

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

И.В. Гаевский

2016 г.

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, 2015

**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: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук В.Ф. Еремин, канд. биол. наук 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 искусственного инфицирования вирусами гепатитов В и С (ВГВ и ВГС) с использованием секвенирования и филогенетического анализа.

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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. 50x TAE-буфер.
23. Дистиллированная вода.
24. 1 %-й раствор бромистого этидия.
25. Генетический анализатор.

23. Программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования.

24. Персональный компьютер (2).

25. Ацетат натрия.

26. Этиловый спирт.

КОНТИГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОБСЛЕДОВАНИЮ

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

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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 мин.

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 сут при температуре 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 течение 1 сут. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

Основные правила безопасности

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

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 работы запрещается.

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

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

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 от 27.07.2000 № 40).

6. Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

- зона 1 — выделение РНК;
- зона 2 — ОТ и ПЦР;
- зона 3 — очистка полученных фрагментов и секвенирующая 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 и перчатки. Потенциально основной источник контаминации РНКазми — руки исследователя. Необходимо надевать и менять перчатки.

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

Получение фрагментов ДНК ВГВ и ВГС для последующего секвенирования и филогенетического анализа

1. Выделение РНК ВГС и ДНК ВГВ.

С этой целью используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК/ДНК любого производителя, которое проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору.

2. Реакция для получения фрагмента ДНК ВГС.

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 мин, 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 мин, затем при 37°C на 60 мин, после чего поместить на лед.

2.2. Амплификация по участку гена core/E1 ВГС.

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК.
2. Праймер fw 290.
3. Праймер rw 1321.
4. Деионизированная вода.
5. ПЦР-буфер, 10x.
6. MgCl₂.
7. Смесь дНТФ, 25 мМ.
8. Taq-полимераза, 5 Ед/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.

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	16,1 мкл	–
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1x
MgCl ₂	2,5 мкл	2 mM
Праймер fw 290	0,5 мкл	0,4 мкМ
Праймер gw 1321	1,0 мкл	0,4 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Taq-полимераза	0,2 мкл	0,625 Ед
кДНК	2 мкл	

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мкл 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 с.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C 5 мин

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

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 gw 1321.
4. Деионизированная вода.
5. ПЦР-буфер, 10x.
6. MgCl₂.
7. Смесь дНТФ, 25 mM.
8. Taq-полимераза, 5 Ед/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.

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	15,1 мкл	–
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1x
MgCl ₂	2,0 мкл	1 мМ
Праймер fw 480	2,0 мкл	0,5 мкМ
Праймер rw 1321	1,0 мкл	0,5 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
Taq-полимераза	0,2 мкл	0.625 Ед
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 с.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} 35 циклов
95°C	45 с	
62°C	45 с	
72°C	90 с	

72°C 7 мин

4°C хранение

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. (рисунок 1).

