

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**АЛГОРИТМ НАЗНАЧЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ
ПАЦИЕНТАМ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С
НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С
И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет», учреждение «Гомельская областная инфекционная клиническая больница»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В.М. Мицура, канд. мед. наук, доц. Е.В. Воропаев, д-р мед. наук, проф. С.В. Жаворонок, О.В. Осипкина, Д.В. Терешков

Гомель, Минск 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

27.11.2014

Регистрационный № 136-1114

**АЛГОРИТМ НАЗНАЧЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ
ПАЦИЕНТАМ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С
НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С
И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-28В**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет», учреждение «Гомельская областная инфекционная клиническая больница»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В.М. Мицура, канд. мед. наук, доц. Е.В. Воропаев, д-р мед. наук, проф. С.В. Жаворонок, О.В. Осипкина, Д.В. Терешков

Гомель, Минск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм назначения стандартного интерферона (далее — ИФН) и пегилированного интерферона (далее — ПЭГ-ИФН) в сочетании с рибавирином (далее — РБВ) пациентам с хроническим вирусным гепатитом С (далее — ХВГС) на основе определения генотипов вируса гепатита С (далее — ВГС) и полиморфизма гена интерлейкина-28В (далее — ИЛ-28В). Данный алгоритм позволит выбрать оптимальный вариант противовирусного лечения ХВГС, исходя из клинической эффективности (достижение стойкого вирусологического ответа — СВО) и экономической целесообразности.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих помощь пациентам с ХВГС.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Определение полиморфизма гена ИЛ-28В, а именно единичных нуклеотидных замен в зонах rs12979860 и rs8099917, проводят методом полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) в варианте ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) или с помощью коммерческих наборов. В таблице 1 приведен перечень оборудования, необходимого для выявления полиморфизма гена ИЛ-28В методом ПЦР-ПДРФ, включающего стадии выделения, амплификации и рестрикции с детекцией продуктов методом гель-электрофореза.

Таблица 1. — Набор оборудования для исследований методом ПЦР-ПДРФ

Наименование оборудования и основные характеристики
<i>Выделение ДНК</i>
Высокоскоростная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25°C
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10-+99°C)
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100-1000 мкл)
Насос с колбой-ловушкой
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера (диапазон рабочих температур -16--18°C)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот
УФ-стерилизатор или его аналог
<i>Проведение ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер), предназначенный для проведения ПЦР
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50 (2 шт.); 20–200; 100–1000 мкл)
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10-+99°C)

Наименование оборудования и основные характеристики
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера (диапазон рабочих температур -16--18°C)
<i>Проведение рестрикции</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20-200 мкл)
Термостатирующий шкаф с температурным диапазоном +25–80°C
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера (диапазон рабочих температур -16--18°C)
<i>Анализ результатов амплификации и рестрикции методом электрофореза</i>
Система для геле-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
Микроволновая печь или электрическая плитка для приготовления агарозных гелей
Весы лабораторные для взвешивания реактивов массой от 100 мг до 500 г
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200 мкл)
УФ-транслюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера (диапазон рабочих температур -16--18°C)

Также необходимы следующие расходные материалы: халаты, резиновые перчатки, наконечники для пипеток с фильтром объемом 10; 20; 200; 1000 мкл, наконечники без фильтра, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

В таблице 2 приведен список основных реагентов для анализа методом ПЦР-ПДРФ. Качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-генетических исследований.

Таблица 2. — Список основных реагентов, необходимых для ПЦР-ПДРФ

Название реагента	Применение
Агароза	Компонент агарозного геля для электрофореза
Ацетат аммония	Выделение ДНК
Борная кислота	Компонент электрофоретического буфера
Бромид цетилтриметиламмония	Выделение ДНК
Бромид этидия	Окраска ДНК
Бромфеноловый синий	Электрофоретический маркер
Вода деионизированная	Широкий спектр применения
Глицерин	Широкий спектр применения
Термостабильная ДНК-полимераза	Компонент ПЦР-смеси
Изопропанол	Выделение ДНК

Название реагента	Применение
Лаурилсульфат натрия	Выделение ДНК
Маркер молекулярной массы	Электрофоретический маркер
дНТФ (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ)	Компонент ПЦР-смеси
Праймеры (олигонуклеотиды)	Компонент ПЦР-смеси
Соляная кислота	Широкий спектр применения
Трис	Компонент большинства буферных растворов
Уксусная кислота	Широкий спектр применения
Хлорид калия	Компонент ПЦР-смеси
Хлорид магния	Компонент ПЦР смеси
Хлорид натрия	Выделение ДНК
Хлороформ	Выделение ДНК
ЭДТА	Широкий спектр применения
Этиловый спирт	Осаждение ДНК
Рестриктазы (эндонуклеазы) NmuCI (Tsp451) и BstUI (Bsh12361).	Необходимый компонент для выявления единичных нуклеотидных полиморфизмов rs8099917 и rs12979860

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Хронический вирусный гепатит С.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Забор материала и выделение нуклеиновых кислот

Этап проводится в лаборатории учреждения здравоохранения, имеющего возможность выполнения ПЦР.

Выделение ДНК с целью определения полиморфизма гена ИЛ-28В (мутации rs8099917 и rs12979860) производят из лейкоцитов крови. Кровь для анализа объемом около 1000 мкл помещают в центрифужную пробирку 1,5 мл, содержащую 100 мкл 0,5М ЭДТА для предотвращения свертывания крови. Для выделения ДНК можно использовать готовые коммерческие наборы.

В одноразовые пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл необходимо внести по 400 мкл экстрагирующего буфера ($t = 65^{\circ}\text{C}$) следующего состава: 2 %-й раствор бромида цетилтриметиламмония, 0,1 М раствор трис, 1,4 М раствор хлорида натрия, 20 мМ раствор ЭДТА (рН буфера довести HCl до значения 8,0), промаркировать пробирки. Затем в каждую пробирку вносят по 100 мкл лейкоцитов, закрывают крышки, перемешивают содержимое на вортексе, помещают в термостат и инкубируют в течение 30 мин при 65°C . Затем пробирки охлаждают до комнатной температуры, добавляют к образцам по 500 мкл хлороформа и тщательно перемешивают содержимое на вортексе в течение 20 мин. Далее производят центрифугирование при 13000 об./мин ($t = 18\text{--}20^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После этого необходимо пипеткой отобрать 300 мкл супернатанта, перенести в другую пробирку

типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, добавить 210 мкл охлажденного изопропанола, перемешать содержимое на вортексе и инкубировать при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем производят центрифугирование при 13000 об./мин ($t = 18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 15 мин. Полученный осадок ДНК промывают двукратно 1 мл 70° этанола, охлажденного до -10°C . После промывания содержимое пробирки центрифугируют при 15000 об./мин ($t = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. После промывки этанолом открытые пробирки разместить в твердотельном термостате при температуре 45°C и просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворить в 50 мкл деионизированной воды при 40°C в течение 30 мин. Количество полученной ДНК в препарате оценивают с помощью спектрофотометра. Растворенную ДНК хранить при $t = -20^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа.

Этап 2. Определение генотипа вируса гепатита С

Определение генотипа вируса гепатита С нужно проводить с применением коммерческих тест-систем в учреждении здравоохранения, имеющих возможность выполнения ПЦР. В качестве материала для выделения РНК ВГС используют плазму крови, забранную с учетом стандартных требований.

Интерпретацию результата производят врачи-инфекционисты и другие врачи-специалисты, назначающие противовирусную терапию пациентам с ХВГС в амбулаторных и стационарных условиях.

При выявлении генотипа 1 ВГС методом ПЦР переходят к этапу 3, при выявлении ВГС генотипов 2 или 3 — переходят к этапу 4 (показаны на рисунке 1).

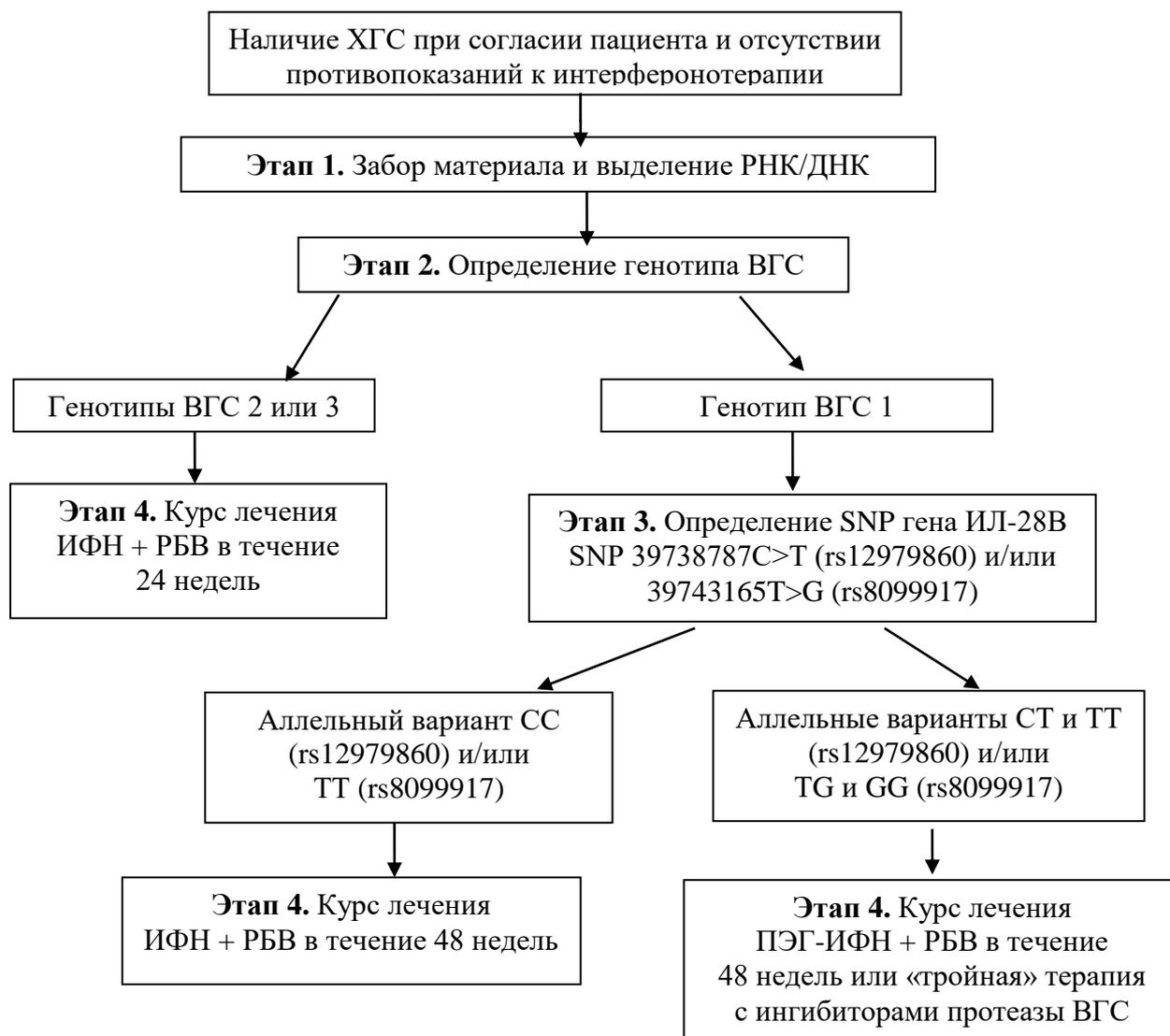


Рисунок 1. — Алгоритм назначения стандартного и пегилированного интерферона пациентам с ХВГС на основе определения генотипа ВГС и полиморфизма гена ИЛ-28В

Этап 3. Выявление полиморфизма в локусах rs12979860 и rs8099917 гена ИЛ-28В.

Определение полиморфизма гена ИЛ-28В в зонах rs12979860 и rs8099917 у пациентов с генотипом 1 ВГС проводят с помощью метода ПЦР. Альтернативой коммерческим тест-системам является выявление исследуемых мутаций методом ПЦР-ПДРФ.

Для ПЦР используются два специфических праймера (прямой и обратный). Структура праймеров, используемых для детекции rs12979860 и rs8099917 гена ИЛ-28В, представлена в таблице 3.

Таблица 3. — Структура праймеров, используемых для детекции rs12979860 и rs8099917 гена ИЛ-28В

Название локуса	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Аmplифицируемый участок (пар нуклеотидов – п.н.)
rs12979860	Прямой	TGTA CTGA ACCAGGGAGCTC	58
	Обратный	GCGCGGAGTGCAATTCAAC	
rs8099917	Прямой	GTGCATATGTTTTCTGAC	430
	Обратный	GAGGCCCTCACCCATGC	

Состав компонентов реакционной смеси для выявления исследуемых участков гена ИЛ-28В представлен в таблице 4.

Таблица 4. — Состав компонентов реакционной смеси для выявления исследуемых участков гена ИЛ-28В

Название компонентов смеси	Объем компонентов, мкл
Вода деионизированная	9,5
2×ПЦР-буфер (готовая смесь для ПЦР, содержащая все основные компоненты: оптимизированный буфер, дНТФ, ДНК-полимеразу)	12,5
Раствор праймера прямого (10 мМ)	1,0
Раствор праймера обратного (10 мМ)	1,0
Образец ДНК (20 нг/мкл)	1,0
Общий объем реакционной смеси	25

Для ПЦР более 1 образца готовится общий раствор (Master-mix), в который входят все компоненты смеси (кроме образца ДНК) в количестве, соответствующему числу образцов. Образец вносят индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) Master-mix.

Программы амплификации исследуемых участков гена ИЛ-28В представлены в таблицах 5, 6.

Таблица 5. — Программа амплификации участка гена ИЛ-28В, содержащего мутацию rs12979860

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	20 с	30
	Отжиг	60	20 с	
	Элонгация	72	20 с	
3	Охлаждение	4	3 мин	1

Таблица 6 – Программа амплификации участка гена гена ИЛ-28В, содержащего мутацию rs8099917

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	25 с	30
	Отжиг	57	25 с	
	Элонгация	72	25 с	
3	Охлаждение	4	3 мин	1

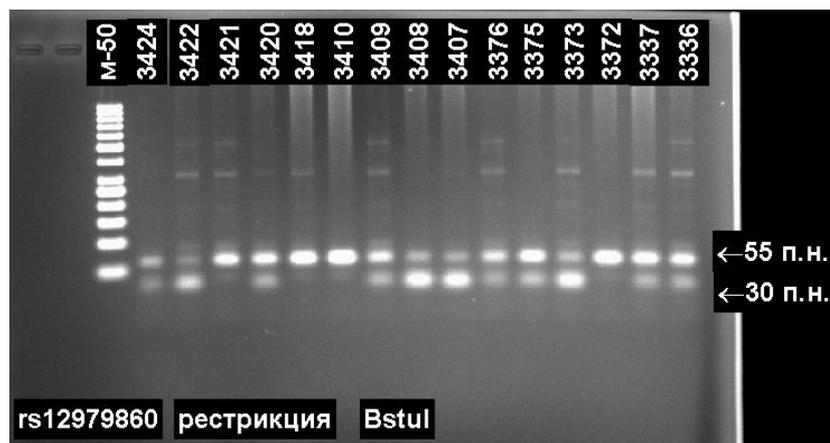
Для детекции продуктов амплификации использован метод горизонтального гель-электрофореза, основанный на том, что смесь макромолекул под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры. Однородные фрагменты ДНК представляют на электрофореграмме единую фракцию. Продукты амплификации анализируют в 1,7 % агарозном геле. Для приготовления 1,7 % агарозного геля 1,7 г агарозы растворяют в 100 мл Трис-ЭДТА-Боратного буфера (ТБЕ, рН = 8,3). В качестве контроля используют маркер молекулярного веса. Электрофорез проводят по стандартной схеме, для окрашивания применяют раствор бромистого этидия. Для визуализации используют любую стандартную видеосистему (трансиллюминатор с видеосистемой), для переноса изображения на компьютер используется программное обеспечение, позволяющее фиксировать полученные изображения гелей.

В результате амплификации получают фрагменты ДНК исследуемых локусов, которые в дальнейшем используют для рестрикционного анализа с применением коммерческих рестриктаз. Состав рестрикционной смеси и условия проведения рекомендованы в инструкции производителя. Продукты рестрикции анализируют при помощи электрофоретической детекции в 2,5 % агарозном геле.

Выявление точечной мутации rs12979860 гена ИЛ-28В

Полученный в результате ПЦР участок гена ИЛ-28В размером 58 п.н., содержащий локус rs12979860, подвергают рестрикционному анализу с использованием рестриктазы BstUI (Bsh12361). Спектр гомозиготы по аллелю дикого типа СС представлен тремя зонами (30, 25 и 3 п.н.), гомозиготного по мутантному аллелю ТТ — двумя зонами (55 и 3 п.н.), а гетерозиготного организма СТ — четырьмя зонами (55, 30, 25 и 3 п.н.).

На рисунке 2 приведена электрофореграмма продуктов рестрикции участка, содержащего rs12979860 гена ИЛ-28В.



*М — здесь и далее — маркер молекулярного веса 50 п.н.

Рисунок 2. — Электрофорез рестрикционных фрагментов для выявления мутации rs12979860 при рестрикции BstUI

Интерпретация по фореграмме представляет некоторые трудности. Зоны 58 и 55 п.н., а также 30 и 25 п.н. невозможно разделить в агарозном геле. Образцы №№ 3372, 3410, 3418, 3421 легко типироваться как гомозиготы-мутанты. Спектр других образцов представлен двумя зонами. Причем для образцов №№ 3336, 3337, 3375, 3376, 3409, 3420, 3424 ярче выражена более тяжелая зона, поэтому можно предположить, что они являются гетерозиготами, а для образцов №№ 3373, 3407, 3408, 3422 — более легкая, следовательно, они являются гомозиготами дикого типа.

В сомнительных случаях для подтверждения правильности интерпретации определенных по фореграмме генотипов проводится мелтинг (плавление) рестрикционных фрагментов с использованием интеркалирующего красителя. Мелтинг проводят по стандартной программе, используя амплификатор с функцией реального времени. Кривые плавления рестрикционных фрагментов ДНК некоторых образцов представлены на рисунке 3.

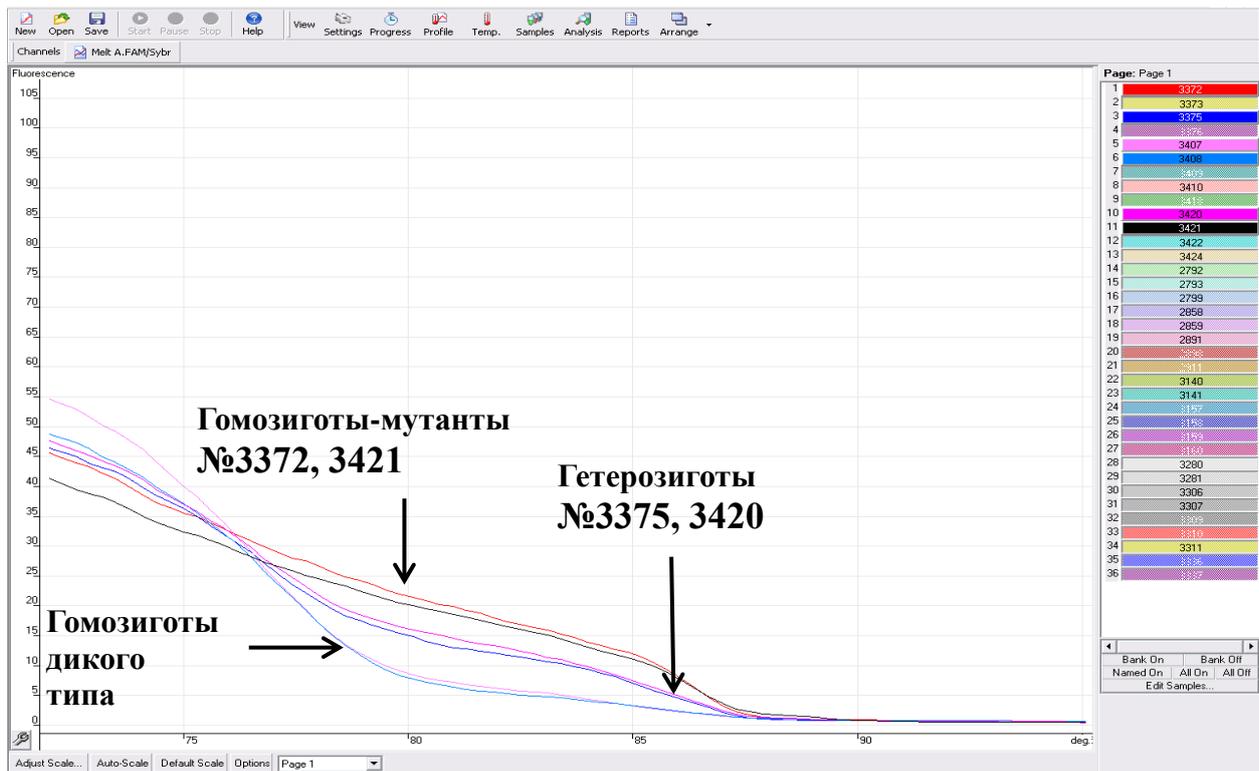


Рисунок 3. — Кривые плавления рестриционных фрагментов некоторых образцов

На рисунке 3 отчетливо видна разница между образцами с разным генотипом. Анализ кривых плавления рестриционных фрагментов ДНК в присутствии интеркалирующего красителя показал, что гомозиготы дикого типа отличаются по температуре плавления от гомозигот-мутантов. Для гетерозигот характерны две точки перегиба.

