

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный

Государственный санитарный врач

 *Н.П. Жукова* Н.П. Жукова

«*19*» *сентября* 2018 г.

Регистрационный № 005-0618

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК РИККЕТСИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Красько А.Г., канд. мед. наук Рустамова Л.М.,
Князева О.Р., Верещако Н.С., Погоцкая Ю.В., Старинская Т.С.

Минск, 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
Государственный санитарный врач

_____ Н.П. Жукова

19.12.2018

Регистрационный № 005-0618

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК РИККЕТСИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Красько А.Г., канд. мед. наук Рустамова Л.М.,
Князева О.Р., Верещако Н.С., Погоцкая Ю.В., Старинская Т.С.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод выявления ДНК риккетсий в биологическом материале (клещи-переносчики, кровь, ликвор пациентов) с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с амплификацией диагностически значимых участков генома риккетсий в режиме реального времени и/или ПЦР амплификацией диагностически значимых участков генома с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием.

Инструкция предназначена для врачей-микробиологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с клещевыми инфекциями в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и(или) осуществляющих государственный санитарный надзор.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Показания к применению:

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику инфекций, переносимых клещами, и эпидемиологическом надзоре клещевых инфекций.

2. Противопоказания

Противопоказаний нет.

3. Перечень необходимого оборудования, реагентов, расходных материалов:

3.1. Оборудование и материалы для сбора клинических образцов.

Герметичные пробирки с крышками на 1,5 мл и 15 мл для забора биопроб и вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови; транспортировочные контейнеры для упаковки и транспортировки проб в

соответствии с условиями работы с патогенными биологическими объектами 1-3 групп биологического риска.

3.2. Оборудование и материалы для проведения ПЦР и секвенирования

1. Термоциклер с оптической системой детекции.
2. Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин.
3. Центрифуга типа «Эппендорф».
4. ПЦР боксы класса BSL2.
5. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания.
6. Гельдокументирующая система.
7. 3 комплекта автоматических дозаторов.
8. Вортекс.
9. Твердотельный термостат.
10. Генетический анализатор.
11. Морозильник с температурой (-20°C).
12. Пластиковые пробирки (1,5 мл., 0,2 мл., 2 мл.) и наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов (1-10 мкл., 10-100 мкл., 100-1000 мкл.).

3.3. Реагенты для проведения ПЦР и секвенирования

1. Праймеры и зонды.
2. Реагенты для проведения ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером, Mg^{2+} , смесь дезоксинуклеотидов, деионизованная вода).
3. Реагенты для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизованная вода).
4. Формамид для молекулярной биологии (HiDi Formamid).
5. Агароза для гель-электрофореза.
6. Буфер для электрофореза 10x ТБЭ или 50x ТАЭ.

7. Маркер молекулярного веса.
8. Колонки для очистки продуктов ПЦР или аналогичные реагенты.
9. Реагенты и материалы для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (наборы для очистки продуктов ПЦР колоночным, преципитационным или ферментативным методами).
10. Комплект реагентов для выделения ДНК любого производителя.

3.4. Программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей.

Стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.1, LaserGene и др.

4. Описание технологии используемого метода для выявления генетического материала риккетсий в биологическом материале.

4.1. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала.

4.1.1. Забор биологического материала – клещей-переносчиков.

Проводят в сезон активности клещей флаговым методом, либо путем снятия особей у пациентов, с соблюдением правил работы с патогенами 1-3 групп биологического риска в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждённых Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2., в стерильные герметичные разовые пробирки объемом 1,5 мл и/или 15 мл с влажным тампоном. После забора, пробирки обязательно обрабатываются дезинфектантами и упаковываются в транспортный контейнер.

Условия хранения материала:

При температуре от 20°C до 25°C – не более 12 часов с момента получения материала, при температуре от 2°C до 8°C – не более 4-6 дней, при (-20°C) до 6 месяцев, до года и более при (-70°C).

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

4.1.2. Забор биологического материала – кровь пациентов.

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (NB! В противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Условия хранения материала:

- образцы цельной крови: при температуре от 20°C до 25°C – хранятся в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

4.1.3. Получение биологического материала – плазмы крови.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об./мин., после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл.) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желательно разлить небольшими (0,1-0,2 мл.) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл. с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения материала:

- образцы плазмы крови: при температуре от 2°C до 8°C – хранятся в течение 5 суток; при температуре от (-16°C) до (-20°C) – в течение года.

Забор крови и ее транспортировка производится в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

4.1.4. Транспортирование биологического материала.

