

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2015 г.

Регистрационный №163-1214

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1
К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

Авторы:

д.м.н. В.Ф. Еремин, к.б.н. Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович, М.В. Домнич,
д.м.н. И.И. Кучеров, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск, 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

07.05.2015

Регистрационный № 163-1214

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1
К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

Авторы:

д.м.н. В.Ф. Еремин, к.б.н. Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович, М.В. Домнич,
д.м.н. И.И. Кучеров, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск, 2014

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) представлен метод определения мутаций резистентности в геноме ВИЧ-1, изолированного от пациентов с ВИЧ/СПИД, находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) и без терапии.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов и врачей-вирусологов.

1. КОНТИНГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОБСЛЕДОВАНИЮ

1. Впервые выявленные случаи ВИЧ-инфекции;
2. Пациенты на ВААРТ, не отвечающие на терапию;

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ

1. вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови;
2. морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже -20°C ;
3. прилавок с температурой -70°C ;
4. специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом;
5. твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл, $25-100^{\circ}\text{C}$;
6. микроцентрифуги (5000-12000 об/мин) под пробирки типа 1,5, 0,5 мл – 2 шт.;
7. центрифуга/вортекс (1500-3000 об/мин), под пробирки 0,5, 1,5 мл – 2 шт.;
8. отдельный набор автоматических пипеток переменного объема – 3 комплекта;
9. амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой);
10. УФ трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением;

11. камера для горизонтального электрофореза с источником питания;
12. специализированные ПЦР боксы (ламинарные шкафы) с бактерицидной лампой;
13. халаты и одноразовые резиновые перчатки;
14. одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5, 0,5 и 0,2 мл;
15. штативы для микропробирок и наконечников;
16. одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
17. одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
18. холодильники с рабочей температурой $+2-8^{\circ}\text{C}$ с морозильной камерой;
19. емкости с дезинфицирующим раствором;
20. наборы для выделения РНК;
21. агароза;
22. 50 x ТАЕ буфер;
23. дистиллированная вода;
24. 1% раствор бромистого этидия;
25. генетический анализатор;
26. программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования;
27. персональный компьютер (2);
28. ацетат натрия;
29. этиловый спирт.

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

3.1. Забор материала и его транспортировка в ПЦР-лабораторию.

В качестве материала для исследований используется плазма крови. Забор крови осуществляется путем венозной пункции общепринятыми методами. Получение плазмы крови осуществляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут.

Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в ПЦР-лабораторию по возможности непосредственно в день забора материала. Хранить плазму можно не более 1 недели при температуре от 18 до 25°C и в течение 20 суток при температуре плюс 2-8 °C.

Транспортировка клинического материала должна осуществляться в соответствии с требованиями по перевозке биологического материала в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосах со льдом в течении 1 суток. Каждый образец, для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

3.2 Основные правила безопасности.

3.2.1 Персонал допускается к работе только после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

3.2.2 Все работы проводятся в изолированных помещениях (зонах), аккредитованных для работы методом ПЦР. Посторонние лица в лабораторию не допускаются. Во время работы двери боксов и предбоксов должны быть закрыты; выход из бокса во время проведения работы запрещается.

3.2.3 При работе обязательно использование сменных медицинских халатов, сменной обуви, защитных масок и перчаток. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде.

3.2.4 Работа с ДНК должна проводиться в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

3.2.5 При работе с патогенным материалом следует четко выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» (постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

3.2.6 Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

Зона 1 – выделение РНК;

Зона 2 – проведение ОТ и ПЦР;

Зона 3 – очистка полученных фрагментов и проведение секвенирующей ПЦР;

Зона 4 – секвенирование полученных фрагментов.

Каждая зона содержит свой набор оборудования и расходных материалов. При переходе из одной зоны в другую следует менять халаты, перчатки. Потенциально основной источник контаминации РНКазами – руки исследователя. Необходимо одевать и менять перчатки.

Перед началом работы проводят обработку пола, стен, мебели боксового помещения дезинфицирующими средствами и облучение ультрафиолетом за 1 час до начала работы в течение не менее 30 минут. Рабочее пространство ламинарного шкафа и автоматические дозаторы перед работой обрабатывают с использованием спиртосодержащих антисептиков и ультрафиолетовых облучателей в течение не менее 30 минут.

4. Получение фрагментов РНК ВИЧ для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

4.1. Выделение РНК/ДНК ВИЧ.

Для выделения РНК/ДНК ВИЧ используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК/ДНК, любого производителя. Выделение проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору.

4.2. Проведение реакции.

4.2.1 Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ для участка гена *pol* (протеаза и 2/3 обратной транскриптазы) проводят в объеме 20 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер – 4,0 мкл, рэндом праймер или праймер RP1A 1,0 мкл, смесь трифосфатов 2,0 мкл (10mM), ингибитор РНКаз – 0,5

мкл (20 Ед.), обратная транскриптаза – 1,0 мкл (200 Ед), РНК-10мкл, бидистиллированная вода – 1,5 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводят в следующем режиме: 42°C – 60 мин; 70°C – 10 мин. После проведения 1-го раунда ПЦР пробирки поместить в специальный штатив и оставить в зоне 3 при плюс 4°C (не более 12 часов), либо оставить на хранение при минус 15 – 25°C не более 1 недели. Пробирки готовы к проведению второго раунда ПЦР («гнездовая» ПЦР).

4.2.2 Амплификация

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер RP1S, 20 мМ
3. Праймер RP1A, 20 мМ
4. Деионизированная вода
5. ПЦР-Буфер, 10x
6. MgCl₂, 25 мМ
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Таq-полимераза, 5 U/мкл

Протокол реакции:

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	18.7 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 x
3.	MgCl ₂	2 мкл	2 мМ
4.	Праймер RP1S	0.25 мкл	0.2 мМ

5.	Праймер RP1A	0.25 мкл	0.2 мМ
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 мМ
7.	Тaq-полимераза	0.125 мкл	0.625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 24 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0.2 мл для каждого исследуемого образца. Добавить 1 мкл исследуемой кДНК после реакции ОТ в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10-15 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} x 35
95°C	30 сек	
55°C	30 сек	
72°C	1 мин 30 сек	
72°C	7 мин	
4°C хранение		

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер PROS2, 20 мМ
3. Праймер RTOA, 20 мМ
4. Деионизированная вода
5. ПЦР-Буфер, 10x
6. MgCl₂, 25 мМ
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Таq-полимераза, 5 U/мкл

Протокол реакции:

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовьте ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	18.7 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 x
3.	MgCl ₂	2 мкл	2 mM
4.	Праймер RP1S	0.25 мкл	0.2 mM
5.	Праймер RP1A	0.25 мкл	0.2 mM
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 mM
7.	Taq-полимераза	0.125 мкл	0.625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 24 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0.2 мл для каждого исследуемого образца. Добавить 1 мкл исследуемой ДНК после первого раунда ПЦР в каждую пробирку.

Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10-15 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Программа амплификации:

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} x 35
95°C	30 сек	
55°C	30 сек	
72°C	1 мин 30 сек	
72°C	7 мин	
4°C хранение		

4.2.3 Электрофорез продуктов амплификации

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидия в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1.8%, рисунок 1.

Буфер для электрофореза – 0.5%

Tris [оксиметил]аминометан (Tris)

Борная кислота

Na₂EDTA

Объем ДНК для электрофореза – 5 мкл.

Объем загрузочного буфера – 1 мкл

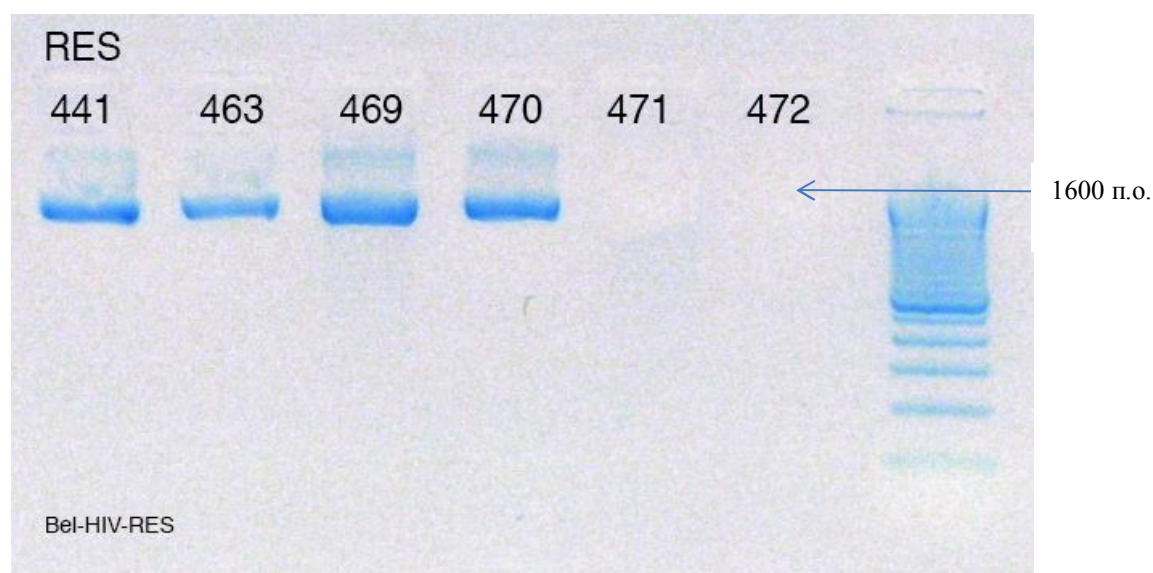


Рисунок 1 Электрофорез продуктов ПЦР

5. Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК.

6. Секвенирующая ПЦР

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

ддН ₂ О	4 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5хбуфер	7 мкл
Bigdye Terminator	1 мкл
ДНК	4 мкл
Общий объем 20 мкл	

Секвенирующую ПЦР проводят в следующем режиме:

96°С 10 сек	} 25 циклов
96°С 10 сек	
50°С 5 мин	
72°С 4 мин	
4°С - хранение	

Аmplифицированные пробы очищаются методом преципитации, вносятся 20 мкл HiDi Formamid и загружаются в генетический анализатор.

7. Проведение анализа полученных результатов по определению мутаций резистентности ВИЧ-1.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.

Для определения мутаций резистентности используется база данных, из интернета:

Стэнфордская база данных (<http://hivdb.stanford.edu>)

Лос-Аламосская базы данных (<http://hiv.net/link.php?id=25>).

База данных "geno2pheno" (<http://geno2pheno.org>).

или аналогичные компьютерные программы