

ИММУНОГЕНЕТИКА

IL 28В

ГЕНЕТИКА IL 28В

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФУНКЦИЯМИ ИНТЕРЛЕЙКИНА 28В, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ИММУНОГЕНЕТИКА IL 28В). РУ 2011/12013

Вирусный гепатит С – широко распространенное во всем мире инфекционное заболевание, вызываемое вирусом гепатита С (HCV), которым в настоящее время инфицировано примерно 170 млн человек.

После острой фазы заболевания вирус гепатита С персистирует в крови у 85–90 % больных, и независимо от пути заражения у 50–70 % из них заболевание переходит в хронический гепатит.

Нередко хронический гепатит С (ХГС) прогрессирует медленно и долгое время не имеет клинических проявлений. Однако даже при легком хроническом гепатите С, протекающем почти бессимптомно при умеренном повышении активности аминотрансфераз и незначительном изменении печеночной ткани в первое десятилетие после инфицирования, почти у 30 % больных развивается цирроз печени, который при хроническом гепатите С может привести к печеночно-клеточному раку.

При хроническом гепатите С, прежде считавшемся неизлечимым заболеванием, современная противовирусная терапия позволяет добиться эрадикации вируса, предотвратить развитие тяжелых осложнений хронических вирусных гепатитов (цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК)) и сохранить трудоспособность у 40–60 % пациентов.

На протяжении многих лет в основе лечения гепатита С лежала монотерапия «Интерфероном альфа». Современная противовирусная терапия представляет собой комбинированную терапию пегилированным «Интерфероном» и «Рибавирином» (PEG-IFN/RBV) согласно рекомендациям Американской ассоциации по изучению болезней печени (AASLD) 2009 г. и Европейской ассоциации по изучению болезней печени (EASL) 2011 г. При этом цель лечения определяется как достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО, SVR).

Тактика противовирусной терапии ХГС определяется скоростью вирусологического ответа, так называемая «тактика, определяемая ответом». В последние годы разработан метод прогнозирования ответа на терапию на основании изучения вирусной кинетики ранней стадии лечения. Длительность курса терапии также зависит от вирусологического ответа.

Длительность лечения, необходимая для достижения УВО, определяется темпами снижения вирусной нагрузки в крови и исходными характеристиками пациента, такими как стадия фиброза, уровень вирусной нагрузки HCV, генотип HCV. Тактику ведения пациента позволяет определить результат исследования вирусной нагрузки при помощи ПЦР в реальном времени на 4-й, 12-й и 24-й неделе терапии.

Устойчивый вирусологический ответ (УВО) — надежный критерий элиминации вируса из организма. Наличие УВО можно рассматривать как излечение. Вероятность УВО прямо пропорциональна времени исчезновения РНК ВГС в процессе лечения.

К сожалению, на фоне длительной противовирусной терапии (48 или 72 недели при генотипе 1 ВГС) возможно ухудшение качества жизни пациента и развитие побочных эффектов лечения: преимущественно нейropsychологические расстройства (раздражительность, бессонница, снижение настроения, общая слабость и недомогание), характерны повышение температуры, снижение уровня гемоглобина, изменения функции щитовидной железы, алопеция, сухость кожных покровов. Иногда побочные эффекты столь выражены, что лечение приходится прекращать.

Очевидно, что выявление детерминант ответа на лечение, в том числе генетических, имеет большое значение как для врача, которому необходимы критерии прогноза эффективности лечения, так и для пациента, который перед началом проведения стандартной терапии должен быть информирован о соотношении вероятности достижения УВО и риска развития побочных действий используемых противовирусных препаратов.

В настоящее время точно установлено, что изменения в кластере генов цитокинов (**IL28A**, **IL28B** и **IL29**), локализованных на 19 хромосоме (19q13) человека, являются основным фактором, определяющим особенности противовирусной защиты организма. Наибольшее значение имеет полиморфизм в регионе, примыкающем к гену интерлейкина 28В (IL28В).

Показано, что полиморфизмы IL28В определяют и вероятность самопроизвольной элиминации HCV, и ответ на терапию «Интерфероном» и «Рибавирином».