Транспортирование материала осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом в возможно короткий срок при температуре от 4°C до 8°C. При невозможности немедленной отправки – в течении 4 часов после забора – пробы замораживают при (-20°C) и далее транспортируют в замороженном виде. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

4.2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления генетического материала риккетсий:

4.2.1. Предварительная подготовка проб биологического материала (клещей).

Все работы по анализу клещей на наличие ДНК возбудителей клещевых инфекций проводят в условиях стерильного бокса, используя стерильные инструменты, посуду и растворы.

Отмывку клещей проводят следующим образом: с использованием стерильного пинцета клеща помещали в чашку Петри, содержащую 70% этанол, промывали в течение 30 – 40 секунд, затем клеща перекладывали в чашку Петри с подложкой из фильтровальной бумаги для подсушивания, далее, обрабатывали в чашке с 96% этанолом, затем – физиологическим

раствором и подсушивают на воздухе. После отмывки клеща помещают в пробирку типа эппендорф, с присвоением индивидуального учетного номера.

Гомогенизацию клещей осуществляют с использованием механического гомогенизатора с добавлением 50 мкл. 1х фосфатно-солевого буфера, рН 7,5. После завершения гомогенизации добавляют 100 мкл фосфатно-солевого буфера и из части материала осуществляют выделение нуклеиновых кислот.

4.2.2. Выделение ДНК риккетсий.

Выделение ДНК из отобранных проб биологического материала (клещи, плазма крови) проводится в соответствии с инструкцией коммерческой тест-системы, предназначенной для выделения ДНК из тканей, культур клеток, плазмы/сыворотки крови.

4.2.3. Диагностическая амплификация по участку гена цитрат синтетазы риккетсий *gltA* в режиме реального времени.

4.2.3.1. Проведение реакции диагностической амплификации.

Диагностическая амплификация с праймерами к фрагменту гена цитрат синтетазы (ген *gltA*) с 1126 по 1176 нуклеотиды проводится в режиме реального времени. Длина амплифицируемого фрагмента - 74 нуклеотида.

Пара праймеров и диагностический зонд:

Прямой праймер Rick-*gltA*-F 5'-TCGCAAATGTTACGGTACTTT-3'

Обратный праймер Rick-*gltA*-R 5'-TCGTGCATTTCTTTCCATTGTG-3'

Зонд Rick-*gltA*-Pr FAM-5'-TGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATG-3'-BHQ-1

Компоненты реакции диагностической амплификации (ПЦР):

- исследуемая ДНК,

- пара праймеров и внутренний диагностический олигонуклеотид-зонд для амплификации фрагмента гена цитрат синтетазы *gltA* риккетсий в режиме реального времени с использованием флюорофора FAM,

- 10x ПЦР-буфер, 25мМ MgCl₂, 25мМ смесь трифосфатов,

- фермент 5 Ед./мкл. Taq-полимераза,

- деионизованная вода.

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

№№ п/п	Компонент	Объем, образец	x1	Конечная концентрация
	Деионизованная вода	17,0 мкл.		-
	ПЦР-Буфер	2,5 мкл.		1 x
	MgCl ₂	2,0 мкл.		2 мМ
	Праймер Rick-gltA-F	0,5 мкл.		0,2 мкМ
	Праймер Rick-gltA-R	0,5 мкл.		0,4 мкМ
	Зонд Rick-gltA-Pr	0,5 мкл.		0,2 мкМ
	Смесь дНТФ	0,2 мкл.		0,2 мМ
	Taq-полимераза	0,3 мкл.		1,5 Ед.
	ДНК	2 мкл.		-

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл. ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл. 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 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор. Режим амплификации:

денатурация - 95 °С – 5 минут; 3-х цикловая амплификация - 95°С – 20 секунд, 60°С – 30 секунд – учёт реакции амплификации с 5-го цикла по каналу FAM, 72°С – 20 секунд (45 повторов).

4.2.3.2. Учёт результатов.

Проводят учет результатов реакции для детекции риккетсий, анализируя кривую накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM. Результат реакции оценивается как положительный, если значения порогового цикла (Ct) ниже или равно 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Результат реакции оценивается как отрицательный, если значения порогового цикла (Ct) отсутствуют, или превышают 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Подсчитывают абсолютное количество положительных и отрицательных, результатов реакции.

4.2.4. Диагностическая амплификация по участку гена поверхностного белка OmpA риккетсий с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

4.2.4.1. Проведение реакции диагностической амплификации.

Амплификация по участку гена поверхностного белка OmpA риккетсий, отвечающего за рецептор-опосредованное проникновение в клетки, проводится методом ПЦР с последующим анализом продуктов реакции методом электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Компоненты ПЦР:

- исследуемая ДНК, выделенная из пробы.

- пара праймеров для амплификации фрагмента гена белка OmpA риккетсий:

RICK-F - 5`-GCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGC-3`-

температура отжига - 60.1°С

RICK-R - 5`-TGCAGCATTCGCTCCCCCTAAAG-3`-

температура отжига -61.9⁰С

Размер амплифицируемого фрагмента – 532 пар оснований. Этот фрагмент позволяет провести дополнительное исследование путём секвенирования полученных ПЦР-продуктов для окончательной идентификации риккетсий в сравнении нуклеотидных последовательностей.

- 10x ПЦР-буфер, 25мМ MgCl₂, 25мМ смесь трифосфатов,
- фермент Taq-полимераза 5 Ед./мкл., деионизованная вода.

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

№№ п/п	Компонент	Объем, образец	x1	Конечная концентрация
	Деионизованная вода	17,0 мкл.		-
	ПЦР-Буфер	2,5 мкл.		1 x
	MgCl ₂	2,0 мкл.		2 мМ
	Праймер RICK-F	0,5 мкл.		0,2 мкМ
	Праймер RICK-R:	0,5 мкл.		0,2 мкМ
	Смесь дНТФ	0,2 мкл.		0,2 мМ
	Taq-полимераза	0,3 мкл.		1,5 Ед.
	ДНК	2 мкл.		

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл. ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл. 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 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор.

Режим амплификации:

денатурация - 95°C – 5 минут; 3-х цикловая амплификация - 95°C – 20 секунд, 60°C – 20 секунд, 72°C – 45 секунд (40 повторов).

Учёт результатов.

4.2.4.2. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации.

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием этидиума бромид в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1,5%, буферы – однократный ТБЭ или ТАЭ. Учёт результатов проводят с использованием проходящего УФ-света, длина волны 302 нм., на приборе любого производителя с фото документированием.

5. Описание технологии используемого метода для молекулярно-генетического типирования изолятов риккетсий.

Типирование изолятов риккетсий проводится путём определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК генома риккетсий и последующего сравнения с образцами международного банка GenBank методами биоинформационного анализа.

5.1. Очистка продуктов амплификации.

Очистка продуктов амплификации осуществляется колоночным или преципитационным методами на коммерческих наборах в соответствии с инструкцией производителя.

5.2. Проведение определения нуклеотидных последовательностей - секвенирующая ПЦР.

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

Компоненты	Объем
ддН ₂ О	4,5 мкл.
праймер прямой и обратный	1 мкл.
5хбуфер	2 мкл.
Bigdye Terminator 3.1	0,5 мкл.
ДНК	2 мкл.
Общий объем 10 мкл.	

Секвенирующая ПЦР в объеме 10 мкл. по следующей прописи: 1,0 мкл. прямого или обратного праймера (10 пкМ), 0,5 мкл. Bigdye terminator v.3.1, 2 мкл. ПЦР продукта (концентрация 10 нг.), 2 мкл. BigDye буфера, 4,5 мкл. деионизованной воды. Режим амплификации: 95°C – 3 минуты; 95°C – 10 секунд, 50°C – 5 секунд, 60°C – 2 минуты (25 повторов); 4°C – хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищаются от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

5.3. Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) продуктов ПЦР.

К очищенной пробе добавить по 20 мкл. формамида, перемешать 5 секунд на вортексе, сбросить кратким центрифугированием капли со стенок пробирок. Поместить пробирки в термостат при 95°C на 2 минуты. Немедленно образцы поместить на лед. Подготовленные пробы внести по 10 мкл. в планшет генетического анализатора и провести процедуру активации и запуска программы автоматического секвенирования.

5.4. Типирование изолята риккетсий.

Выполнить биоинформационный анализ результатов капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе с помощью стандартного программного обеспечения.

Для типирования риккетсий по гену поверхностного белка OmpA, отвечающего за рецептор-опосредованное проникновение в эукариотические клетки хозяина, используется программное обеспечение MEGA 6.0 и последующие версии, другие коммерческие программы анализа, а также программы on-line доступа BlastN, BlastX. Типирование проводится путём сравнения с известными последовательностями из международной базы данных GenBank (или аналогичной).

Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

В таблице 1 представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения.

Таблица 1 Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкие значения флюоресценции при диагностической амплификации. Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Деградация ДНК и/или низкое содержание исходной ДНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК.
	Деградация ДНК	Использовать пробы ДНК сразу после выделения. Контроль качества наборов для выделения ДНК, согласно инструкции производителя.
	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе.	Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования	Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования
	Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку её продуктов.
При сравнении сиквенса в программе Blast нет гомологии с риккетсиями	Ложноположительная реакция ПЦР амплификации из-за нарушения условий – низкая температура отжига праймеров.	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов.