

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

6 мая 2010 г.

Регистрационный № 034-0310

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

д-р мед. наук В.Ф.Еремин

доц., канд. мед. наук Н.В.Матиевская

ст. н. с., канд. биол. наук Е.Л.Гасич

проф., д-р. мед. наук В.М.Цыркунов

Гродно 2010

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ — молекулярно-эпидемиологический мониторинг ВГС (вирус гепатита С) на территории Республики Беларусь.

ЗАДАЧИ

- установление генотипов ВГС, циркулирующих на территории РБ;
- дизайн праймеров для ОТ-ПЦР (обратная транскрипция — полимеразная цепная реакция) для последующего определения филогенетических связей между циркулирующими на территории РБ генотипами ВГС;
- установление времени появления и направления заноса новых генотипов вирусов на исследуемой территории;
- выявление мутаций ВГС резистентности к противовирусным препаратам и прогнозирование эффективности различных схем терапии ВГС-инфекции;
- разработка эффективных мероприятий по профилактике новых случаев инфицирования ВГС среди различных контингентов населения;
- оценка точности используемых тест-систем для диагностики ВГС-инфекции.

ИСПОЛНИТЕЛИ

- областные, городские центры гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья;
- Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» министерства здравоохранения РБ.

КОНТИНГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ МОНИТОРИНГУ

1. Впервые выявленные случаи ВГС-инфекции (моно ВГС-инфекция, коинфекция ВГС/ВИЧ, коинфекция ВГС/туберкулез, ВГС/ВИЧ/туберкулез).
2. ВГС-инфекция у пациентов с рецидивом после противовирусной терапии гепатита С (стандартными интерферонами, пегинтерферонами).

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 любого типа, обеспечивающий температуру $25\text{--}100^{\circ}\text{C}$.
6. Микроцентрифуга любого типа (5000–12000 об/мин) под пробирки типа «Эппендорф» — 2 шт..
7. Центрифуга/вортекс (1500–3000 об/мин) любого производителя — 2 шт.
8. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема любого производителя — 3 комплекта.

9. Амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой) любого производителя.
10. УФ-трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением любого производителя.
11. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания любого производителя.
12. Специализированные ПЦР-боксы с бактерицидной лампой любого производителя.
13. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
14. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 и 0,2 мл.
15. Штативы для микропробирок и наконечников.
16. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и 1000 мкл.
17. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл.
18. Холодильники с рабочей температурой +2–8°C с морозильной камерой.
19. Емкости с дезинфицирующим раствором.
20. Наборы для выделения РНК.
21. Агароза.
22. 50xTAE буфер.
23. Дистиллированная вода.
24. 1% раствор бромистого этидия.
25. Сопроводительное донесение (Приложение 1)

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

База выполнения	Функция	Регулярность
О(Г)ЦГЭ и ОЗ	Сбор клинических и эпидемиологических данных. Сбор плазмы крови, выделение РНК ВГС. Проведение ОТ-ПЦР, хранение кДНК, доставка образцов кДНК ВГС в ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» МЗ РБ.	6 пациентов в 1 месяц
ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» МЗ РБ	Создание коллекции образцов кДНК ВГС и плазмы крови, проведение секвенирующей ПЦР и филогенетического анализа, определение мутаций резистентности ВГС в образцах	42 исследования в 1 месяц
ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» МЗ РБ	Предоставление ежегодного отчета в областные, городские центры гигиены и эпидемиологии и общественного здоровья о результатах мониторинга	1 раз в год (декабрь)

2. Правила забора материала. Для проведения анализа используется плазма периферической крови. Взятие крови проводится утром натощак в пробирку типа «Вакутайнер» с 3 %-м раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10 мин при 3 тыс. об/мин, после чего отбирают плазму отдельными наконечниками с аэрозольным барьером и переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Забор крови и ее транспортировка производится согласно руководству «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1–4 групп патогенности» № 11–7–13–2002, утвержденному Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь от 30.12.2002.

3. Правила доставки и хранения материала. Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в ПЦР-лабораторию при возможности непосредственно в день забора материала. Хранить плазму можно не более 1 недели при температуре от 2 до 8°C и в течение года — при температуре не ниже -68 °C.

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

5. Получение фрагментов РНК ВГС для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

5.1. Работа с РНК

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 надевать и менять перчатки.