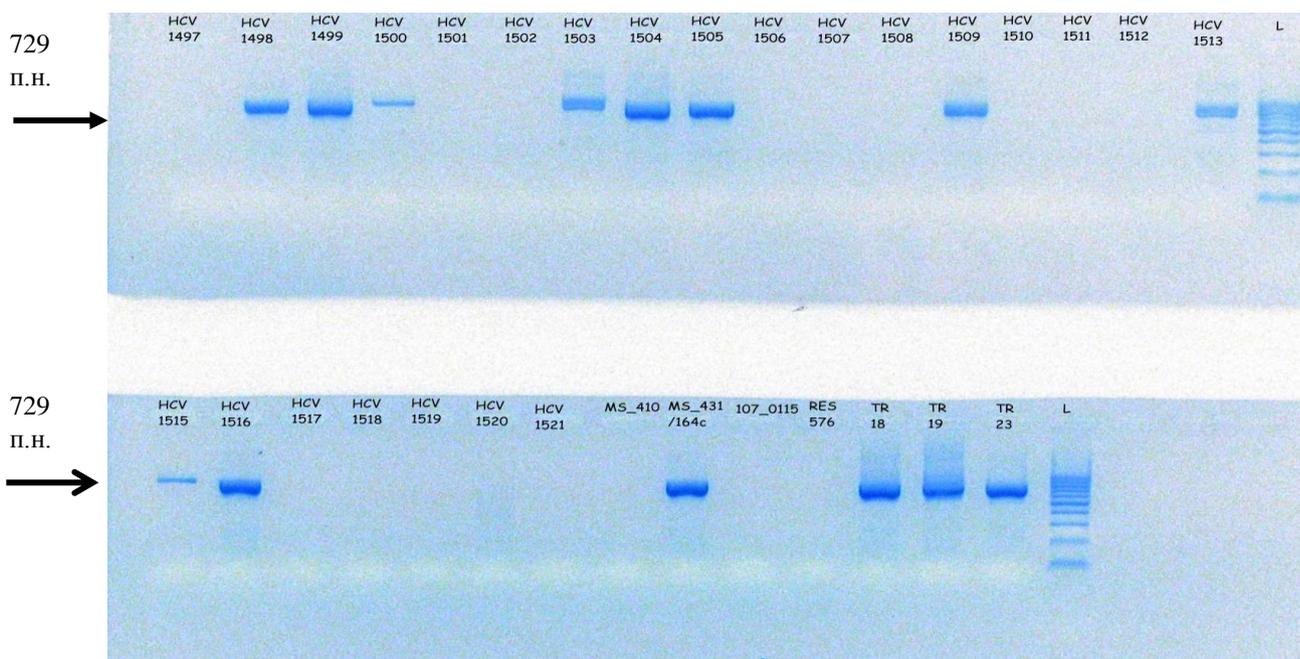


Рисунок 1. — Результаты электрофоретической детекции core/E1 участка генома ВГС (HCV, MS и TR — исследуемые образцы; L — маркер молекулярного веса)

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:

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	13,1 мкл	—
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1x
MgCl ₂	2,0 мкл	2,5 мМ
Праймер fw 242	2,0 мкл	0,3 мкМ
Праймер rw 243	2,0 мкл	0,3 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,5 мМ
Тaq-полимераза	0,2 мкл	1,0 Ед
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 с.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} 35 циклов
95°C	15 с	
45°C	30 с	
72°C	60 с	

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 — 30 с, 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).

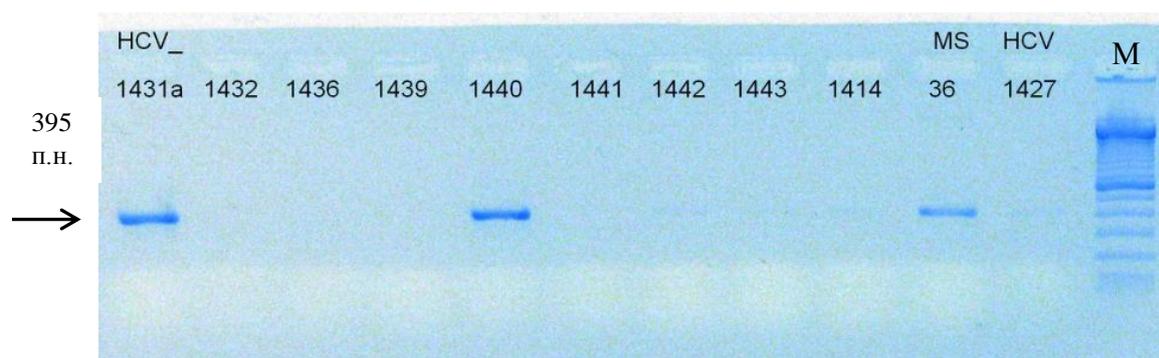


Рисунок 2. — Результаты электрофоретической детекции NS5 участка генома ВГС (1431а, 1432.....1437 — исследуемые образцы; М — маркер молекулярного веса)

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 10 мкМ.
3. Праймер pR5 10 мкМ.
4. ПЦР-буфер, 10х.
5. MgCl₂ 25 мМ.
6. Смесь дНТФ, 25 мМ.
7. Taq-полимераза, 5 Ед/мкл.
8. Деионизированная 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.

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	17,175 мкл	–
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1x
MgCl ₂	2,0 мкл	2 mM
Праймер fw P1	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер rw pR5	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Тaq-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
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 с.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} 35 циклов
95°C	30 с	
53°C	30 с	
72°C	1 мин	

72°C 7 мин

4°C хранение

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

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

Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
Деионизированная вода	17,175 мкл	—
ПЦР-буфер	2,5 мкл	1x
MgCl ₂	2,0 мкл	2 mM
Праймер fw P4	0,5 мкл	0,2 мкМ
Праймер rw pR2	0,5 мкл	0,2 мкМ
Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
Taq-полимераза	0,125 мкл	0,625 Ед
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 с.

Поместить пробирки в амплификатор.

Программа амплификации:

95°C	5 мин	} 35 циклов
95°C	30 с	
50°C	30 с	
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).

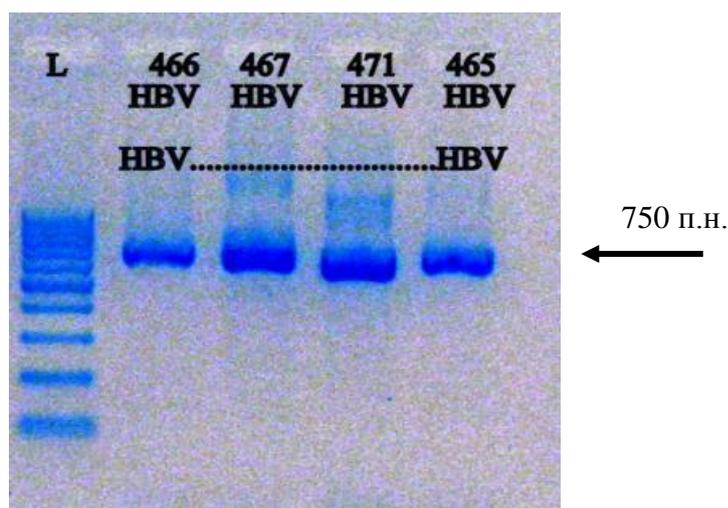


Рисунок 3. — Результаты электрофоретической детекции S участка генома ВГВ (466, 467, 471, 465 — исследуемые образцы; L — маркер молекулярного веса)

Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК.

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 с	} 25 циклов
96°C 10 с	
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.

Филогенетический анализ 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, 5).

Доказательством искусственного пути инфицирования является:

1. Наличие достоверных эпидемиологических сведений об искусственном пути инфицирования.
2. Наличие данных о степени родства между вирусами, определенными у «источника» и «восприимчивого» лица.

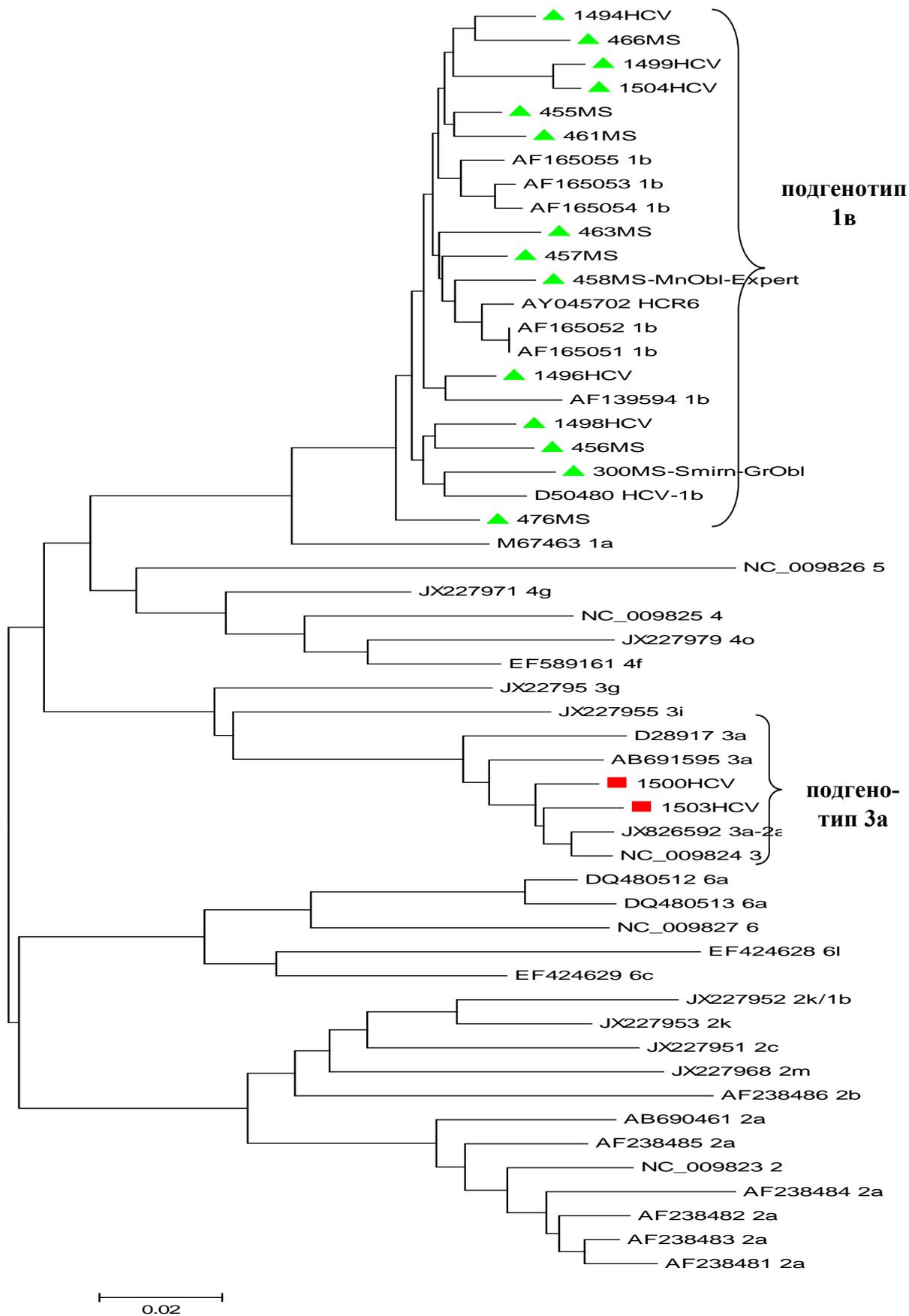


Рисунок 4. — Филогенетическое дерево по участку гена core/E1 ВГС



Рисунок 5. — Филогенетическое дерево по участку гена S ВГВ

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