

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д. Л. Пиневиц

17.02.2017

Регистрационный № 001-0217

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПА РОТАВИРУСОВ ГРУППЫ А С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛУГНЕЗДОВОЙ
ОТ-ПЦР

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,

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

АВТОРЫ: Н.В.Полякова, д-р.мед.наук, профессор Е.О.Самойлович,
канд.биол.наук Г.В. Семейко

Минск, 2017

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

РВИ – ротавирусная инфекция

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции

РНК – рибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфат

ТАЕ-буфер – Трис-ацетатный буфер

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод генотипирования возбудителя РВИ (*Rotavirus A*) с использованием мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР, позволяющий установить наиболее распространенные генетические варианты ротавируса по четвертому (VP4) и девятому (VP7) генам. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику РВИ.

Инструкция предназначена для врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, иных врачей – специалистов, осуществляющих лабораторную диагностику РВИ.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Определение генотипа ротавируса, который согласно современной классификации учитывает характеристику как гена VP7 (G-генотип), так и гена VP4 ([P]-генотип), проводят в два раунда отдельно по каждому из генов. Первый раунд включает стадию обратной транскрипции участков генов VP7 и VP4 из РНК в кДНК и их многократную амплификацию. Вторым раундом включает амплификацию продукта первого раунда с типоспецифическими праймерами. Используемые в реакции праймеры подобраны с учетом распространенности генотипов ротавирусов в Республике Беларусь. Праймеры, позволяющие установить наиболее распространенные генотипы (G1-4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9]), включены в основной набор. Праймеры для определения редких генотипов (G8 и G12) включены в альтернативный набор, который применяют в том случае, если не удалось установить генотип ротавируса с использованием основного набора.

1 Показания к применению

- 1.1 Патологические состояния, характерные для РВИ (A08.0, A09.0);
- 1.2 мониторинг за циркуляцией генетических вариантов ротавирусов с целью определения доминирующих генотипов, установления смены временных и территориальных особенностей их распространения.

2 Противопоказания к применению:

Отсутствуют.

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

3.1 Перечень медицинских изделий для проведения ПЦР

- 1 ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
- 2 амплификатор (термоциклер);
- 3 миницентрифуга-вортекс;
- 4 комплект пипеточных дозаторов (2-20 мкл; 20-100 мкл; 50-200 мкл; 200-1000 мкл);
- 5 холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (-20°C и ниже);
- 6 хладоэлемент.

3.2 Перечень необходимых реактивов для проведения ПЦР

- 1 буфер (10X) для ДНК-полимеразы;
- 2 ДНК-полимераза (5 ед/мкл);
- 3 раствор MgCl₂ (25 mM);
- 4 обратная транскриптаза (200 ед/мкл);
- 5 буфер (5X) для обратной транскриптазы;
- 6 смесь дНТФ (10 mM);
- 7 стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз вода;
- 8 праймеры (20 mM) (Таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для первого раунда ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Определяемый генотип	Позиция
Con3	TGGCTTCGCCATTTLATAGACA	Прямой праймер для VP4 гена	11–32
Con2	ATTTTCGGACCATTTATAACC	Обратный праймер для VP4 гена	868–887

Продолжение таблицы 1

9con1-L	TAGCTCCTTTTAATGTATGGTAT	Прямой праймер для VP7 гена	37–59
VP7R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	Обратный праймер для VP7 гена	914–933

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для второго раунда ПЦР

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Определяемый генотип	Позиция
9T1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG;	G1	176–195
9T2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	G2	262–281
9T3	GTCCAGTTGCAGTGTTAGC;	G3	484–503
9T4	GGGTCGATGGAAAATTCT	G4	423–440
9T9B	TATAAAGTCCATTGCAC	G9	131–147
9T1-DG	TYTWGTYAARGCAAATAATGT	G1	176–195
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	G1	314–335
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	G2	411–435
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3	689–709
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	480–498
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	G8	178–198
aFT9	CTAGATGTAАCTACAАCTAC	G9	757–776
G12B	CCGATGGACGTAACGTTGTA	G12	548–567
1T1	TCTACTTGGATAACGTGC	P[8]	339–356
2T1	CTATTGTAGAGGTTAGAGTC	P[4]	474–494
3T1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	P[6]	259–278
4T1	TGAGACATGCAATTGGAC	P[9]	385–402
5T1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	P[10]	575–594
Jrg237	CGTGCAATTGGGTCATCT	P[8]	339–356
1T-1D	-CANGTYAAAYCCAGTAGA	P[8]	339–356
1T-1V	CGTGCAGCTAGGTCATCT	P[8]	339–356

3.3 Перечень медицинских изделий для детекции результатов ПЦР путем электрофоретического разделения амплифицированных фрагментов

- 1 весы лабораторные для взвешивания реактивов массой от 100 мг до 500 мг;
- 2 водяная баня/ свч-печь;
- 3 источник питания с постоянным током;
- 4 камера для горизонтального электрофореза;
- 5 комплект пипеточных дозаторов (2-20 мкл);
- 6 набор пластиковых кювет для геля;
- 7 набор гребенок;
- 8 набор планшетов для смешивания образцов с краской;
- 9 набор посуды для приготовления агарозного геля;
- 10 трансиллюминатор.

3.4 Перечень реактивов для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации

- 1 агароза;
- 2 ТАЕ-буфер, 50х;
- 3 загрузочный буфер для гель-электрофореза с красителем (6х);
- 4 маркер молекулярного веса днк (100-1000 п.н.);
- 5 раствор бромида этидия (10 мг/мл);
- 6 дистиллированная вода.

Также необходимы следующие расходные материалы: халаты, резиновые перчатки без талька, наконечники для дозаторов с фильтром, ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера), штативы для пробирок.

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

4 Описание технологии используемого метода

Этап 1. Выделение РНК из 10%–суспензии стула.

Для выделения РНК из 10%–суспензии стула возможно применять любой метод, основанный на использовании коммерческих тест-систем, предназначенных для выделения РНК. Выделенный образец РНК хранить при температуре -20°C и ниже.

Этап 2. Первый раунд мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР.

1. В ПЦР-боксе отдельно готовятся смеси с праймерами (таблица 3), смеси с обратной транскриптазой (таблица 4), смеси с ДНК-полимеразой (таблица 5). Объем каждой из смесей рассчитывается в соответствии с количеством исследуемых проб (плюс одна) и двух контролей (положительного и отрицательного). Реакционные смеси перемешиваются на вортексе, центрифугируются и разливаются в отдельные пробирки в указанном объеме.

Важно: перед приготовлением смесей перемешать на вортексе и отцентрифугировать все реактивы, входящие в смесь.

Таблица 3 – Компоненты смесей праймеров для первого раунда ПЦР

Р-типирование		G-типирование	
Праймер	Объем для 1 пробы (мкл)	Праймер	Объем для 1 пробы (мкл)
Con2 (20 мМ)	1	9con1-L (20 мМ)	1
Con3 (20 мМ)	1	VP7 R (20 мМ)	1
Вода	3	Вода	3
Объем смеси на 1 пробу	5	Объем смеси на 1 пробу	5

Таблица 4 – Компоненты смеси с обратной транскриптазой для первого раунда ПЦР

Р-типирование		G-типирование	
Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)	Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)
Вода	7	Вода	7
Смесь дНТФ (10 мМ)	1	Смесь дНТФ (10 мМ)	1
Буфер для обратной транскриптазы (5X)	2,5	Буфер для обратной транскриптазы (5X)	2,5
Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	4	Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	4
Обратная транскриптаза (200ед/мкл)	0,5	Обратная транскриптаза (200ед/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробу	15	Объем смеси на 1 пробу	15

Таблица 5 – Компоненты смеси с ДНК-полимеразой для первого раунда ПЦР

Р-типирование		G-типирование	
Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)	Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)
Вода	21,3	Вода	21,3
Смесь дНТФ (10мМ)	1	Смесь дНТФ (10мМ)	1
Буфер для ДНК-полимеразы (10X)	2,5	Буфер для ДНК-полимеразы (10X)	2,5
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5	ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробу	25	Объем смеси на 1 пробу	25

2. В каждую пробирку со смесью праймеров вносят 5 мкл исследуемой РНК, перемешивают на вортексе и центрифугируют.

3. Пробирки вносят в предварительно разогретый до 97 °С амплификатор на 5 мин.

4. Из амплификатора пробирки сразу перемещают на лед на 1 минуту, центрифигируют 10 секунд при максимальных оборотах, снова помещают на лед.

5. В каждую пробирку вносят 15 мкл смеси с обратной транскриптазой, центрифугируют.

6. Стадию обратной транскрипции проводят при 42°С в течение 45 минут на амплификаторе.

7. Помещают пробирки на лед на 1 минуту, центрифигируют 10 секунд при максимальных оборотах, снова помещают пробирки на лед.

8. В каждую пробирку вносят 25 мкл смеси с ДНК-полимеразой, центрифугируют.

9. Проводят амплификацию в следующих условиях:

- | | | |
|--------------|---|-----|
| 1. 94°С 0:30 | } | x19 |
| 2. 42°С 0:30 | | |
| 3. 72°С 0:30 | | |
| 4. 72°С 7:00 | | |
| 5. 4°С ∞ | | |

Этап 3. Постановка второго раунда ОТ-ПЦР для определения G-генотипа со стандартным набором праймеров

1. В ПЦР-боксе готовится смесь с типоспецифическими праймерами для G-генотипа (таблица 6). Объем смеси рассчитывается в соответствии с количеством исследуемых проб (плюс одна) и двух контролей (положительного и отрицательного). Реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается в отдельные пробирки в указанном объеме.