Основную роль при инфицировании гепатитом С играют две однонуклеотидные замены:

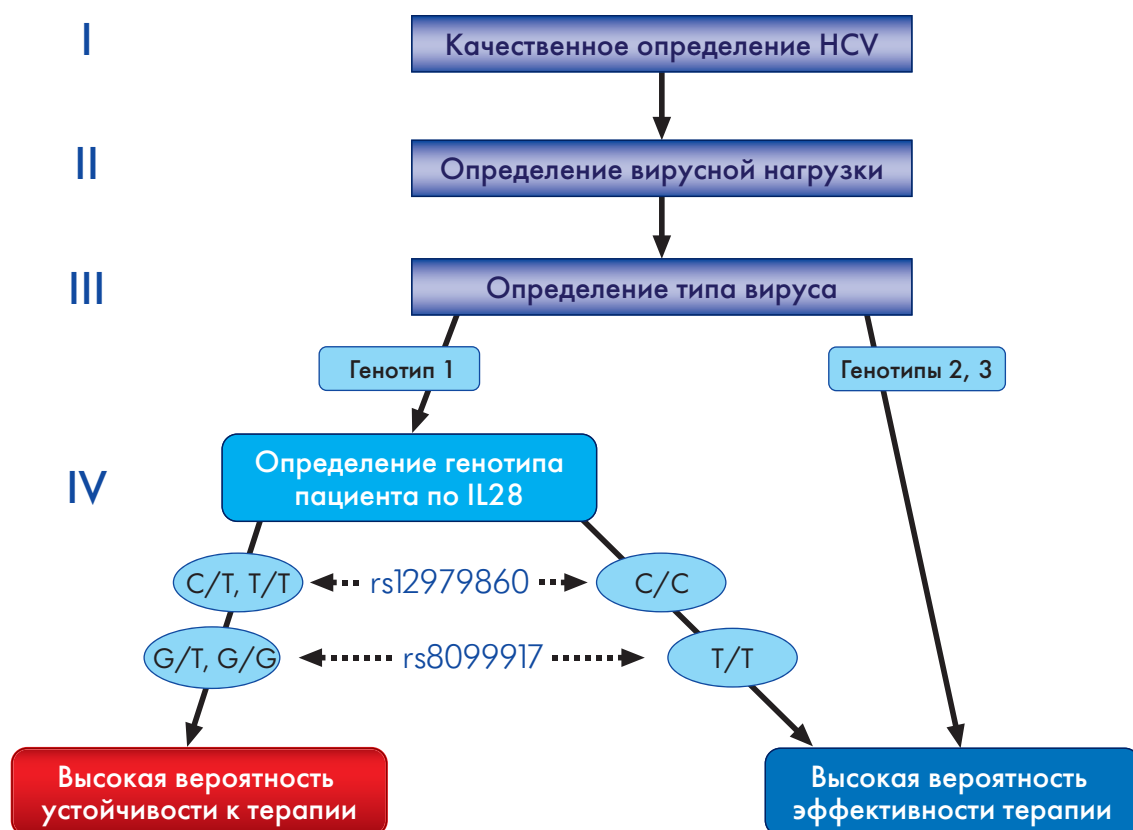
- ❖ **замена цитозина на тимин (C>T)**, имеющая обозначение **rs12979860** в базе данных dbSNP Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI);
- ❖ **замена тимина на гуанин (T>G)**, имеющая обозначение **rs8099917**.

У носителей генотипа rs12979860 C/C наблюдается повышение в два раза вероятности положительного ответа на лечение «Интерфероном» и «Рибавирином». Также генотип C/C преимущественно выявляется среди людей со спонтанным разрешением инфекции. При этом при генотипе C/C вирусная нагрузка (количество вируса в крови) до лечения выше, чем у носителей аллелей T/T.

Генотип rs8099917 T/T связан со спонтанным разрешением инфекции, независимо от лечения.

Аллель G в rs8099917 является аллелем риска и ассоциирован с низким уровнем ответа на терапию пегилированным «Интерфероном» и «Рибавирином».

Показано, что наибольшее значение полиморфизм IL28В имеет при инфицировании 1 субтипом HCV. На основании этого рекомендуется следующий **алгоритм обследования при подготовке к лечению**.



