

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА Е**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Жаворонок С.В., Марчук С.И., Арабей А.А.,
канд. биол. наук, доц. Давыдов В.В.

Минск, 2018

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВГЕ	- вирус гепатита Е
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксинуклеотидтрифосфат
кДНК	- комплементарная ДНК
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- ПЦР с обратной транскрипцией
РНК	- рибонуклеиновая кислота
УФ	- ультрафиолетовое излучение
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического выявления РНК вируса гепатита Е (ВГЕ), включающий в себя реакцию обратной транскрипции (ОТ) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику ВГЕ. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR) — используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы мРНК, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР. Гнездовая («вложенная», англ. nested PCR) ПЦР — применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ВГЕ, в стационарных и (или) амбулаторных условиях, а также учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор.

1. Показания к применению:

- 1.1. Скрининговые исследования интенсивности эпидемического и эпизоотического процессов ВГЕ на эндемичных и неэндемичных территориях.
- 1.2. Заболевания и патологические состояния человека, вызванные ВГЕ.
- 1.3. Дифференциальная диагностика острого гепатита людей.
- 1.4. Эпидемиологическое расследование случаев ВГЕ.
- 1.5. Скрининговые исследования донорской крови и ее продуктов на присутствие ВГЕ.

2. Противопоказания для применения:

Отсутствуют.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, расходных материалов и т.д.

3.1. Перечень необходимых медицинских изделий:

- 3.1.1. ПЦР-бокс с УФ-лампой.
- 3.1.2. Программируемый термоциклер (амплификатор).
- 3.1.3. Весы лабораторные (0,1-10 г).
- 3.1.4. Высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5-2,0 мл 8–12 тыс. оборотов/мин.
- 3.1.5. Микроцентрифуга-вортекс.
- 3.1.6. Холодильник (от 2°C до 8°C) с морозильной камерой (-20 °C).
- 3.1.7. Камера для горизонтального электрофореза.
- 3.1.8. Источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В.
- 3.1.9. СВЧ-печь.
- 3.1.10. УФ-трансиллюминатор.
- 3.1.11. Видеосистема для документирования гель-электрофореграмм, подключенная к персональному компьютеру.
- 3.1.12. Планшет для заливки геля, гребенки, держатели гребенок.
- 3.1.13. Пипетки-дозаторы переменного объема (1–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).
- 3.1.14. Штативы для хранения пробирок 1,5 мл.
- 3.1.15. Штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл.
- 3.1.16. ПЦР-пробирки 0,2 мл, 0,5 мл.
- 3.1.17. Одноразовые наконечники с фильтрами до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
- 3.1.18. Штативы для наконечников 10 мкл, 200 мкл и 1000 мкл.
- 3.1.19. Емкость для сброса использованных наконечников.
- 3.1.20. Одноразовые перчатки без талька.

3.2. Перечень необходимых реактивов для проведения ПЦР:

- 3.2.1. Набор для выделения РНК из биологических образцов.
- 3.2.2. Обратная транскриптаза.
- 3.2.3. Термостабильная ДНК-полимераза.
- 3.2.4. Ингибитор РНКазы.
- 3.2.5. 5х буферный раствор для проведения ОТ.
- 3.2.6. 10мМ смесь дНТФ.
- 3.2.7. 2х ПЦР-Мастер-Микс (готовая смесь для проведения ПЦР, содержащая все основные компоненты: оптимизированный буфер, дНТФ, ДНК-полимеразу).
- 3.2.8. Вода для молекулярно-биологических исследований.
- 3.2.9. 10х ТБЕ буфер.
- 3.2.10. Агароза для электрофореза.
- 3.2.11. Электрофоретические маркеры молекулярного веса ДНК (50-700 п.н.).
- 3.2.12. Загрузочный буфер для гель-электрофореза с красителем.
- 3.2.13. Раствор бромистого этидия для визуализации ДНК.

