

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ: МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неверов А.Д., Черемухин Е.А., Карандашова И.В., Чуланов В.П.

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Введение: Лекарственная устойчивость (лекарственная резистентность) – природная или приобретенная способность возбудителя болезни сохранять жизнедеятельность при воздействии на него лекарственных средств. Этиологическое лечение хронического гепатита В (ХГВ) основывается на применении аналогов нуклео(з/т)идов – ингибиторов РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы) вируса гепатита В (HBV), которая кодируется Р-геном. Противовирусный препарат (ПВП) встраивается в вирусный геном, вовлеченный в процесс обратной транскрипции, и конкурентно ингибирует вирусную репликацию, т.о. эти лекарственные препараты эффективно снижают вирусную нагрузку у больных ХГВ. При возникновении некоторых точечных мутаций в Р-гене аналоги нуклео(з/т)идов теряют способность встраиваться в растущую цепь ДНК вследствие конформационного изменения локуса связывания обратной транскриптазы.

Мутации лекарственной устойчивости HBV подразделяются на 1) основные (первичные) – мутации, снижающие чувствительность к противовирусному препарату, и 2) компенсаторные (вторичные) – мутации, которые компенсируют функциональные дефекты активности полимеразы, связанные с появлением первичной мутации. Мутации устойчивости определяются по номеру позиции аминокислоты в домене обратной транскриптазы, причем аминокислота дикого типа указывается слева от номера аминокислоты, вариант (варианты) мутации устойчивости – справа. Информация о наличии мутаций лекарственной устойчивости в геноме вируса гепатита В окажет значительную помощь клиницисту в выборе препаратов противовирусной терапии (ПВТ), и, соответственно, будет способствовать более эффективному лечению ХГВ.

Для определения мутаций лекарственной устойчивости HBV в мировой практике используют молекулярно-биологические методы – ПЦР-амплификацию ревертазного домена Р-гена HBV с последующим анализом амплифицированных фрагментов одним из следующих методов: прямого (популяционного) секвенирования, ПДРФ-анализа, обратной гибридизации (LiPA), клонирования и последующего секвенирования, параллельного аллель-специфичного

секвенирования (PASS), Ultra Deep пиросеквенирования (UDPS), анализа с использованием биочипов или секвенирования единичных геномов (SGS или SGA). В России, в условиях клинико-диагностических лабораторий только использование прямого секвенирования для анализа ПЦР-фрагментов экономически выгодно, т.к. этот метод не требует длительной и трудоемкой работы и пригоден для использования в клинической лабораторной диагностике. Другие методы либо обладают меньшей чувствительностью (ПДРФ), по сравнению с секвенированием, либо 1) требуют оборудования, которое в настоящий момент отсутствует на территории страны (UDPS) или имеется в ограниченном числе лабораторий (работа с биочипами), 2) достаточно дорогостоящи (UDPS, SGA, PASS, LiPA, клонирование с последующим секвенированием) и 3) проведение анализа занимает достаточно протяженное время (клонирование с последующим секвенированием, SGA). **Цель работы:** Разработка методологии исследования по выявлению мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам с использованием прямого секвенирования.

Материалы и методы: Выбор праймеров для ПЦР-амплификации ревертазного домена *P*-гена вируса гепатита В и праймеров для секвенирования полученного ПЦР-фрагмента, а также вычисление температуры отжига этих праймеров определяли с помощью программного обеспечения, разработанного в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Предварительная проверка специфичности праймеров проводилась в поисковой системе Blast в банке нуклеотидных последовательностей GenBank. Для подбора условий проведения амплификации и использовали разведения контрольного образца ПКО ДНК *HBV* («ФГУН ЦНИИЭ»), стандартного образца предприятия (СОП) содержания вируса гепатита В № 37 («ФГУН ЦНИИЭ») и ДНК *HBV*, выделенную из ДНК *HBV*-положительных клинических образцов. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» («ФГУН ЦНИИЭ», Россия). Выявление ДНК *HBV* проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиСенс® *HBV-FRT*» («ФГУН ЦНИИЭ»). ПЦР проводили с использованием реагентов производства «ФГУН ЦНИИЭ». Реакцию циклического секвенирования, очистку продуктов реакции секвенирования осуществляли с использованием реактивов для секвенирования производства «Applied Biosystems» (США) согласно инструкции производителя. Флуоресцентное секвенирование производилось с использованием автоматического секвенатора 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»).

Результаты: В ФГУН ЦНИИЭ была разработана методология на основе прямого (популяционного) секвенирования, позволяющая выявлять мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита В,

которая состоит из четырех этапов. На первом этапе, ДНК, выделенная из ДНК *HBV*-положительной пробы, используется в качестве матрицы для ПЦР. Диагностической мишенью ПЦР служит фрагмент ревертазного домена *P*-гена размером 970 п.н., в котором локализованы все известные на настоящий момент мутации лекарственной устойчивости. На втором этапе проводится прямое секвенирование полученного ПЦР-фрагмента с трех праймеров. На третьем этапе секвенированные последовательности анализируются с помощью специального программного обеспечения (ПО) - анализатора хроматограмм «DEONA», разработанного в ФГУН ЦНИИЭ. ПО «DEONA» предназначена для сборки хроматограмм прямого секвенирования, выявления в них полиморфных позиций, построения консенсус-последовательности, трансляции консенсус-последовательности, определения отличий от референс-последовательности и выявления мутаций устойчивости. На четвертом этапе, осуществляется клиническая интерпретация полученных результатов с использованием разработанного алгоритма. Результатом проведенного исследования является информация о наличии устойчивости вируса гепатита В к следующим противовирусным препаратам - ламивудину (*LAM/3TC*), телбивудину (*LdT*), энтекавиру (*ENV*), тенофовиру (*TDF*) и адефовиру (*ADV*). Вирус гепатита В считается устойчивым к противовирусному препарату, если выявлены основные мутации устойчивости к этому препарату; чувствительным, если основные и компенсаторные мутации, приводящие к возникновению лекарственной устойчивости не обнаружены. У вируса гепатита В возможно возникновение устойчивости к противовирусному препарату, если выявлены только компенсаторные (вторичные) мутации устойчивости к этому препарату, основных мутаций не обнаружено.

Закключение: Разработанная методология выявления мутаций лекарственной устойчивости *HBV* пригодна для использования в клинической лабораторной диагностике и на научной практике для выявления вышеназванных мутаций. Информация о наличии этих мутаций, определенных с помощью разработанной методологии, окажет значительную помощь клиницисту в выборе препаратов противовирусной терапии, и, соответственно, будет способствовать более эффективно лечению ХГВ.