Для выполнения исследований используются одноразовые пластиковые пробирки и наконечники, свободные от РНКаз и ДНКаз.

5.2. Выделение РНК ВГС

Для выделения РНК ВГС используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК из плазмы/сыворотки крови. Выделение производят согласно инструкции, прилагаемой к набору.

5.3. Проведение реакции

1. Обратная транскрипция. Реакция проводится в объеме 20 мкл с использованием random праймеров.

Смесь 1	ПЦР	Сток	мкл/образец
ддН ₂ О			1
дНТП	500 нМ	10000 нМ	1
random праймеры	7,5 нг/мкл	30,0 нг/мкл	5,0
РНК	5мкл		
Всего:			12 мкл
Смесь 2			
DTT	10 мМ	100 мМ	2
РНАзин.	1 Ед/мкл	40,0 Ед/мкл	0,5
буфер	1х	5х	4,0
MuLV	10 Ед/мкл	200 Ед/мкл	1,0
ддН ₂ О			0,5
Всего:			8,0

Последовательность проведения реакции обратной транскрипции:

- готовится смесь 1 без РНК;
- по 7 мкл в каждую пробирку;
- добавить 5 мкл РНК;
- выдержать 5 мин при 65°С (распрямляется нить РНК);
- поместить на лед;
- готовится смесь 2;
- добавить по 8 мкл смеси 2 в каждую пробирку;
- RT = 60 мин. — 40°С (37°С) и 15 мин. — 72°С.

II. Проведение I раунда ПЦР:

V=25 мкл

Праймеры:

fw – СМО_fw290utr

rv – СМО_rv1321e1

1. 95°С – 5мин.

2. 95°С – 1 мин.

3. 63°С – 1 мин.

4. 72°С – 1 мин.

5. 72°С – 5 мин.

} 40 циклов

Реагенты	в ПЦР	Сток	мкл (для 1 исследования)
ддН ₂ О			15,3
10x буфер	1x	10x	2,5
MgCl ₂	2,5 мМ	50мМ	1,25
дНТП	200 нМ	10000нМ	0,5
Fw праймер	0,05 мкМ	10,0 мкМ	0,13
Rv праймер	0,05 мкМ	10,0 мкМ	0,13
Тақ полимераза	0,04 Ед/мкл	5,0 Ед/мкл	0,2
кДНК	5,0 мкл		5,0
Total:			25,0

20 мкл – на образец + 5 мкл кДНК (1:10 – конечное разведение – 1:50)

3. ПЦР II:

V=25мкл

праймеры:

fw – СМО_fw480c

rv – СМО_rv1321e1

1. 95°C – 5мин

2. 95°C – 1 мин

3. 62°C – 1 мин

4. 72°C – 1 мин

.

5. 72°C – 5 мин

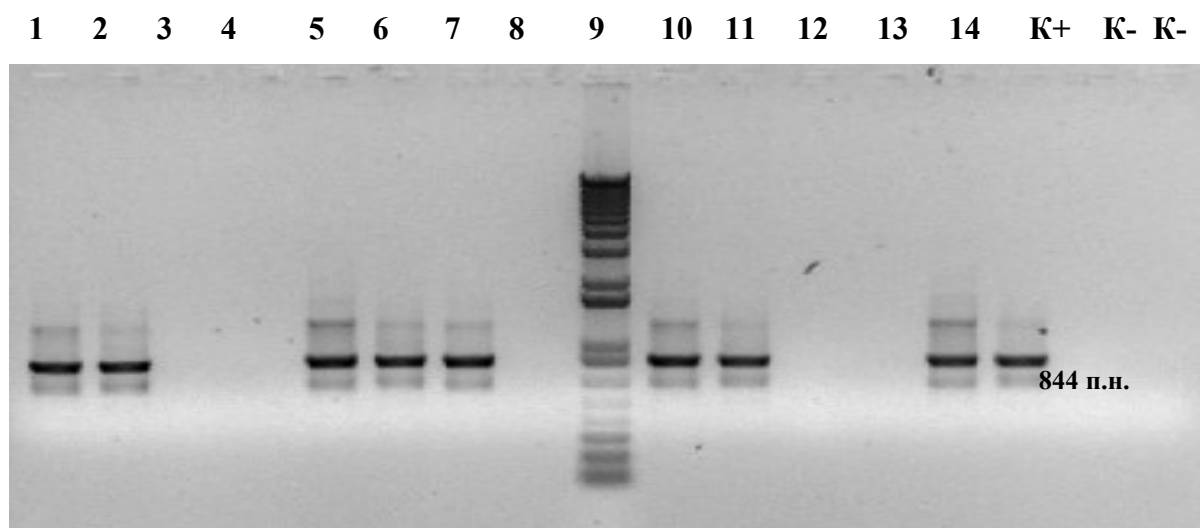
} 35 циклов

Проведение I I раунда ПЦР:

Реагенты	в ПЦР	Сток	мкл (для 1 исследования)
ддН ₂ О			15,3
10x буфер	1x	10x	2,5
MgCl ₂	2,0мМ	50 мМ	1,0
дНТП	200нМ	1000нМ	0,5
Fw праймер	0,1мкМ	10,0 мклМ	0,25
Rv праймер	0,1мкМ	10,0 мкМ	0,25
Тақ полимераза	0,04U/мкл	5,0 U/мкл	0,2
кДНК	5,0 мкл		5,0
Total:			25,0

20 мкл на образец + 5 мкл ДНК – 1:100

Фрагмент = 844 п.н.



4. Очистка полученных фрагментов проводится по стандартной методике с использованием наборов, предназначенных для очистки фрагментов ДНК после ПЦР

5. Проведение секвенирующей ПЦР проводится по стандартной схеме:

V=20 мкл.

А. ДНК (в рабочем разведении) — 4 мкл

Б. праймер (прямой и обратный) — 4 мкл

В. 5x буфер — 7 мкл

Г. BigDye терминатор — 1 мкл

Л. дН₂О — 4 мкл

96°C — 1 мин.

96°C — 10 с.

50°C — 5 сек.

60°C — 4 мин.

4°C — хранение

} 25 циклов

6. Проведение анализа полученных результатов и построение филогенетического дерева.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения филогенетических связей между образцами используются стандартные программы: SeqScape, BioEdit, MEGA 4 (рисунок 1).

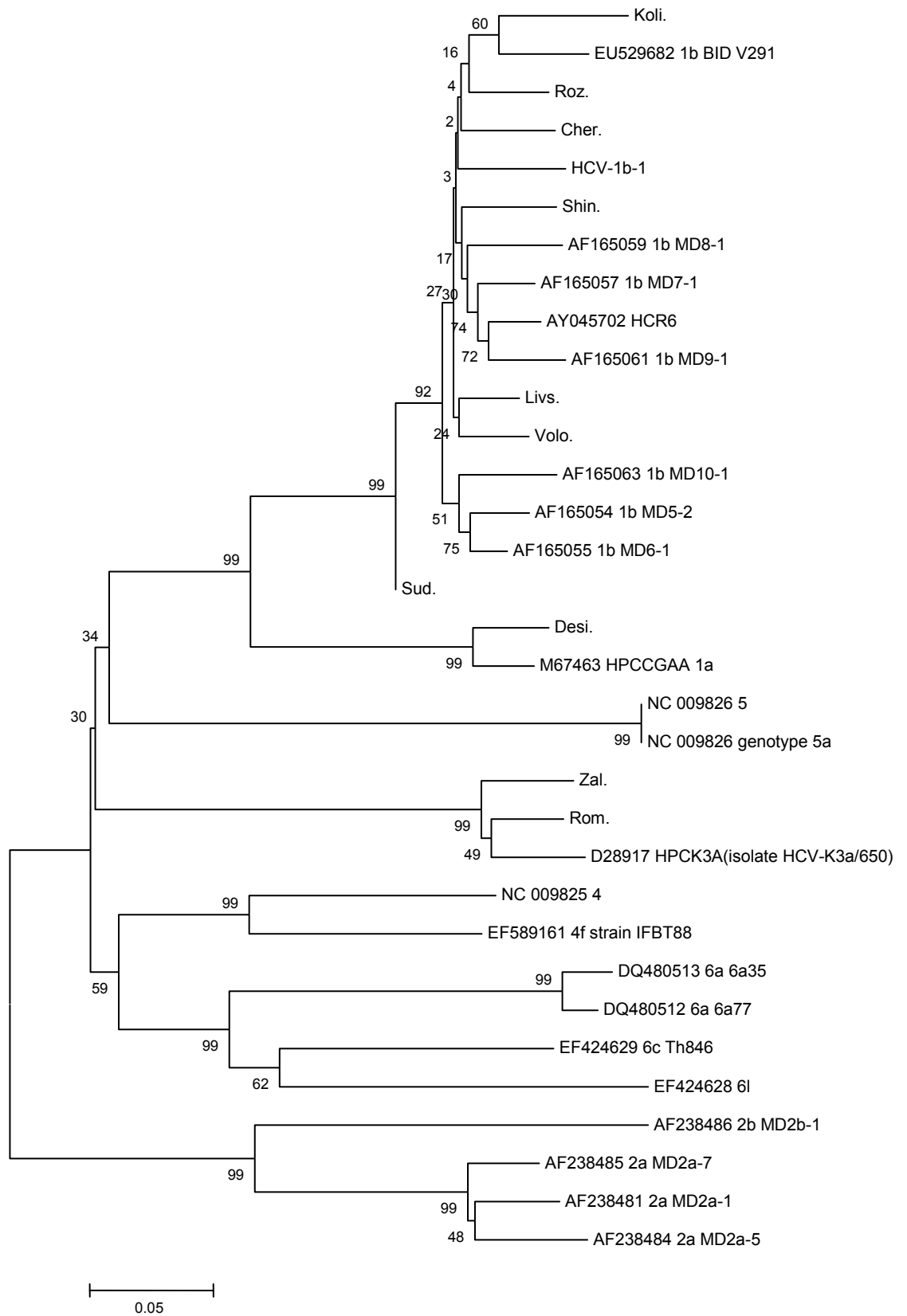


Рис. 1. Филогенетический анализ образцов ВГС

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование инструкции практическими врачами — эпидемиологами, инфекционистами, вирусологами, эпидемиологами позволит создать единую систему мониторинга циркулирующих вариантов ВГС на территории РБ, получить информацию о происхождении и времени заноса вирусов, степени родства вирусов у разных пациентов из одного региона и в целом по республике. Следовательно, это поможет определять возможные источники заражения пациентов, предотвращать распространение вируса в РБ, своевременно оценивать точность используемых диагностических тест-систем, предотвращать контаминацию крови и донорских органов, осуществлять разработку наиболее эффективных профилактических мероприятий, оценивать частоту резистентных к интерфероновым препаратам генотипов ВГС среди населения РБ.

Приложение

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТА БОЛЬНОГО С HCV-ИНФЕКЦИЕЙ

1. ФИО _____
2. Год рождения _____
3. Пол больного: мужской / женский _____
4. Дата предполагаемого инфицирования ВГС (месяц, год) _____
5. Дата установления инфицирования ВГС: анти-ВГС (дата — месяц, год) _____
6. Место инфицирования (регион: РБ, РФ, Украина, другие) _____
7. Путь инфицирования: гемотрансфузии, ПИН, половые партнеры, другие _____
8. Дата первичного выявления РНК ВГС (ПЦР): дата (месяц, год) _____
9. Генотип: 1a, 1в, 2a, 3a _____
10. Титр ВГС или виремия (количество копий РНК) _____
11. Интерфероны: год (____), продолжительность _____ (недель), препараты (стандартные, ПЭГ) _____
12. Рибавирин: год (____), продолжительность _____ (недель), снижение дозы (да/нет) _____
13. Ответ на ИФТ после отмены лечения: ПЦР (РНК – отрицат. или РНК – положит.) _____
14. Дата предполагаемого инфицирования ВИЧ (месяц, год) _____
15. Дата установления инфицирования ВИЧ (дата — месяц, год) _____
16. Место инфицирования ВИЧ (регион: РБ, РФ, Украина, другие) _____
17. Путь инфицирования: ПИН, половые партнеры, другие _____
18. Диагноз ВИЧ: клиническая стадия: 1, 2, 3, 4; АИ, пре-СПИД, СПИД; кат. А/В/С/ СД4 (____) _____
19. Терапия ВИЧ/СПИД: АРТ получает/ не получает, продолжительность _____
20. Схема АРТ /дата назначения _____
21. Перерывы схем АРТ _____
22. Туберкулез: дата выявления: _____
23. Клиническая форма: _____
24. Дата заполнения _____
25. Примечание: _____