

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра – Главный  
государственный санитарный врач

\_\_\_\_\_ Н.П. Жукова  
19.12.2018  
Регистрационный № 023-1118

МЕТОД ПОСТМОРТАЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА  
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., Родионова Л.П., Семёнов С.Ф., Старинская Т.С.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод постмортального выявления бешенства в биологическом материале на основе использования реакции обратной транскрипции совмещённой с амплификацией диагностически значимых участков генома вируса бешенства в режиме реального времени и/или обратной транскрипции совмещённой с амплификацией диагностически значимых участков генома с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей лабораторной практики.

## **ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

### **1. Показания к применению**

Инструкция может быть использована для постмортального выявления вируса бешенства при энцефалитах и подозрении на бешенство, не подтвержденных лабораторными исследованиями, а также проведение молекулярно-генетических исследований изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

### **2. Противопоказания**

Противопоказания для применения метода отсутствуют.

### **3. Перечень медицинской техники, изделий медицинского назначения и реактивов**

#### *3.1. Медицинская техника:*

термоциклер с оптическим модулем;

центрифуги с охлаждением на 14000 об./мин.;

микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13000 об./мин.;

ПЦР боксы класса BSL3;

аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле с источником питания;

гельдокументирующая система;

три комплекта автоматических дозаторов;

вортекс-шейкер;

твердотельный термостат;

генетический анализатор;

морозильник с температурой ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

### *3.2. Изделия медицинского назначения:*

пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл, 0,2 мл, 2 мл);

наконечники полимерные с фильтрами для автоматических дозаторов 1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;

штативы для пробирок.

### *3.3. Материалы для сбора клинических образцов:*

пробирки герметичные с крышками на 15 мл и 50 мл для забора биологического материала;

транспортировочные контейнеры для упаковки и транспортировки проб в соответствии с условиями работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) 3 группы биологического риска.

### *3.4. Реагенты для проведения ПЦР и секвенирования:*

праймеры и зонды;

набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером,  $\text{Mg}^{2+}$ , смесь дезоксинуклеотидов, деионизированная вода);

набор реагентов для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизированная вода);

формаид для молекулярной биологии (HiDi Formamid);

агароза для гель-электрофореза;

этидиум бромид;

маркер молекулярного веса;  
колонок для очистки продуктов ПЦР или аналогичные реагенты;  
набор реагентов и материалов для очистки продуктов после секвенирующей ПЦР (для очистки продуктов ПЦР колоночным, преципитационным или ферментативным методами);  
комплект реагентов для выделения РНК любого производителя;

*3.5. Программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей:*

стандартное программное обеспечение для анализа нуклеотидных последовательностей типа SeqScape, BioEdit, MEGA 6.1.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для проведения молекулярно-биологических исследований.

#### **4. Технология использования метода выявления РНК вируса бешенства в биологическом материале.**

Материалом для выделения РНК являются кусочки мозга, кожа и волосяные фолликулы при постмортальной диагностике бешенства.

*4.1. Правила забора, транспортировки и хранения биологического материала*

Забор биологического материала следует производить с соблюдением правил работы с ПБА 3 группы 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», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

Биологический материал помещают в стерильные герметичные разовые пробирки объемом 15 мл и/или 50 мл стерильным хирургическим инструментарием. Далее пробирки обязательно обрабатывают дезинфектантами, упаковывают в транспортный контейнер и доставляют в лабораторию в течение не более 2 часов с момента получения материала. Транспортирование биологического материала осуществляется в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом. В случае невозможности быстрой транспортировки материал должен храниться при температуре от 2°C до 8°C – не более 4-6 часов, при (-20°C) до двух недель, до года при (-70°C), более года при (-185°C) (криохранилище с жидким азотом). При таком хранении пробы транспортируют в замороженном виде. Допускается только однократное замораживание-оттаивание биологического материала для исследований.

Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

#### *4.2. Молекулярно-генетические исследования с целью выявления генетического материала вируса бешенства в биологическом материале*

##### 4.2.1. Предварительная подготовка проб биологического материала

Все работы по выявлению генетического материала вируса бешенства проводят в условиях стерильного бокса, используя стерильные инструменты, посуду и растворы. Биологический материал предварительно отмывают стерильным физиологическим раствором, подсушивают на воздухе и гомогенизируют механическим методом, готовят 10% суспензию на фосфатно-солевом буфере, рН 8,0, которую используют далее для выделения генетического материала вируса бешенства.

##### 4.2.2. Выделение РНК вируса бешенства.

Для выявления РНК вируса бешенства в биологическом материале используют праймеры для амплификации фрагмента гена N вируса бешенства в режиме реального времени.

Компоненты ПЦР: исследуемая РНК, пара праймеров и внутренний диагностический олигонуклеотид-зонд для амплификации фрагмента гена N белка вируса бешенства в режиме реального времени с использованием флюорофора FAM:

RabN-F-Rt: GAGGACTGCTCGGGGCTGGT

Длина олигонуклеотида: 20 н.о Tm: 60.3 °C

RabN-R-Rt: GGGGACTTCCCACTCAAGCCCA

Длина олигонуклеотида: 22 н.о Tm: 60.1

RabN-Pr-Rt: FAM-TGAGCCAGGACAAGAGACAGCTGT-BHQ1

Длина олигонуклеотида: 24 н.о Tm: 59.6 °

10x ОТ-ПЦР-буфер, 25мМ MgCl<sub>2</sub>, 25мМ смесь трифосфатов, смесь ферментов: 10 000 Ед./мкл обратная транскриптаза/ 5Ед./мкл Taq-полимераза, деионизованная вода.

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

№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
	Деионизированная вода	16,5 мкл	-
	ОТ-ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 x
	MgCl <sub>2</sub>	2,0 мкл	2 мМ
	Праймер RabN-F-Rt	0,5 мкл	0,2 мкМ
	Праймер RabN-R-Rt	0,5 мкл	0,4 мкМ
	Зонд RabN-Pr-Rt	0,5 мкл	0,2 мкМ

	Смесь дНТФ	0,25 мкл	0,25 мМ
	Смесь ОТ-Тaq-полимераза	0,25 мкл	1,25 Ед
	РНК	2 мкл	

Аккуратно перемешивают ПЦР-смесь, кратко осаждают.

Добавляют по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Добавляют 2 мкл исследуемой РНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешивают смесь на вортексе, осаждают центрифугированием при 6000 об./мин. 10-15 сек.

Помещают пробирки в амплификатор. Режим амплификации: 65 °С – 10 мин.; резкое охлаждение до +4 °С – 5 мин.; обратная транскрипция – 50°С – 45 мин.; (внимание!!! – температура реакции с обратной транскриптазой у отдельных производителей может отличаться от указанной!!!); денатурация - 95 °С – 5 мин.; 3-х цикловая амплификация - 95°С – 20 сек., 60°С – 30 сек. – детекция сигнала с 5-го цикла по каналу FAM, 72°С – 20 сек. (45 повторов).

#### 4.2.3. Учет результатов

Для детекции вируса бешенства анализируют кривую накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM. Результат реакции оценивают как положительный, если значения порогового цикла (Ct) ниже или равно 40 - для приборов планшетного типа, 38 – для приборов роторного типа. Результат реакции оценивают 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 N вируса бешенства

Диагностическую амплификацию по участку гена N вируса бешенства проводят методом ОТ-ПЦР. Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Компоненты ПЦР:

исследуемая РНК, выделенная из биологического материала;

пара праймеров для амплификации фрагмента гена N белка вируса бешенства:

RabN-F-Rt – GCCAACTGGAGTACTATACC, размер праймера 20 н.о., температура отжига - 60.1<sup>0</sup>С.

RabN-R-Rt – CACTTGTCCCATATAGCATCC, позиция 965 н.о., размер праймера 21 н.о., температура отжига -59.9<sup>0</sup>С.

Размер амплифицируемого фрагмента – 383 п.о. Этот фрагмент позволяет провести дополнительное исследование путём секвенирования полученных ПЦР-продуктов для окончательной идентификации вируса бешенства.

Используется 10x ОТ-ПЦР-буфер, 25мМ MgCl<sub>2</sub>, 25мМ смесь трифосфатов, смесь ферментов: 10000 Ед./мкл обратная транскриптаза/ 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. Реакцию проводят в конечном объеме 25 мкл.

№ п/п	Компонент	Объем, х 1 образец	Конечная концентрация
	Деионизованная вода	17,0 мкл	-
	ОТ-ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 х
	MgCl <sub>2</sub>	2,0 мкл	2 мМ
	Праймер RabN-F:	0,5 мкл	0,2 мкМ
	Праймер RabN-R:	0,5 мкл	0,2 мкМ

	Смесь дНТФ	0,25 мкл	0,25 мМ
	Смесь ОТ-Тақ-полимераза	0,25 мкл	1,25 Ед
	РНК	2 мкл	

Аккуратно перемешивают ПЦР-смесь, кратко осаждают.

Добавляют по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Добавляют 2 мкл исследуемой РНК в каждую пробирку. Аккуратно перемешивают смесь на вортексе, осаждают центрифугированием при 6000 об./мин. 10-15 сек.

Помещают пробирки в амплификатор. Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданной программе.

Режим амплификации: 65°C – 10 мин.; резкое охлаждение до +4°C – 5 мин; обратная транскрипция – 50°C – 45 мин. (внимание!!! – температура реакции с обратной транскриптазой у отдельных производителей может отличаться от указанной!!!); денатурация - 95°C – 5 мин.; 3-х цикловая амплификация - 95°C – 20 сек., 60°C – 20 сек., 72°C – 40 сек. (40 повторов).

Учёт результатов.

#### 4.2.5. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации.

Электрофорез продуктов амплификации проводят в агарозном геле с использованием этидиум бромид в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1,5%. Учёт результатов проводят с использованием проходящего УФ-света, длинна волны 302 нм., на приборе любого производителя с фото документированием.

### **5. Технология используемого метода молекулярно-генетического типирования вируса бешенства**

Типирование изолятов вируса бешенства проводится путём определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов РНК генома вируса бешенства 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 выполняют секвенирующую ПЦР.

Состав реакционной смеси:

Компоненты	Объем
Деионизованная вода	4,5 мкл
праймер прямой и обратный	1 мкл
5хбуфер для Bigdye Terminator 3.1	2 мкл
Bigdye Terminator 3.1	0,5 мкл
ДНК	2 мкл
Общий объем 10 мкл	

Режим амплификации: 96°C – 5 мин.; 95°C – 10 сек., 50°C – 5 сек., 60°C – 2 мин. (25 повторов); 4°C – хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищают от не включенных нуклеотидов методом преципитации.

### *5.3. Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) продуктов ПЦР.*

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Hi-Di™ Formamide, перемешивают 5сек. на вортексе, сбрасывая кратким центрифугированием капли со стенок пробирок. Помещают пробирки в термостат при 95°C на 2 мин. Немедленно образцы помещают на лед. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

#### 5.4. Типирование изолята вируса бешенства.

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

Для типирования вируса бешенства по гену N используют программное обеспечение MEGA 6.0 и последующие версии, другие коммерческие программы анализа, а также программы on-line доступа BlastN, BlastX.

### 6. 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 и при диагностической амплификации.	Деградация РНК и/или низкое содержание исходной РНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения РНК.
	Деградация РНК	Использовать пробы РНК сразу после выделения. Контроль качества наборов для выделения РНК, согласно инструкции производителя.
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.
Невозможность прочтения	Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в	Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования

<b>Проблема</b>	<b>Возможная причина</b>	<b>Пути устранения</b>
сиквенсов на генетическом анализаторе.	реакции секвенирования	
	Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования	Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку её продуктов.
При сравнении сиквенса в программе Blast нет гомологии с вирусом бешенства	Ложноположительная реакция ПЦР амплификации из-за нарушения условий – низкая температура отжига праймеров.	Повторить процедуру амплификации с соблюдением условий и контролем реагентов.