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

3.3. Требования, предъявляемые при выделении РНК из образцов биологического материала, проведении ПЦР и детекции продуктов амплификации

3.3.1. Все этапы работы (выделение РНК из образцов биологического материала, проведение ПЦР и детекция продуктов амплификации) проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории – инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13 ноября 2008 г. № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

3.3.2. При выделении РНК из образцов биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом.

3.3.3. При проведении всех работ реакции амплификации следует выполнять методические инструкции для предотвращения контаминации проб чужеродной РНК/ДНК и защиты от контаминации исследуемыми РНК/ДНК окружающего рабочего пространства.

3.3.4. Вся работа должна проводиться в специальных помещениях с ПЦР-боксами. Рабочее пространство должно быть обработано УФ-облучателями с интенсивностью не менее 10 ЛК/м³/мин в течение не менее 20 минут. Все используемые реагенты должны храниться в замороженном виде в аликвотах при -20°C.

3.3.5. С гелем агарозы следует работать в перчатках и с дополнительной предосторожностью, т.к. бромистый этидий, добавляемый в гель, является сильным мутагеном.

3.3.6. Визуальную детекцию геля на трансиллюминаторе проводить только с защитным экраном, либо в очках, не пропускающих УФ излучение.

4. Описание технологии используемого метода

4.1. Выделение РНК из образцов биологического материала

Для исследований проводится забор биологических жидкостей (кровь, моча), фекалий, либо образцов различных органов и тканей в стерильные пробирки. Забор крови осуществляется в пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА).

Из образцов фекалий готовится 10-20% осветлённый экстракт. Для этого пробы фекалий объёмом 1,0 мл (0,4-1,0 г) помещают в отдельные стерильные пробирки и к каждому образцу добавляют по 4,0 мл физиологического раствора. Взвесь интенсивно встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 30 минут при 3000 об./мин., после чего супернатанты переносят в новые пробирки и повторно центрифугируют в течение 20 минут при 10000

об./мин. Полученные надосадочные жидкости отбираются и переносятся в отдельные пробирки для дальнейшего анализа.

Образцы органов и тканей предварительно измельчают специальными приспособлениями (погружной блендер, гомогенизатор и пр.).

Все дальнейшие манипуляции осуществляются согласно методике производителя наборов для выделения общей фракции РНК, в том числе и вирусной, из биологических образцов.

Полученные пробы РНК сразу же используются для постановки ОТ- ПЦР.

4.2. Амплификация (проведение ПЦР)

Выявление РНК ВГЕ проводится в два раунда. Первый раунд включает стадию обратной транскрипции участков РНК в кДНК и их последовательную многократную амплификацию с типоспецифическими внешними праймерами. Второй раунд включает амплификацию продукта первого раунда с внутренними праймерами (таблица 1). Использование вложенной (гнездовой) ПЦР позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности анализа.

Таблица 1. – Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для первого и второго раундов ПЦР

Последовательность	Положение	Направление	Позиция в геноме*
5' - ААУТАТГСМСАГТАССГГГТТГ -3'	Внешний	Прямой	5687–5708
5' - СССТТАТССТГСТГАГСАТТСТС - 3'	Внешний	Обратный	6395–6414
5' - GTYATGYTYTGCATACAGGCT - 3'	Внутренний	Прямой	5972–5993
5' - AGCCGACGAAATYAATTCTGTС - 3'	Внутренний	Обратный	6298–6319

*– нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму ВГЕ Вигта (номер в базе данных GenBank M73218)

4.2.1. Подготовка рабочей амплификационной смеси (ОТ-ПЦР-1) для первого раунда ПЦР

В отдельной пробирке вместимостью 0,5-5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на (N+1) пробы и двух контролей (положительного и отрицательного) (таблица 2).

За 20–30 минут до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все реагенты из морозильника (кроме ферментов), разморозить их содержимое, перемешать на вортексе в течение 5 секунд и центрифугировать для осаждения капель.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,2-0,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (на льду).

