

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра,
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

И.В. Гаевский
25.05.2016
Регистрационный № 241-1215

МЕТОД РАСШИФРОВКИ СЛУЧАЕВ АРТИФИЦИАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТОВ В и С

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, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск, 2016

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) представлен метод расшифровки случаев атипичного инфицирования вирусами гепатитов В и С (ВГВ и ВГС) с использованием секвенирования и филогенетического анализа.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов.

1. КОНТИГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОБСЛЕДОВАНИЮ

1.1. Пациенты с острыми гепатитами В и С с эпидемиологически доказанными случаями: переливания крови, гемодиализа, протезирования зубов и другими медицинскими манипуляциями.

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

- 2.1. вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови;
- 2.2 морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже -20°C;
- 2.3 прилавок с температурой -70°C;
- 2.4 специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом;
- 2.5 твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл, 25-100°C;
- 2.6 микроцентрифуги (5000-12000 об/мин) под пробирки типа 1,5, 0,5 мл – 2 шт.;
- 2.7 центрифуга/вортекс (1500-3000 об/мин), под пробирки 0,5, 1,5 мл – 2 шт.;
- 2.8 отдельный набор автоматических пипеток переменного объема – 3 комплекта;
- 2.9 амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой);

- 2.10 УФ трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением;
- 2.11 камера для горизонтального электрофореза с источником питания;
- 2.12 специализированные ПЦР боксы (ламинарные шкафы) с бактерицидной лампой;
- 2.13 халаты и одноразовые резиновые перчатки;
- 2.14 одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5, 0,5 и 0,2 мл;
- 2.15 штативы для микропробирок и наконечников;
- 2.16 одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
- 2.17 одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
- 2.18 холодильники с рабочей температурой +2-8⁰С с морозильной камерой;
- 2.19 емкости с дезинфицирующим раствором;
- 2.20 наборы для выделения РНК;
- 2.21 агароза;
- 2.22 50 x TAE буфер;
- 2.23 дистиллированная вода;
- 2.24 1% раствор бромистого этидия;
- 2.25 генетический анализатор;
- 2.26 программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования;
- 2.27 персональный компьютер (2);
- 2.28 ацетат натрия;
- 2.29 этиловый спирт.

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАННОГО 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 °С.

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 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 РНКазми – 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 ДНК ВГВ и ВГС для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

4.1. Выделение РНК ВГС и ДНК ВГВ.

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

4.2. Проведение реакции для получения фрагмента ДНК ВГС.

4.2.1 Обратная транскрипция

Обратная транскрипция по участкам генов *core/E1* и NS5 ВГС проводится с рэндом праймерами в объеме 20 мкл по следующей прописи: смесь №1: рэндом праймер – 1 мкл (0,2 мМ), исследуемый образец РНК ВГС – 5 мкл, бидистиллированная вода 0,35 мкл. Добавить исследуемую РНК ВГС к рэндом праймеру, осторожно перемешать, поместить в термостат при температуре 65°C и прогреть пробу в течение 5 минут, охладить до 25°C. Приготовить смесь №2: 5x РТ-буфер – 2 мкл, обратная транскриптаза – 1,0 мкл (40 Ед), смесь трифосфатов – 0,4 мкл (1 мМ), ингибитор РНКаз – 0,25 мкл (20 Ед), бидистиллированная вода - 0,35 мкл. Смесь осторожно перемешать на вортексе и осадить центрифугированием. Полученные смеси №1 и 2, поставить в амплификатор при 25°C на 10 минут, затем при 37°C на 60 минут, после чего поместить на лед.

4.2.2 Амплификация по участку гена *core/E1* ВГС

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер fw 290
3. Праймер rw 1321
4. Деионизованная вода
5. ПЦР-буфер, 10x
6. MgCl₂
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Таq-полимераза, 5Ед/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. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	16.1 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2,5 мкл	2 мМ
4.	Праймер fw 290	0,5 мкл	0.4 мкМ
5.	Праймер rw 1321	1,0 мкл	0.4 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 мМ
7.	Тақ-полимераза	0.2 мкл	0.625 Ед
8.	кДНК	2мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой кДНК после реакции обратной транскрипции, в соответствующую пробирку с реакционной смесью. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 5-10 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C - 5 мин

95°C	45 сек	} 40 циклов
63°C	45 сек	
72°C	90 сек	

72°C 7 мин

4°C хранение

Продукт первой ПЦР разводят в 100 раз и используют во втором раунде:

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер fw 480
3. Праймер rw 1321
4. Деионизованная вода
5. ПЦР-буфер, 10x
6. MgCl₂
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Таq-полимераза, 5Ед/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. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизованная вода	15,1 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 x
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	1 мМ
4.	Праймер fw 480	2,0 мкл	0.5 мкМ
5.	Праймер rw 1321	1,0 мкл	0.5 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 мМ
7.	Таq-полимераза	0.2 мкл	0.625 Ед
8.	кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК после первого раунда ПЦР в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10-15 сек.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C - 5 мин

95°C 45 сек }
 62°C 45 сек } 35 циклов
 72°C 90 сек }

72°C 7 мин
 4°C хранение

4.2.3 Электрофорез продуктов амплификации

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидиума 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

Размер амплифицированного продукта составляет 729 п.н. (рис. 1).

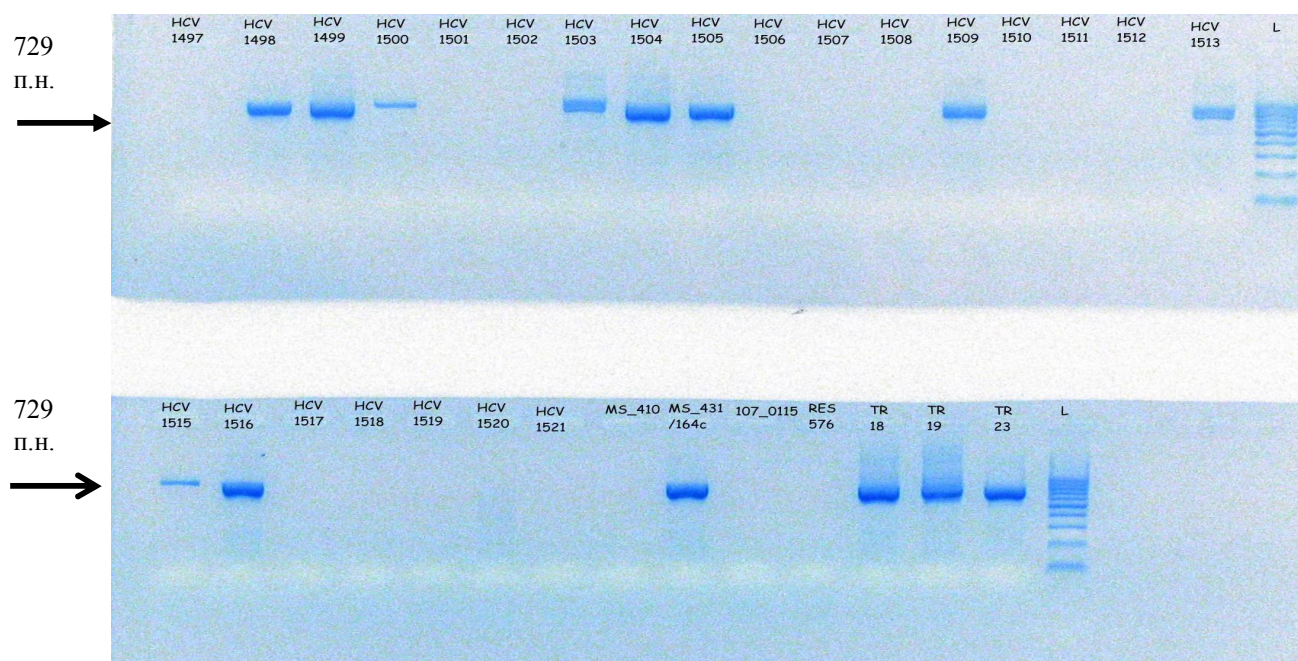


Рисунок 1 - Результаты электрофоретической детекции core/E1 участка генома ВГС (HCV, MS и TR– исследуемые образцы, L – маркер молекулярного веса).

4.2.4. Амплификация по участку гена NS5 ВГС.

Для выявления фрагмента генома ВГС NS5 используется кДНК, полученная после обратной транскрипции, реакция проводится в один раунд.

Компоненты ПЦР:

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	13,1 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 x
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	2,5 мМ
4.	Праймер fw 242	2,0 мкл	0,3 мкМ
5.	Праймер rw 243	2,0 мкл	0,3 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,5 мМ
7.	Тақ-полимераза	0,2 мкл	1,0 Ед
8.	кДНК	3 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 22 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 3 мкл исследуемой кДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10-15 сек.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C - 5 мин

95°C 15 сек
45°C 30 сек
72°C 60 сек } 35 циклов

72°C 7 мин

4°C хранение

Размер амплифицированного продукта составляет 395 п.н.

Режим амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 с, 45°C – 30с, 72°C – 1 мин (35 повторов); 72°C – 5 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидиума в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1.8%. Размер продуктов амплификации определяют с помощью маркера молекулярного веса ДНК 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н., рисунок 2.

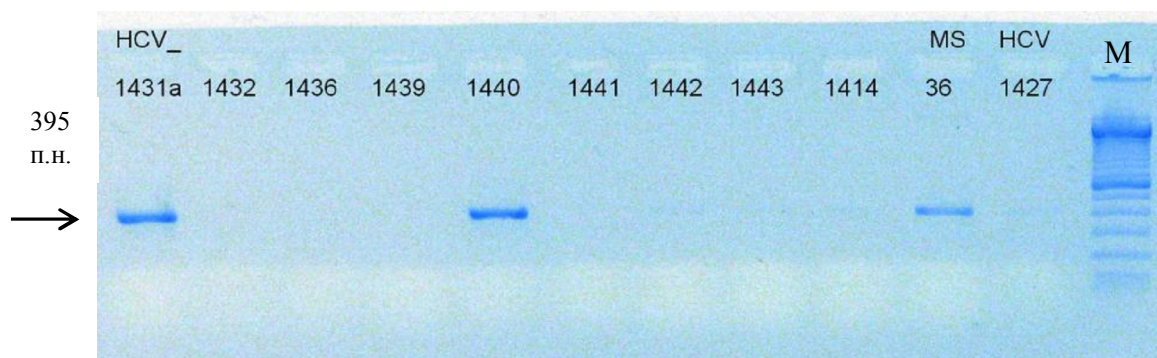


Рисунок 2 – Результаты электрофоретической детекции NS5 участка генома ВГС (1431a, 1432.....1437 – исследуемые образцы, М – маркер молекулярного веса).

4.2.5. Амплификация по участку гена S ВГВ.

Амплификация по участку гена S ВГВ проводится в варианте «гнездовой» в два раунда ПЦР.

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. ДНК
2. Праймер P1 10мкМ
3. Праймер pR5 10мкМ
4. ПЦР-буфер, 10х
5. MgCl₂ 25мМ
6. Смесь дНТФ, 25мМ
7. Taq-полимера, 5Ед/мкл
8. Деионизованная вода

Протокол реакции

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	17,175 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	2 мМ
4.	Праймер fw P1	0,5 мкл	0.2 мкМ
5.	Праймер rw pR5	0,5 мкл	0.2 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 мМ
7.	Taq-полимераза	0.125 мкл	0.625 Ед
8.	кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об/мин 10-15 сек.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C 5 мин

95°C 30 сек

53°C 30 сек

72°C 1 мин

72°C 7 мин

} 35 циклов

4°C хранение

Второй раунд.

