

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по анализу и интерпретации результатов исследования,
проведенного с использованием набора реагентов
для диагностики *in vitro*

АмплиСенс[®] *HBV-Resist-Seq*

для выявления мутаций устойчивости вируса гепатита В (*HBV*) к противовирусным
препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
АНАЛИЗ ХРОМАТОГРАММ СЕКВЕНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ «ДЕОНА»	3
СПИСОК ИЗВЕСТНЫХ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У ВИРУСА ГЕПАТИТА В	6
АЛГОРИТМ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	7
ВЫДАЧА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ» ..	8

НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок проведения анализа результатов секвенирования фрагмента ревертазного (RT) домена Р-гена вируса гепатита В (HBV), полученных при использовании набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® HBV-Resist-Seq, с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия) и клиническую интерпретацию полученных результатов.

АНАЛИЗ ХРОМАТОГРАММ СЕКВИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ «ДЕОНА»

Программное обеспечение (ПО) «ДЕОНА» обеспечивает полный цикл анализа данных прямого секвенирования фрагмента RT-домена гена полимеразы вируса гепатита В (HBV).

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы внимательно ознакомьтесь с руководством пользователя к программному обеспечению «ДЕОНА» («Профиль Вирус гепатита В») (АО «РМБит», Россия).

1. Проверить качество сборки консенсус-последовательности в соответствии с руководством пользователя.

ВНИМАНИЕ! Каждая позиция консенсус-последовательности в области определяемых мутаций должна перекрываться не менее чем двумя хроматограммами, в противном случае к анализу этого участка следует относиться более внимательно. Для участка, содержащего L80I/V, может быть получена одна хроматограмма.

2. В случае необходимости провести редактирование хроматограмм и консенсус-последовательности в соответствии с руководством пользователя.

ВНИМАНИЕ! ПО «ДЕОНА» автоматически определяет наличие полиморфных позиций (несколько нуклеотидов в одной позиции), которые обозначаются специализированным буквенным кодом IUPAC (см. табл.1).

Таблица 1

Обозначение полиморфных позиций кодом IUPAC

Обозначение	Полиморфизм	Обозначение	Полиморфизм	Обозначение	Полиморфизм
K	G/T	W	A/T	H	A/T/C
M	A/C	Y	C/T	U	A/G/C
R	A/G	B	C/T/G	N	A/C/G/T
S	C/G	D	A/T/G		


3. Все сайты консенсус-последовательности, ассоциированные с возникновением мутаций устойчивости, внимательно просмотреть и при необходимости редактировать в соответствии с руководством пользователя и с учетом следующих правил:
- если во всех хроматограммах, полученных для анализируемой позиции, наряду с основным пиком присутствуют другие одинаковые по величине подпики, необходимо указать на полиморфизм в данной позиции;
 - если подпик/подпики присутствуют лишь в одной из хроматограмм, в позицию консенсус-последовательности следует ввести нуклеотид, соответствующий основному пику;
 - если присутствует эффект истощения краски (пики с малой амплитудой), то данный участок хроматограммы рекомендуется исключить из анализа.
4. На панели инструментов нажать кнопку **Анализ**  и сформировать бланк выдачи результатов исследования, который содержит информацию о наличии устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам и информацию по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости и отчетом контроля качества. При необходимости бланк можно дополнить информацией о пациенте и организации, направившей его на обследование и сохранить на компьютере в формате PDF. Пример бланка выдачи результатов исследования приведен на рис. 1.

Рисунок 1 – Пример бланка выдачи результатов по проведенному исследованию.

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА		DE #NA																																																									
Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам																																																											
№		№																																																									
Дата взятия материала:	Вид материала:	Дата взятия материала:	ID пациента:																																																								
ID пациента:	Номер истории болезни:	ФИО пациента:	ФИО пациента:																																																								
Дата рождения:	Пол:																																																										
Направившая организация:																																																											
Отделение:																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Наименование исследования</th> <th>Результат</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам</td> <td>Валидный</td> </tr> </tbody> </table>		Наименование исследования	Результат	Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам	Валидный	<table border="1"> <thead> <tr> <th>№</th> <th>Мутации устойчивости</th> <th>Результат</th> <th>Референсные значения</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>L80/V</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>2</td><td>I169T</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>3</td><td>V173L</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>4</td><td>L180M</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>5</td><td>A181S/T/V</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>6</td><td>T184A/C/G/V/L/M/S</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>7</td><td>A194T</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>8</td><td>S202/C/G</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>9</td><td>M204I/S/V</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>10</td><td>I233V</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>11</td><td>N236T</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> <tr><td>12</td><td>M250L/I/V</td><td>не обнаружена</td><td>не обнаружена</td></tr> </tbody> </table>		№	Мутации устойчивости	Результат	Референсные значения	1	L80/V	не обнаружена	не обнаружена	2	I169T	не обнаружена	не обнаружена	3	V173L	не обнаружена	не обнаружена	4	L180M	не обнаружена	не обнаружена	5	A181S/T/V	не обнаружена	не обнаружена	6	T184A/C/G/V/L/M/S	не обнаружена	не обнаружена	7	A194T	не обнаружена	не обнаружена	8	S202/C/G	не обнаружена	не обнаружена	9	M204I/S/V	не обнаружена	не обнаружена	10	I233V	не обнаружена	не обнаружена	11	N236T	не обнаружена	не обнаружена	12	M250L/I/V	не обнаружена	не обнаружена
Наименование исследования	Результат																																																										
Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам	Валидный																																																										
№	Мутации устойчивости	Результат	Референсные значения																																																								
1	L80/V	не обнаружена	не обнаружена																																																								
2	I169T	не обнаружена	не обнаружена																																																								
3	V173L	не обнаружена	не обнаружена																																																								
4	L180M	не обнаружена	не обнаружена																																																								
5	A181S/T/V	не обнаружена	не обнаружена																																																								
6	T184A/C/G/V/L/M/S	не обнаружена	не обнаружена																																																								
7	A194T	не обнаружена	не обнаружена																																																								
8	S202/C/G	не обнаружена	не обнаружена																																																								
9	M204I/S/V	не обнаружена	не обнаружена																																																								
10	I233V	не обнаружена	не обнаружена																																																								
11	N236T	не обнаружена	не обнаружена																																																								
12	M250L/I/V	не обнаружена	не обнаружена																																																								
Примечание:																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Наименование противовирусного препарата</th> <th>Результат</th> <th>Референсное значение</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ламивудин (LAM/ЗТС)</td><td>S</td><td>S</td></tr> <tr><td>Телбивудин (LdT)</td><td>S</td><td>S</td></tr> <tr><td>Энтекавир (ETV)</td><td>S</td><td>S</td></tr> <tr><td>Адефовир (ADV)</td><td>S</td><td>S</td></tr> <tr><td>Тенофовир (TDF)</td><td>S</td><td>S</td></tr> </tbody> </table>		Наименование противовирусного препарата	Результат	Референсное значение	Ламивудин (LAM/ЗТС)	S	S	Телбивудин (LdT)	S	S	Энтекавир (ETV)	S	S	Адефовир (ADV)	S	S	Тенофовир (TDF)	S	S																																								
Наименование противовирусного препарата	Результат	Референсное значение																																																									
Ламивудин (LAM/ЗТС)	S	S																																																									
Телбивудин (LdT)	S	S																																																									
Энтекавир (ETV)	S	S																																																									
Адефовир (ADV)	S	S																																																									
Тенофовир (TDF)	S	S																																																									
R - вирус гепатита В устойчив к противовирусному препарату S - вирус гепатита В чувствителен к противовирусному препарату I - у вируса гепатита В возможно возникновение устойчивости к противовирусному препарату																																																											
Наименование организации:		Тел./факс:																																																									
Адрес:		Адрес:																																																									
ФИО врача:		ФИО врача:																																																									
Дата: 23.09.2013		Дата: 23.09.2013																																																									
Подпись:		Подпись:																																																									
dequal		dequal																																																									
1 из 3 стр.		2 из 3 стр.																																																									

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА		DE #NA																									
Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам																											
№		№																									
Дата взятия материала:	Вид материала:	Дата взятия материала:	ID пациента:																								
ID пациента:	Номер истории болезни:	ФИО пациента:	ФИО пациента:																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Анализируемый участок обратной транскриптазы Р-гена вируса гепатита В</th> </tr> <tr> <th>Гомология, %*</th> <th>97</th> <th>Результат</th> </tr> <tr> <th>Наименование проблем в качестве сиквенса</th> <th>Номер кода</th> <th>Результат</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>стоп-кодоны</td><td></td><td>Валидный</td></tr> <tr><td>наличие вставок и делеций</td><td></td><td>Валидный</td></tr> <tr><td>множественные вырождения В, D, H, V, N</td><td></td><td>Валидный</td></tr> <tr><td>нетипичные аминокислоты</td><td></td><td>Валидный</td></tr> <tr><td>участки, не покрытые хроматограммами</td><td></td><td>Валидный</td></tr> </tbody> </table>				Анализируемый участок обратной транскриптазы Р-гена вируса гепатита В			Гомология, %*	97	Результат	Наименование проблем в качестве сиквенса	Номер кода	Результат	стоп-кодоны		Валидный	наличие вставок и делеций		Валидный	множественные вырождения В, D, H, V, N		Валидный	нетипичные аминокислоты		Валидный	участки, не покрытые хроматограммами		Валидный
Анализируемый участок обратной транскриптазы Р-гена вируса гепатита В																											
Гомология, %*	97	Результат																									
Наименование проблем в качестве сиквенса	Номер кода	Результат																									
стоп-кодоны		Валидный																									
наличие вставок и делеций		Валидный																									
множественные вырождения В, D, H, V, N		Валидный																									
нетипичные аминокислоты		Валидный																									
участки, не покрытые хроматограммами		Валидный																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Количество хроматограмм, которые покрывают анализируемый участок**</th> <th>Номер кода</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td></td></tr> <tr><td>1</td><td></td></tr> <tr><td>2 и более</td><td>80-250</td></tr> </tbody> </table>		Количество хроматограмм, которые покрывают анализируемый участок**	Номер кода	0		1		2 и более	80-250																		
Количество хроматограмм, которые покрывают анализируемый участок**	Номер кода																										
0																											
1																											
2 и более	80-250																										
* - результат гомологии является валидным при гомологии более 90%																											
** - для достоверного анализа необходимо, чтобы участок нуклеотидной последовательности был покрыт не менее, чем двумя хроматограммами. Если участок последовательности покрыт одной электрофоретической, то к анализу этого участка следует относиться особенно внимательно. Если участок нуклеотидной последовательности не покрыт ни одной электрофоретической, то анализ данного участка проведен быть не может.																											
Место сохранения проекта:		Тел./факс:																									
Наименование организации:		Адрес:																									
Адрес:		ФИО врача:																									
ФИО врача:		Дата: 23.09.2013																									
Дата: 23.09.2013		Подпись:																									
dequal		dequal																									
3 из 3 стр.																											

ВНИМАНИЕ! Результат анализа исследуемого образца считается невалидным в следующих случаях, если консенсус-последовательность после проведения редактирования:

- не покрывает полностью область определяемых мутаций;
- менее чем на 90 % идентична референсной последовательности;
- содержит стоп-кодоны;
- содержит вставки и делеции в анализируемой области;
- содержит более двух нетипичных аминокислот.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

СПИСОК ИЗВЕСТНЫХ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У ВИРУСА ГЕПАТИТА В

В ПО «ДЕОНА» используется международное обозначение мутаций, ассоциированных с устойчивостью вируса гепатита В к противовирусным препаратам. Список всех известных мутаций, которые анализируются в программе ДЕОНА, приведен в табл. 2.

Таблица 2

Перечень известных мутаций, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости у вируса гепатита В (HBV)

№	Обозначение мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита В
1	L80I/V ¹⁾
2	I169T
3	V173L
4	L180M
5	A181T/S/V
6	T184A/C/G/I/L/M/S
7	A194T
8	S202I/C/G
9	M204I/S/V
10	I233V
11	N236T
12	M250I/L/V

¹⁾ Аминокислота дикого типа (немутантный вариант) указывается слева от номера аминокислоты, мутантная аминокислота, ассоциированная с возникновением мутации устойчивости – справа.

АЛГОРИТМ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ПО «ДЕОНА» используется следующий алгоритм клинической интерпретации полученных результатов (см. табл. 3).

Таблица 3

Алгоритм интерпретации результатов по выявлению устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам

Препарат ПВТ	Устойчивость	Возможно возникновение устойчивости	Иначе
Ламивудин (LAM/ЗТС)	M204ISV	L180M	Чувствительность к препарату
	A181TV	V173L	
		L80VI	
Адефовир (ADV)	N236T	-	
	A181STV		
Энтекавир (ETV)	M204IV вместе с любой из (I169T, T184ACGILMS, S202CGI, M250IV)	любая из (I169T, T184ACGILMS, S202CGI, M250IV)	
	A181T+I233V+N236T+M250L	M204IV вместе с любой из (V173L, L180M)	
Телбивудин (LdT)	M204IV	L180M	
	A181TV		
Тенофовир (TDF)	A194T	N236T	
	rtA181T+N236T	A181T	

Клиническая интерпретация результатов проводится дифференцированно для каждого противовирусного препарата:

- если в результате проведенного исследования в ревертазном (RT) домене вирусной полимеразы обнаружены мутации к противовирусному препарату, перечисленные в столбце **«Устойчивость»** таблицы 3, то по данному препарату выдается результат **«Вирус гепатита В устойчив к препарату»**;
- если в результате проведенного исследования в ревертазном (RT) домене вирусной полимеразы обнаружены только мутации к противовирусному препарату, перечисленные в столбце **«Возможно возникновение устойчивости»** таблицы 3, то по данному препарату выдается результат **«У вируса гепатита В возможно формирование устойчивости к препарату»**;
- если в результате проведенного исследования в ревертазном (RT) домене вирусной полимеразы обнаружены мутации к противовирусному препарату, перечисленные в столбцах **«Устойчивость»** и **«Возможно возникновение устойчивости»** таблицы 3, то по данному препарату выдается результат **«Вирус гепатита В устойчив к препарату»**;

– если в результате проведенного исследования не обнаружены мутации устойчивости к противовирусному препарату, перечисленные в столбцах «**Устойчивость**» и «**Возможно возникновение устойчивости**», то по данному препарату выдается результат «**Вирус гепатита В чувствителен к препарату**»;

ВЫДАЧА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ»

В результате проведенного исследования пациент получает информацию о наличии устойчивости вируса гепатита В к следующим противовирусным препаратам – ламивудину (LAM/ЗТС), телбивудину (LdT), энтекавиру (ETV), тенофовиру (TDF) и адефовиру (ADV), а также информацию по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости. На рис. 1 представлен пример бланка выдачи результатов по проведенному исследованию, сформированного в ПО «ДЕОНА». Бланк включает в себя 5 таблиц.

В первой таблице в графе «**Результат**» выдается результат «**Валидный**» или «**Невалидный**». Если исследованный образец имеет вирусную нагрузку, близкую к аналитической чувствительности набора реагентов, и для него не удалось получить амплифицированный фрагмент, пригодный для секвенирования, то по этому образцу в строке «Примечание» необходимо ввести результат «**Не определено по причине низкой вирусной нагрузки**».

Во второй таблице содержится информация о наличии устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам. В этой таблице в графе «**Результат**» для каждого противовирусного препарата выдается результат **R**, **S** или **I**, где **R** – вирус гепатита В устойчив к противовирусному препарату (мутации устойчивости к этому препарату обнаружены), **S** – вирус гепатита В чувствителен к противовирусному препарату (референсное значение, мутации устойчивости не обнаружены), **I** – у вируса гепатита В возможно возникновение устойчивости к противовирусному препарату (т.е. выявлены только компенсаторные (вторичные) мутации устойчивости к этому препарату, основных мутаций не обнаружено). Если в первой таблице выдается результат «**Невалидный**», то данная таблица в бланке отсутствует.

В третьей таблице содержится информация по каждой аминокислотной позиции, ассоциированной с мутацией лекарственной устойчивости *HBV*. В этой таблице в графе «**Результат**» при выявлении мутации, выдается результат «**Обнаружена мутация...**» (с указанием выявленной мутантной аминокислоты). Если такая мутация не выявлена, выдается результат «**Не обнаружена**». При обнаружении нескольких

мутантных вариантов в одной позиции выдается результат **«Обнаружена...»** (мутантные аминокислоты перечисляются через запятую). В случае обнаружения в одной позиции мутантной аминокислоты и аминокислоты «дикого типа» в таблице приводится только мутантный вариант. При выявлении в определенной аминокислотной позиции мутации, для которой не показана ассоциация с лекарственной устойчивостью, также выдается результат **«Не обнаружена»**.

В случае получения невалидного результата исследования в этой таблице будут выданы данные только по тем аминокислотным позициям, для которых удалось провести анализ. Для позиций, по которым анализ не был проведен, в графе **«Результат»** стоит прочерк.

В четвертой таблице содержится отчет контроля качества сборки. В графе **«Результат»** выдается результат **«Валидный»** или **«Невалидный»** для каждого параметра, приведенного в этих таблицах. При наличии даже одного невалидного результата в этой таблице, в первой таблице бланка выдается результат **«Невалидный»**.

Пятая таблица содержит информацию о количестве хроматограмм, которые покрывают анализируемый участок.