Выявление точечной мутации rs8099917 гена ИЛ-28В

Полученный в результате ПЦР участок гена ИЛ-28В размером 430 п.н., содержащий локус rs8099917, подвергают рестриционному анализу с использованием рестриктазы NmuCI (Tsp451).

На рисунке 4 приведена электрофореграмма продуктов рестрикции участка, содержащего rs8099917 гена ИЛ-28В.

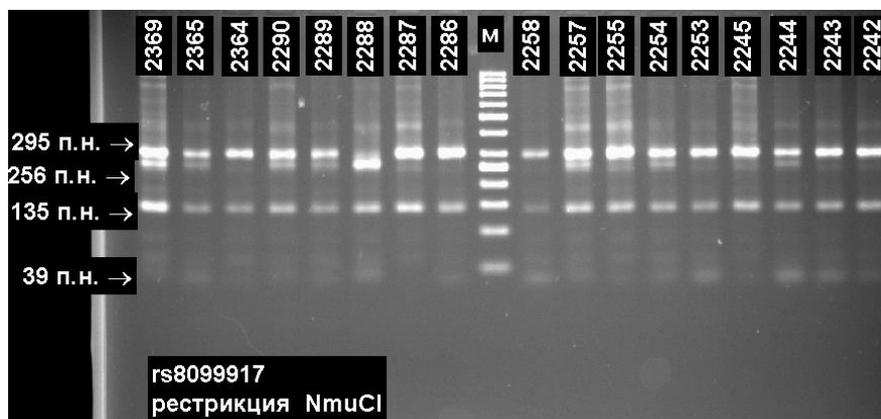


Рисунок 4. — Электрофорез рестриционных фрагментов для выявления мутации rs8099917 при рестрикции NmuCI

Аллели дикого типа (Т) рестриктаза расщепляет на две зоны: 295 и 135 п.н. В случае мутантного аллеля (G) образуются три зоны: 256; 135 и 39 п.н. Спектр гетерозиготного организма (TG) представлен четырьмя зонами (295; 256; 135 и 39 п.н.). Таким образом, по рисунку 4 можно идентифицировать образец № 2288 как гомозиготу-мутант, образцы №№ 2242, 2243 и др. как гомозиготы дикого типа, а образцы №№ 2369, 2365 и др. как гетерозиготы.

Интерпретация результатов

Генотипы CC (rs12979860) и TT (rs8099917) расцениваются как прогностически благоприятные, их наличие соответствует высокой частоте стойкого вирусологического ответа. Другие сочетания аллелей (CT и TT для rs12979860, а также TG и GG для rs8099917) прогностически менее благоприятны для пациентов с генотипом 1 ВГС.

Этап 4. Выбор схемы лечения

Проводится врачами-инфекционистами и другими врачами-специалистами, оказывающими помощь пациентам с хроническим вирусным гепатитом С.

При наличии у пациентов с ХВГС 2 или 3 генотипа ВГС рекомендуется схема лечения ИФН и РБВ на 24 недели, т. к. у них ожидается высокая эффективность терапии с частотой СВО 67 %.

Для пациентов с генотипом 1 ВГС и «благоприятными» аллельными вариантами CC (rs12979860) и TT (rs8099917) при отсутствии выраженного фиброза/цирроза печени назначается схема лечения ИФН и РБВ в течение 48 недель, при которой частота СВО составляет 78 и 53 % для rs12979860 и rs8099917 соответственно.

Для лечения пациентов с аллельными вариантами CT и TT (rs12979860), или TG и GG (rs8099917), при которых эффективность терапии значительно ниже (СВО не превышает 30 %), необходимо использовать схему ПЭГ-ИФН+РБВ на 48 недель. При наличии аллельных вариантов TT (rs12979860) и GG (rs8099917) следует рассмотреть возможность назначения «тройной» терапии с использованием ингибиторов протеазы ВГС (боцепревил, телапревил) согласно существующим стандартам и протоколам лечения ХВГС.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование методики ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам по организации и проведению исследования в ПЦР-лаборатории, несоблюдение которых приводит к возникновению ошибок, становящихся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Особенно опасны ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Не рекомендуется в качестве антикоагулянта при заборе крови использовать гепарин, т. к. он ингибирует ПЦР. Хранят образцы крови в холодильной камере при 2–4°C не более 1 недели.

Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории. Особую опасность представляет собой контаминация — источник ложноположительных

результатов. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при выделении ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления линии «положительной» ДНК в отрицательном контроле свидетельствуют о возможности контаминации и в пробах.