Компоненты ПЦР:

Компоненты ПЦР:

1. ДНК
2. Праймер P4 10мкМ
3. Праймер pR2 10мкМ
4. ПЦР-буфер, 10х
5. MgCl₂ 25мМ
6. Смесь дНТФ, 25мМ
7. Таq-полимера, 5Ед/мкл
8. Деионизованная вода

Протокол реакции

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизованная вода	17,175 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2.5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2,0 мкл	2 мМ
4.	Праймер fw P4	0,5 мкл	0.2 мкМ
5.	Праймер rw pR2	0,5 мкл	0.2 мкМ
6.	Смесь дНТФ	0.2 мкл	0.2 мМ
7.	Таq-полимераза	0.125 мкл	0.625 Ед
8.	кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК в каждую

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

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	
95°C	30 сек	} 35 циклов
50°C	30 сек	
72°C	1 мин	
72°C	7 мин	
4°C	хранение	

Электрофорез продуктов амплификации проводили, как было сказано выше в 1.8% агарозном геле, рисунок 3.

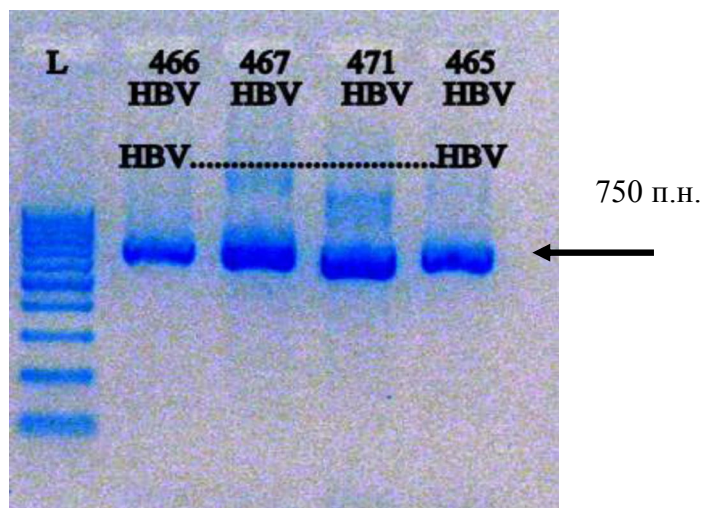


Рисунок 3 – Результаты электрофоретической детекции S участка генома ВГВ (466, 467, 471, 465 – исследуемые образцы, L – маркер молекулярного веса).

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	8 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5хбуфер	4 мкл
Bigdye Terminator 3.1	2 мкл
ДНК	2 мкл
Общий объем 20 мкл	

Секвенирующую ПЦР проводят в следующем режиме:

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

Аmplифицированные пробы очищаются методом спирт/ацетатной преципитации, вносится 20 мкл HiDi Formamid после чего образцы загружаются в генетический анализатор.

7. Проведение филогенетического анализа с целью определения возможных связей между образцами.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей ВГВ и ВГС, определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6, рисунки 4 и 5.

8. Доказательством искусственного пути инфицирования является:

1. Наличие достоверных эпидемиологических сведений о искусственном пути инфицирования;

2. Наличии данных о степени родства между вирусами, определенными у «источника» и «восприимчивого» лица.

