

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь
А.А. Тарасенко
« 06 » 2022 г.
Регистрационный № 026-1221



АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ ДОМИНИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ
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 № 026-1221

АЛГОРИТМ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ ДОМИНИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ
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 алгоритм молекулярно-генетического определения лекарственной устойчивости доминирующих генетических вариантов вируса гепатита С к ингибиторам репликации *NS3/4A*, *NS5A*, *NS5B* белков вируса.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-инфекционистов, врачей-эпидемиологов 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 полимеразной цепной реакции (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;

твердотельный 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 mM dNTPs, 50 mM MgCl₂, 40U ингибитор РНКаз, 200U обратная транскриптаза);

реагенты для проведения ПЦР (5 ед/мкл Таq полимераза; 10x буфер для полимеразы, хлорид магния 50 mM, смесь дНТФ 2 mM, олигонуклеотидные праймеры 10mM, 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 (2mM 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.

1 ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Основной целью терапии вируса гепатита С (ВГС) является улучшение качества и продолжительности жизни пациентов посредством эрадикации вируса, что в клинической практике соответствует устойчивому вирусологическому ответу (УВО). УВО характеризуется полным отсутствием вирусной РНК в крови в контрольных точках лечения – через 12 и 24 недели после окончания курса лекарственными средствами (ЛС).

До начала выполнения исследований изучаются данные анамнеза пациента с ВГС-инфекцией (сведения об опыте лечения лекарственными средствами интерфероновой и безинтерфероновой схем, степень фиброза, цирроза и другие). Исследования на наличие мутаций лекарственной устойчивости проводятся отдельно для каждого из подгенотипов (1a, 1b, 2 субтипа, 3a подгенотипа и рекомбинантной формы RF_2k1b) ВГС к лекарственным средствам прямого противовирусного действия (ЛСППД).

Алгоритм, изложенный в данной инструкции, включает следующие этапы.

Этап 1. Детекция молекулярно-генетических маркеров ВГС у пациентов до начала лечения

Цель этапа – мониторинг молекулярно-генетических маркеров до начала лечения.

Количественное определение вирусной нагрузки в крови пациента, выраженное в копиях РНК/мл или международных единицах (МЕ/мл)

Определение субтипа вируса. В случае выявления 2 генотипа необходимо проведение генотипирования по *NS5B* участку генома вируса с целью выявления циркулирующей рекомбинантной формы RF_2k/1b.

Определение мутаций лекарственной устойчивости ВГС к ЛСППД: у пациентов с тяжелыми заболеваниями печени (цирроз, гепатоклеточная карцинома), неудачного опыта предыдущего применения лекарственных средств интерфероновой терапии.

Этап 2. Детекция молекулярно-генетических маркеров ВГС у пациентов во время лечения

Цель этапа – мониторинг эффективности лечения во время приема схем.

Количественное определение вирусной нагрузки с порогом детекции тест-системы 15 МЕ/мл после начал лечения:

- после 4-й недели лечения
- после 16- недельного лечения
- после 24-недельного лечения

Оценка и интерпретация результатов исследования: выявление определяемой вирусной нагрузки указывает на необходимость определения лекарственной устойчивости ВГС к ЛСППД. Выявление клинически значимых мутаций указывает на необходимость изменения схем лечения пациента.

Этап 3. Детекция молекулярно-генетических маркеров ВГС у пациентов через 12 и 24 недели после окончания терапии.

Цель этапа – мониторинг эффективности лечения через 12 и 24 недели после окончания терапии.

Количественное определение вирусной нагрузки с порогом детекции тест-системы 15 МЕ/мл через 12 и 24 недели после окончания терапии.

Оценка и интерпретация результатов исследования: выявление определяемой вирусной нагрузки указывает на необходимость определения лекарственной устойчивости ВГС к ЛСППД.

Этап 4. Детекция молекулярно-генетических маркеров ВГС у пациентов, не достигших устойчивого вирусологического ответа после окончания терапии (рецидив, повторное заражение).

Цель этапа – выявление случаев рецидива заболевания или повторного инфицирования.

Существует несколько причин, из-за которых наблюдается повторное обнаружение вирусной РНК в крови пациента – рецидив или реинфекция. Отличить один случай от другого можно только с помощью филогенетического анализа, с использованием биоинформационных методов. При этом проводится повторное определение субтипа ВГС для установление филогенетических связей между первой и второй пробой пациента. Анализ выполняется согласно инструкции по применению «Генотипирование методом секвенирования вируса гепатита С: инструкция по применению № 252-1213 утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.07.2014 г.».

Детекция РНК ВГС после достижения устойчивого вирусологического ответа через 24 недели и более.

Определение мутаций лекарственной устойчивости к ЛСППД.

Определение субтипа вируса у пациентов, ранее достигнувших устойчивый вирусологический ответ при применении ЛСППД, в группе с высоким риском повторного инфицирования (лица, употребляющие инъекционные наркотики; мужчины, имеющие секс с мужчинами; работники коммерческого секса; лица, находящиеся в учреждениях пенитенциарной системы).