При приготовлении рабочей амплификационной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами). Имеет смысл готовить общую рабочую смесь, которая содержит все компоненты, за исключением образцов исследуемой РНК. Объем каждого составляющего компонента умножается на количество образцов (N+1). Ее следует готовить непосредственно перед амплификацией (таблица 2).

Таблица 2. – Компоненты реакционной смеси для первого раунда ПЦР, совмещенной с ОТ.

Компоненты*	Объем для 1 пробы (мкл)	Объем для (N+1) проб (мкл)
Вода для ПЦР	7,5	7,5 x (N+1)
Буфер для обратной транскриптазы (5X)	5	5 x (N+1)
Смесь дНТФ (10 мМ)	2	2 x (N+1)
Внешний праймер прямой (10 мкМ)	1,5	1,5 x (N+1)
Внешний праймер обратный (10 мкМ)	1,5	1,5x (N+1)
Ингибитор РНКазы (20 ЕД/мкл)	1,0	1 x (N+1)
Обратная транскриптаза (200 ЕД/мкл)	1,0	1x (N+1)
ДНК-полимераза (5 ЕД/мкл)	0,5	0,5 x (N+1)
Объем смеси на 1 пробирку	20	20 x (N+1)
Исследуемая РНК	5	

* – компоненты вносятся в порядке, указанном в данной таблице.

Общая реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается по 20 мкл по отдельным ПЦР-пробиркам.

В каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами вносится по 5 мкл образца исследуемой РНК, согласно запланированной схеме и пипетируется для тщательного перемешивания содержимого пробирок.

После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор, запрограммированный на режим ОТ-ПЦР-1 (таблица 3).

Таблица 3. – Программа амплификации первого раунда (ОТ-ПЦР-1)

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Обратная транскрипция	42	1 час	1
Дезактивация фермента ОТ	94	5 мин.	1
Денатурация	94	30 сек.	35
Отжиг	45	30 сек.	
Элонгация	72	45 сек.	
Финальная элонгация	72	7 мин.	1
Хранение	4		

После окончания полимеразной цепной реакции все ПЦР-пробирки извлекаются из амплификатора. Штатив с пробирками помещается в холодильник до проведения второго раунда ПЦР.

4.2.2. Подготовка рабочей амплификационной смеси (ПЦР-2) для второго раунда ПЦР

В отдельной пробирке вместимостью 0,5-1,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на (N+1) пробы и двух контролей (положительного и отрицательного) (таблица 2).

За 20–30 минут до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все реагенты из морозильника, разморозить их содержимое на льду и встряхнуть на вортексе в течение 5 секунд.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для проведения амплификации в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (на льду).

При приготовлении рабочей реакционной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами). Ее следует готовить непосредственно перед амплификацией (таблица 4).

Таблица 4. – Компоненты реакционной смеси для второго раунда ПЦР.

Компоненты*	Объем для 1 пробы (мкл)	Объем для (N+1) проб (мкл)
Вода	6,5	6,5 x (N+1)
ПЦР-Мастер-Микс	12,5	12,5 x (N+1)
Внутренний праймер прямой (10 мкМ)	1,0	1 x (N+1)
Внутренний праймер обратный (10 мкМ)	1,0	1x (N+1)
Объем смеси на 1 пробирку	21	19 x (N+1)
Реакционная смесь первого раунда, содержащая кДНК	4	

* – компоненты вносятся в порядке, указанном в данной таблице.

Общая реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется для осаждения капель и разливается по 21 мкл по отдельным пробиркам.

Затем в каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами вносится по 4 мкл образца кДНК, полученного в первом раунде ПЦР, согласно запланированной схеме и пипетируется для тщательного перемешивания содержимого пробирок.

После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор, запрограммированный на режим ПЦР-2 (таблица 5).

Таблица 5. – Программа амплификации второго раунда ПЦР

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	94	5 мин.	1
Денатурация	94	30 сек.	35
Отжиг	45	30 сек.	
Элонгация	72	45 сек.	
Финальная элонгация	72	7 мин.	1
Хранение	4		

После окончания амплификации все ПЦР-пробирки извлекаются из амплификатора. Штатив с пробирками помещается в холодильник до проведения электрофореза продуктов реакции.

4.3. Детекция продуктов амплификации

Для детекции продуктов амплификации используется метод горизонтального гель-электрофореза, основанный на том, что смесь

макромолекул под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры. Однородные фрагменты ДНК представляют на электрофореграмме единую фракцию в виде полос. Продукты амплификации анализируют в 2% агарозном геле.

4.3.1. Залить в камеру для электрофореза ТБЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 10x ТБЕ в 10 раз (pH = 8,3): 70 мл 10x ТБЕ добавить к 630 мл дистиллированной воды.

4.3.2. 2. Для приготовления 2% геля к 3,0 г агарозы добавить 15 мл 10x ТБЕ буфера и 132 мл дистиллированной воды.

4.3.3. 3. Приготовленную агарозную смесь расплавить в СВЧ-печи до однородности.

4.3.4. 4. Охладить расплавленную агарозу до температуры от 50°C до 60°C. Добавить к 150 мл расплавленной агарозы 3,75 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать до однородной окраски, избегая аэрации раствора. Затем раствор агарозы залить в кювету для геля. Для получения в агарозном геле лунок для внесения образцов нужно предварительно перед заливкой агарозы установить в кювету гребенку (ее зубцы не должны доставать до дна примерно 1 мм), при этом толщина гребенки и толщина геля должны обеспечить объем лунок не менее 20–25 мкл. После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести кювету с гелем в камеру для проведения электрофореза.

4.3.5. 5. Если Мастер-Микс второго раунда ПЦР не содержит в своем составе глицерин и краситель, то необходимо подготовить к электрофорезу образцы амплифицированной ДНК, для чего смешать их с буфером для внесения (5:1, О/О).

4.3.6. 6. Внести в лунки геля по 15–20 мкл амплифицированной ДНК в последовательности, соответствующей нумерации проб или схеме нанесения образцов. Для контроля размера полученных фрагментов использовать коммерческие маркеры размера ДНК при каждом электрофорезе наряду с образцами.

4.3.7. 7. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение электрического поля 5–7 В/см. Провести электрофоретическое разделение продуктов в направлении от катода (–) к аноду (+).

4.4. Визуализация результатов электрофореза

Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полос красителей. Оптимальное время разгонки – 60 минут при напряжении электрического поля 6–8 В/см.

После окончания электрофореза извлечь гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.

Включить трансиллюминатор или любой детектирующий прибор для гель-документации и проанализировать результаты анализа. Фрагменты амплифицированной ДНК видны в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением. Длины фрагментов оцениваются относительно маркера молекулярного веса ДНК. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляет 350 п.н., что определяется по наличию данной полосы в электрофоретическом треке образца и расценивается как положительный результат на наличие ВГЕ в образце (рис1.).