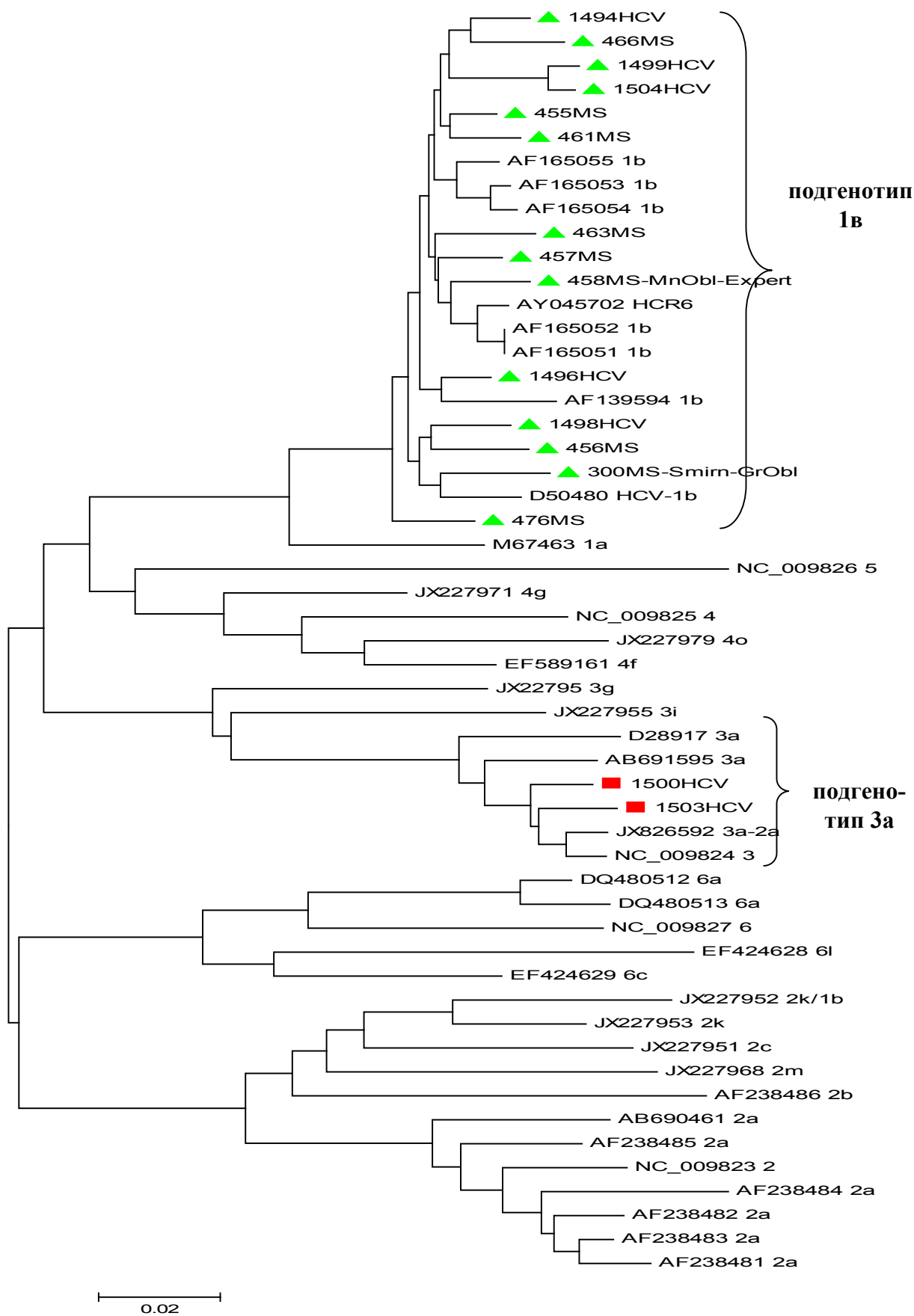


Рисунок 4 - Филогенетическое дерево по участку гена core/E1 ВГС



Рисунок 5 - Филогенетическое дерево по участку гена S ВГВ

9. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Все реакции отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности
Ампликон в отрицательной пробе	Реагенты контаминированы
Нет специфического ампликона в исследуемой пробе несмотря на определяемую вирусную нагрузку	Вирусная нагрузка ниже 3000 копий ДНК/РНК на мл