Определение генотипа пациента по IL28B может изменить алгоритм принятия решения о лечении путем изменения как длительности стандартного курса терапии ПЕГ ИФН/РИБ, так и длительности тройной терапии ХГС. Оптимизация терапии позволит избежать многих дополнительных проблем при лечении пациентов с высокой вероятностью положительного ответа при назначении терапии (избежать дополнительных побочных эффектов и дополнительных затрат на тройную терапию с включением ингибиторов протеазы – «Телапревира» и «Боцепревира»).

Показания к генетическому анализу:

- ❖ прогнозирование исхода заболевания;
- ❖ выбор между стандартным и пегилированным «Интерфероном» в комбинации с «Рибавирином» для лечения ХГС;
- ❖ выбор тактики «ожидание доступности тройной терапии с включением ингибиторов протеазы НСV» или лечение по стандартной схеме двойной терапии «Интерфероном» в комбинации с «Рибавирином» для пациентов с дополнительными факторами (кроме фиброза печени), уменьшающими вероятность излечения препаратами существующего стандарта противовирусной терапии.

Технология анализа генетических полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms – SNPs)

В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов.

Технология ПЦР с анализом кривых плавления дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса фрагмент–проба (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления.

Технология включает следующие этапы:

- ❖ амплификация искомой последовательности ДНК;
- ❖ гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (пробами), мечеными флуорофорами;
- ❖ образование комплементарных и частично комплементарных дуплексов;
- ❖ плавление (денатурация) дуплексов;
- ❖ детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления.

Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют метод *примыкающих проб (kissing probes или резонансный перенос энергии)*.

В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (*проб*), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой – акцептором (гасителем). Идентификация нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе *плавления дуплексов* (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси.

Преимуществом данного подхода является использование *специфических флуорофоров*, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как при использовании интеркалирующих красителей.

Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальную технологию выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления.

Преимуществами данной технологии являются:

- ❖ **Использование Taq-полимеразы, блокированной специфическими антителами**, на этапе амплификации искомого участка ДНК с праймерами, общими для обоих вариантов последовательности:
 - реализация «горячего старта» без применения парафина;
 - предотвращение неспецифического отжига праймеров;
 - повышение чувствительности комплектов реагентов.
- ❖ Для повышения надежности типирования компания «ДНК-Технология» использует **модификацию метода примыкающих проб**:
 - сиквенс-специфичные типизирующие олигонуклеотиды;
 - одновременная гибридизация с двумя альтернативными типизирующими зондами, меченными различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта искомой последовательности в одной пробирке в отличие от систем с интеркалирующими красителями, где для определения одного SNP необходимо использовать две пробирки для разделения аллельных вариантов.
- ❖ **Автоматическое генотипирование и интерпретация результатов в режиме реального времени** с использованием специализированного программного обеспечения.
- ❖ **Возможность визуальной интерпретации результатов** за счет определения разницы температур плавления не менее 4-5 °С для аллельных вариантов одного гена.

Компания «ДНК-Технология» разработала набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В, методом ПЦР в режиме реального времени (ИммуноГенетика IL 28В)

Технические характеристики и состав набора реагентов

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Taq-АТ-полимераза	2 пробирки (по 24 мкл)
Масло минеральное	2 пробирки (по 960 мкл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (по 480 мкл)
Исследуемые полиморфизмы	1 пробирка IL28В: rs12979860 C>T – 960 мкл 1 пробирка IL28В: rs8099917 T>G - 960 мкл
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2... +8 °С -20 °С (для Taq-АТ-полимеразы)

Технология:

- ПЦР-плавление;
- использование других технологических платформ не допускается.

Реагенты для выделения ДНК:

- ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА.

Минимальное количество ДНК для анализа:

1,0 нг на амплификационную пробирку.

Дополнительные реагенты:

реагенты для контроля качества ДНК (КВМ) – для детектирующего амплификатора ДТ-322.

Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Преимущества использования комплекта реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В, методом ПЦР в режиме реального времени:

- технологичность (стандартные методики ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени);
- высокая скорость (для определения генотипа пациента требуется не более суток);
- автоматическая выдача результатов (для приборов серии ДТ);
- низкая стоимость анализа;
- высокая чувствительность (технология позволяет достоверно отличать аллельные состояния гена друг от друга);
- одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена;
- внутренний контроль (ВК) позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

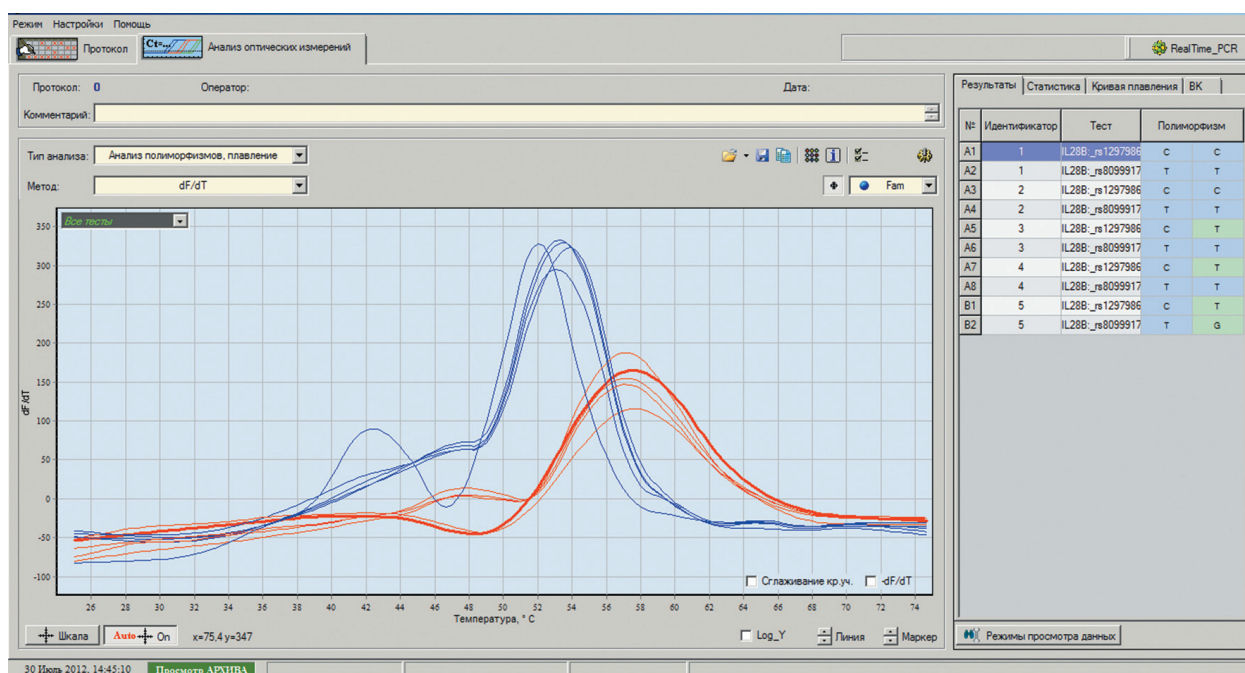
Оборудование, необходимое для проведения анализа:

Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии ДТ производства ООО «НПО ДНК-Технология»):** ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается) (рис. 1).



Рис. 1. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Приборы **серии ДТ** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Уникальные технические характеристики приборов позволяют сократить время амплификации до 1 часа 20 минут, а общее время проведения анализа – до 2 часов 30 минут. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.



Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной** и **наглядной форме** для анализа полученных данных врачами-клиницистами.

№	Наименование исследования	Результаты	
		С	Ср
1	IL28B:_rs12979860_C>T	C C	27,5
2	IL28B:_rs8099917_T>G	T T	27,5
3	IL28B:_rs12979860_C>T	C C	27,0
4	IL28B:_rs8099917_T>G	T T	27,5
5	IL28B:_rs12979860_C>T	C T	27,0
6	IL28B:_rs8099917_T>G	T T	28,0
7	IL28B:_rs12979860_C>T	C T	27,5
8	IL28B:_rs8099917_T>G	T T	27,5
9	IL28B:_rs12979860_C>T	C T	27,5
10	IL28B:_rs8099917_T>G	T G	28,0

Дополнительные исследования:

- определение генотипа вируса гепатита С;
- определение вирусной нагрузки HCV;
- определение стадии фиброза.



Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология» Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125 Ж, корп. 6
Тел./факс: (495) 980-45-55 www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

Телефон горячей линии:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный)