closest reference = 93.58%)	
Codons covered in NS5B region:	145 - 543 (Important positions not covered: 553,554,556)	
Mutations in NS5B region:	P189S, L205M, K212R, S282T, K304R, N307G, A356APST, D376N, G378AEGV, T451V, K519R, N535K, T537IN	
Warnings NS5B region:	Sequence contains insertions.	
Reference used:	D17763	
Information NS5B region:	You submitted the reverse complement!	
Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Dasabuvir	not available	not licensed for subtype
Sofosbuvir	282T	resistant
Detailed Mutation Information		
Sofosbuvir	Mutation	Resistance analysis
	282T	resistant
Interpretation of Resistance Classes		
Resistance class	Description	
Resistant	Well-characterized resistance-associated mutation	
Reduced susceptibility	Association to resistance, insufficient evidence for clinical outcome (characterized resistance variant in other HCV genotypes)	
Substitution on scored position	Uncharacterized substitution on a scored position	
Susceptible	Активация Windows Чтобы активировать Windows, перейдите в "Параметры".	
Not licensed for genotype	Drug not licensed for the predicted genotype.	
<pre>ref nt: CAATGCTGTAACCTTGAACCGGAGGCCAGGAAAGTGATCTCTCCCTCAGGAGCGGCTTTACTGCGGAGGCCCTATGTTCAACAGCAAGGGGGCCAGTGTGGTTATCGCCGTGCGCT 840 ref aa: Q C C N L E P E A R K V I S S L T E R L Y C G G P M F N S K G A Q C G Y R R C R 280 query aa: Q C C N L E P E A R K V I S S L T E R L Y C G G P M F N S K G A Q C G Y R R C R query nt: CAATGCTGCAACCTTGAACCGGAGGCCAGGAAAGTGATTTCTCCCTCAGGAGCGGCTTTACTGCGGGGGCCCTATGTTTAAACAGCAAGGGGGCCAGTGTGGTTATCGCCGTGCGCT Замена S282T ref nt: GCGAGTGGAGTTCTGCCTACCAGCTTCGGCAACACAATCACTTGTACATCAAGGCCACAGCGGCTGCAAGGCCGCAACCTCCGGAACCCGG-ACCTTCTGTCTGCGGAGATGATTG 960 ref aa: A S G V L P T S F G N T I T C Y I K A T A A A K A A N L R N P D F L V G D D L 320 query aa: A I G V L P T S F G N T I T C Y I K A T A A A B A A G L R N P D F L V G D D L query nt: GCGACTGGAGTTCTGCCTACCAGCTTTGGCAACACGATCACTTGTCTACATCAAGGCCACAGCGGCCGAGGGCCGAGGGCCGAGGCCCTCCGGAACCCGGGACTTCTTGTCTGCGGAGATGATTG</pre>		
<pre>ref nt: GTCGTGGTGGCTGAGAGTGAT-GGCGTCGATGAGGATAGAGCAGCCCTGAGAGCCTTCAGGAGGCTATGA-CCAGGTATTCTGCTCCACCC-GGAGATGTCC-ACAGGCC-ACCTACGACCTT 1080 ref aa: V V V A E S D G V D E D R A A L R A F T E A M T R Y S A P P G D A P Q A T Y D L 360 query aa: V V V A E S D G V D E D R A A L R A F T E A M T R Y S A P P G D A P Q 2 T Y D L query nt: GTCGTGGTGGCTGAGAGTGATNGCGCTGATGAGGATAGAGCAGCCCTGAGAGCCTTCAGGAGGCTATGANCCAGGTACTCTGCTCCACCCCGGAGATGCCCCACAGNCCCACTTACGACCTT</pre>		
<pre>ref nt: GAGCTTATCACATCTTGCTCTCCAACGCTCCCGTGG-CACGGGACGAC-AAGGGGAGGAGGTACTATTACCTCACCCGTGATGCCACTACTCCCTAGCCCGTGGCGGCTTGGGAAACAGCT 1200 ref aa: E L I T S C S S N V S V A R D D K G R R Y Y L T R D A T T P L A R A A W E T A 400 query aa: E L I T S C S S N V S V A R D N K 2 R R Y Y Y L T R D A T T P L A R A A W E T A query nt: GAGCTTATTACATCTTGCTCTCCAACGCTCCCGTGGGACGCGGACAACGAAGNGAGGAGGTACTATTACCTCACCCGTGATGCCACTACTCCCTAGCCCGCGCGGCTTGGGAAACAGCT</pre>		

Рисунок 4 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце DA_525 с использованием программы geno2pheno по NS5B участку генома ВГС 3a субтипа

На рисунках указаны наиболее распространенные варианты аминокислотных замен. После анализа последовательностей значимых аминокислотных замен, влияющих на эффективность лечения ингибиторами интегразы, в NS3/4A участке генома ВГС 3a подгенотипа не обнаружили. В NS5A участке генома ВГС, наиболее распространенными заменами, влияющими на эффективность лечения ингибиторами NS5A белка, являются замены Y93H+A/E62Q/T/S/L/K и Y93H. В NS5B участке генома ВГС были обнаружены единственную замену – S282T, отвечающая за потерю чувствительности к софосбувиру.

В *NS3/4A* участке генома ВГС 1a подгенотипа наиболее часто встречаемыми аминокислотными заменами являются R155K+R174N и Q80K. Для *NS5A* участка такой заменой является M28V. В *NS5B* участке генома ВГС значимых мутаций среди исследованных образцов не обнаружили. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей DA_448 и DA_323, секвенированных по *NS3/4A*, *NS5A* и *NS5B* участкам генома ВГС с помощью on-line программы geno2pheno представлены на рисунках 5, 6 и 7.

Sequence Information		
Identifier:	DA_448_NS3 - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	
Genetic region:	NS3	
Predicted subtype:	1a (Similarity of DNA to closest reference = 95.64%)	
Predicted clade of subtype:	II (similarity of DNA to closest reference = 95.64%)	
Codons covered in <i>NS3</i> region:	29 - 181	
Mutations in <i>NS3</i> region:	P67S, S174N	
Warnings <i>NS3</i> region:	Sequence contains insertions.	
Reference used:	HQ850279	
Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	none	susceptible
Boceprevir	174N	substitution on scored position
Glecaprevir	none	susceptible
Grazoprevir	none	susceptible
Paritaprevir	none	susceptible
Simeprevir	none	susceptible
Telaprevir	174N	substitution on scored position
Voxilaprevir	none	susceptible
Detailed Mutation Information		

Рисунок 5 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце DA_448 к ингибиторам NS3/4A ВГС 1a субтипа с использованием программы geno2pheno

Sequence Information		
Identifier:	DA_323_NS5A - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	
Genetic region:	NS5A	
Predicted subtype:	1a (Similarity of DNA to closest reference = 96.18%)	
Predicted clade of subtype:	II (similarity of DNA to closest reference = 96.18%)	
Codons covered in NS5A region:	10 - 113	
Mutations in NS5A region:	R48Q	
Warnings NS5A region:	Sequence contains insertions.	
Reference used:	HQ850279	
Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Daclatasvir	none	susceptible
Elbasvir	none	susceptible
Ledipasvir	none	susceptible
Ombitasvir	none	susceptible
Pibrentasvir	none	susceptible
Velpatasvir	none	susceptible
Detailed Mutation Information		
		Accession Window

Рисунок 6 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце DA_323 к ингибиторам NS5A ВГС 1a субтипа с использованием программы geno2pheno

Sequence Information		
Identifier:	DA_448_NS5B - (Headerless_pasted_FASTA_sequence)	
Genetic region:	NS5B	
Predicted subtype:	1a (Similarity of DNA to closest reference = 94.94%)	
Predicted clade of subtype:	II (similarity of DNA to closest reference = 94.94%)	
Codons covered in NS5B region:	314 - 549 (Important positions not covered: 282,553,554,556)	
Mutations in NS5B region:	Q330P, C335S, A421V, N470S, K510R, W528GRW, A541T	
Reference used:	HQ850279	
Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Dasabuvir	none	susceptible
Sofosbuvir	none	susceptible
Detailed Mutation Information		

Рисунок 7 – Результаты определения лекарственной устойчивости в образце DA_448 к ингибиторам NS5B ВГС 1a субтипа с использованием программы geno2pheno

6. Заключение

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 5.

Таблица 5 – 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 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.