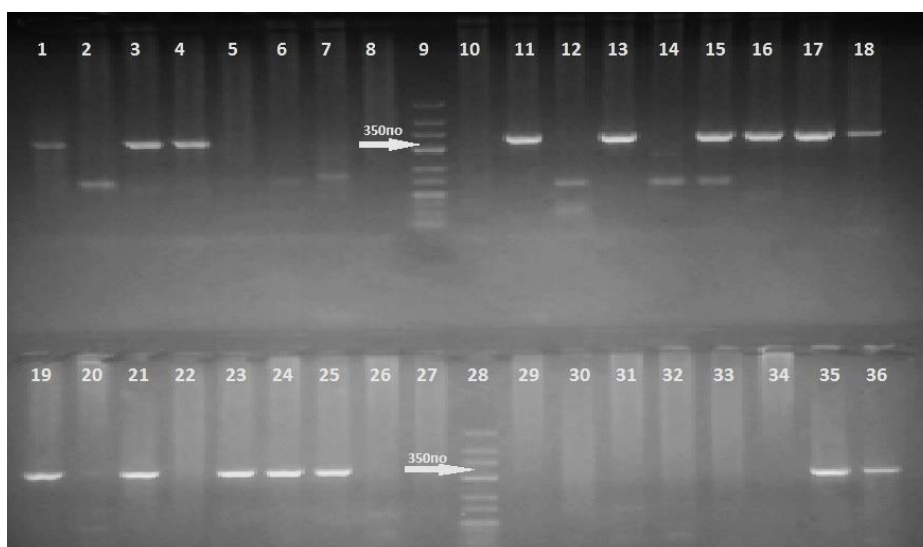


Рисунок 1. – Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР образцов кроликов. 1, 3, 4, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 35, 36 дорожки – образцы фекалий, в которых обнаруживается ВГЕ (полоса 350 п.н.); 2, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 20, 22, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34 дорожки – образцы фекалий, в которых не обнаруживается ВГЕ (отсутствие полосы 350 п.н.); 9, 28 дорожки – маркер молекулярного веса ДНК (сверху вниз: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 25 п.н).

5. Возможные ошибки при выполнении метода и способы их устранения

Использование методики ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам по организации и проведению исследования в ПЦР-лаборатории, несоблюдение которых приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Особенно опасны ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Не следует в качестве антикоагулянта при заборе крови использовать гепарин либо цитрат натрия, т.к. они ингибируют ПЦР. Хранение биологического материала производят в морозильной камере при -70°C не более 1 года.

Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении работы в ПЦР-лаборатории. С особым вниманием и осторожностью следует отнестись к возможности контаминации, как источнику ложноположительных результатов. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при проведении выделения ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления положительного результата в отрицательном контроле свидетельствуют о наличии перекрестной контаминации образцов, контаминации помещений, оборудования и реагентов продуктами амплификации (ампликонами).

Таблица 6. — Отсутствие как специфических, так и неспецифических продуктов амплификации в двух раундах ПЦР

Причина	Пути устранения
Изменение концентрации реагентов	Перед приготовлением смесей перемешать на вортексе и отцентрифугировать все реактивы, входящие в смесь
Отсутствие РНК или разрушение РНК в процессе хранения	Убедиться в наличии РНК в пробе. При отсутствии, низкой концентрации, высокой степени загрязнения выделить РНК повторно. Выделенную РНК хранить при температуре -20°C и ниже

Разрушение реагентов	Большинство реагентов чувствительны к повторному замораживанию-оттаиванию, поэтому реагенты рекомендуется разливать на отдельные постановки
Неверно установленная программа амплификации	Установить программу амплификации согласно настоящей инструкции

Таблица 7. — Наличие неспецифических продуктов реакции в двух раундах

Причина	Пути устранения
<p>Контаминация:</p> <p>1) перекрестная контаминация от пробы к пробе</p> <p>2) контаминация продуктами амплификации (ампликонами)</p>	<p>Разделение функциональных рабочих зон</p> <p>соблюдение точности и направления движения анализируемых образцов</p> <p>использование отдельных лабораторных халатов в каждой рабочей зоне</p> <p>использование одноразовых перчаток без талька</p> <p>использование наконечников для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля</p> <p>использование одноразовых пластиковых пробирок, посуды, наконечников</p> <p>химическая и УФ-дезинфекция всех поверхностей рабочих зон</p> <p>использование положительного и отрицательного контролей</p>

Таблица 8. — Наличие специфических продуктов реакции в первом раунде ПЦР и отсутствие или наличие неспецифических продуктов во втором раунде ПЦР

Причина	Пути устранения
Отсутствие в реакционной смеси второго раунда праймеров для данного генотипа	Использование альтернативного набора праймеров для второго раунда
Наличие контаминации при постановке второго раунда	См. таблицу 7
Наличие смеси генотипов в одной пробе	Перестановка второго раунда в отдельных пробирках с использованием прямого праймера и специфического для каждого из генотипов, обнаруженных в смеси