Оценка и интерпретация результатов исследования: выявление определяемой вирусной нагрузки указывает на необходимость определения лекарственной устойчивости ВГС к ЛСППД. Выявление клинически значимых мутаций, обуславливающих неэффективность применяемых лекарственных средств указывает на необходимость изменения схемы лечения с учетом полученных результатов и в соответствии клиническим протоколом «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с хроническими вирусными гепатитами В и С» (Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь №19 от 2019.03.19).

Алгоритм исследования с целью выявления мутаций устойчивости в *NS3/4A*, *NS5A*, *NS5B* участках генома ВГС представлен на рисунке 1.

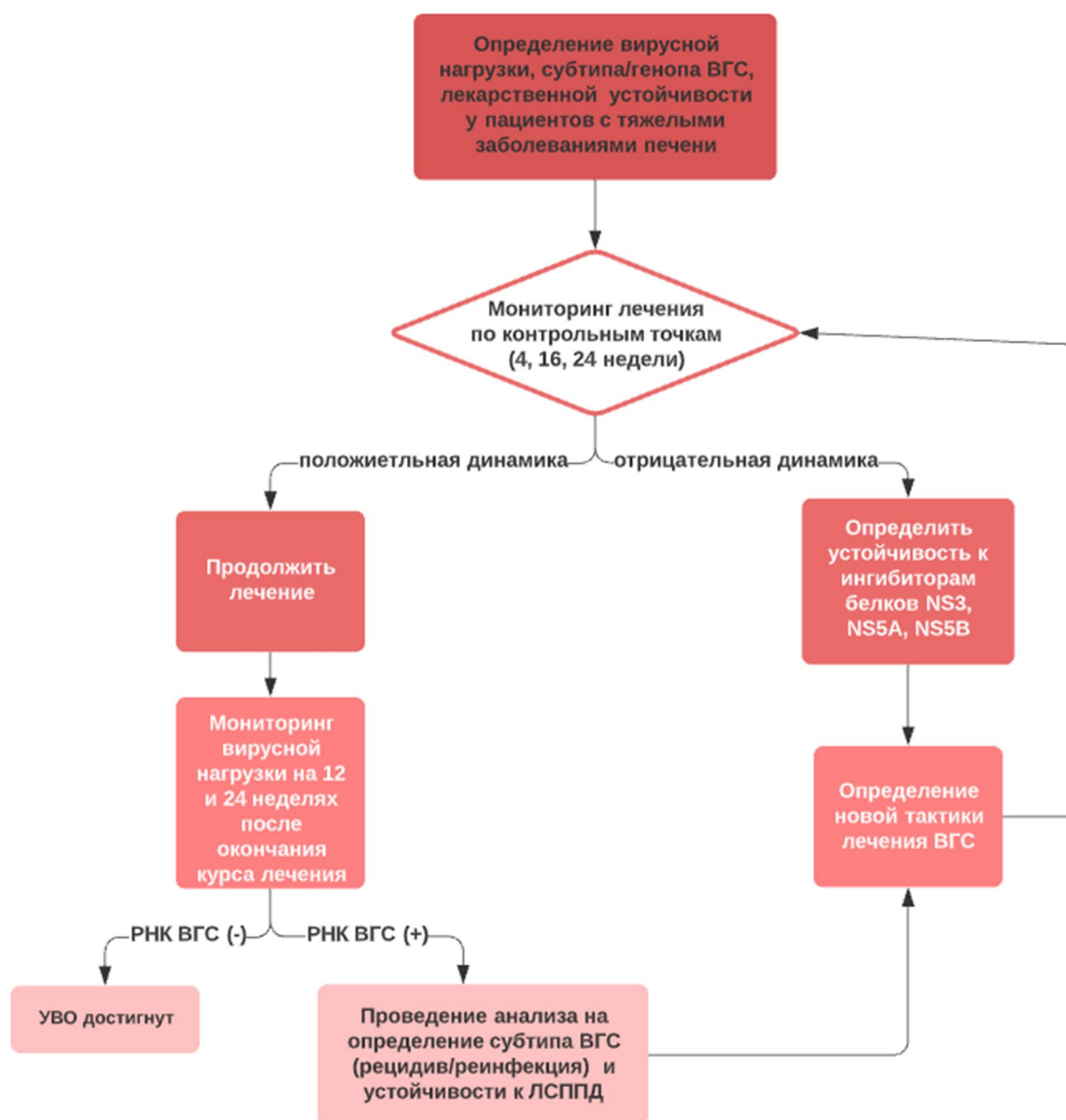


Рисунок 1 – Алгоритм выявления мутаций устойчивости в *NS3/4A*, *NS5A*, *NS5B* участках генома ВГС

Отбор, транспортировка и хранение биологического материала

Взятие периферической венозной крови следует производить натощак 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).

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 РБ 6 января 2017 г., № 2.

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований. Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по проведению лабораторных исследований.

Ошибки при выполнении собственно лабораторных исследований, связанные с несоблюдением протоколов исследований, использованием реагентов, утративших активность, загрязнением исследуемых образцов продуктами реакций и др. Для предупреждения таких ошибок необходимо соблюдать протоколы исследований, контролировать сроки годности реагентов, использовать контрольные материалы и образцы.

Ошибки, связанные с неправильной интерпретацией полученных результатов. Для предупреждения ошибок в интерпретации результатов лабораторных исследований необходимо обучение и повышение квалификации специалистов.