Важно: перед приготовлением смеси перемешать на вортексе и отцентрифугировать все реактивы, входящие в смесь.

Таблица 6 – Компоненты смеси для проведения второго раунда ПЦР для G-типирования со стандартным набором праймеров.

Компонент смеси	Объем для одной пробы (мкл)
Вода	31,5
Буфер для ДНК-полимеразы (10X)	5
Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	2
Смесь дНТФ (10 мМ)	2
9con1-L (20 мМ)	1
9T1-DG (20 мМ)	1
9T1 (20 мМ)	1
9T2 (20 мМ)	1
9T3P (20 мМ)	1
9T4 (20 мМ)	1
9T9B (20 мМ)	1
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробу	48

2. Вносят 2 мкл соответствующего продукта первого раунда в пробирки со смесью второго раунда, перемешивают на вортексе и центрифугируют.

3. Проводят амплификацию в следующих условиях:

- | | |
|--------------|-------|
| 1. 94°C 0:45 | } x29 |
| 2. 42°C 0:30 | |
| 3. 72°C 1:00 | |
| 4. 72°C 7:00 | |
| 5. 4°C ∞ | |

Этап 4. Постановка второго раунда ОТ-ПЦР для определения G-генотипа с альтернативным набором праймеров

При отсутствии продуктов амплификации во втором раунде и наличия их в первом применяют альтернативный набор типоспецифических праймеров для определения G-генотипа.

1. В ПЦР-боксе готовится смесь с типоспецифическими праймерами для G-генотипа (таблица 7). Объем смеси рассчитывается в соответствии с количеством исследуемых проб (плюс одна) и двух контролей (положительного и отрицательного). Реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается в отдельные пробирки в указанном объеме.

Важно: перед приготовлением смеси перемешать на вортексе и отцентрифугировать все реактивы, входящие в смесь.

Таблица 7 – Компоненты смеси для проведения второго раунда ПЦР для G-типирования со стандартным набором праймеров

Компонент смеси	Объем для одной пробы (мкл)
Вода	30,5
Буфер для ДНК-полимеразы (10X)	5
MgCl ₂ (25 мМ)	4
Смесь дНТФ (10 мМ)	2
VP7R (20мМ)	1
aBT1 (20 мМ)	1
aCT2 (20 мМ)	1
aET3 (20 мМ)	1
aDT4 (20 мМ)	1
aAT8 (20 мМ)	1
aFT9 (20 мМ)	1
G12B (20 мМ)	1
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробу	48

2. Вносят 2 мкл соответствующего продукта первого раунда в пробирки со смесью второго раунда, перемешивают на вортексе и центрифугируют.

3. Проводят амплификацию в следующих условиях:

1. 94°C 0:45
 2. 42°C 0:30
 3. 72°C 1:00
 4. 72°C 7:00
 5. 4°C ∞
- } x34

Этап 5. Постановка второго раунда ОТ-ПЦР для определения [P]-генотипа.

1. В ПЦР-боксе готовится смесь с типоспецифическими праймерами для P-генотипа (таблица 8). Объем смеси рассчитывается в соответствии с количеством исследуемых проб (плюс одна) и двух контролей (положительного и отрицательного). Реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается в отдельные пробирки в указанном объеме.

Таблица 8 – Компоненты смеси для проведения второго раунда ПЦР для P-типирования со стандартным набором праймеров.

Компонент смеси	Объем для одной пробы (мкл)
Вода	29,5
Буфер для ДНК-полимеразы (10X)	5
Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	2
дНТФ (10 мМ)	2
Con3 (20 мМ)	1
1T1 (20 мМ)	1
2T1 (20 мМ)	1
3T1 (20 мМ)	1
4T1 (20 мМ)	1
5T1 (20 мМ)	1

Продолжение таблицы 8

jrg237 (20 мМ)	1
1T1-V (20 мМ)	1
1T1-D (20 мМ)	1
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробу	48

2. Вносят 2 мкл соответствующего продукта первого раунда в пробирки со смесью второго раунда, перемешивают на вортексе и центрифугируют.

3. Проводят амплификацию в следующих условиях:

- 1. 94°C 0:45
 - 2. 42°C 0:30
 - 3. 72°C 1:00
 - 4. 72°C 7:00
 - 5. 4°C ∞
- } x29

Этап 6. Электрофорез в агарозном геле

Для детекции продуктов амплификации используют метод горизонтального гель-электрофореза, основанный на том, что смесь продуктов амплификации под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента.

1. Для приготовления 3% -агарозного геля 2,7 г агарозы растворяют в 90 мл 10x TAE-буфера. Нагревают смесь на водяной бане или в СВЧ-печи до полного растворения агарозы и добавляют 3,5 мкл бромистого этидия.

2. Расплавленную агарозу заливают в кювету с установленной гребенкой до полного застывания геля. Полученный гель помещают в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную 10x TAE-буфером.

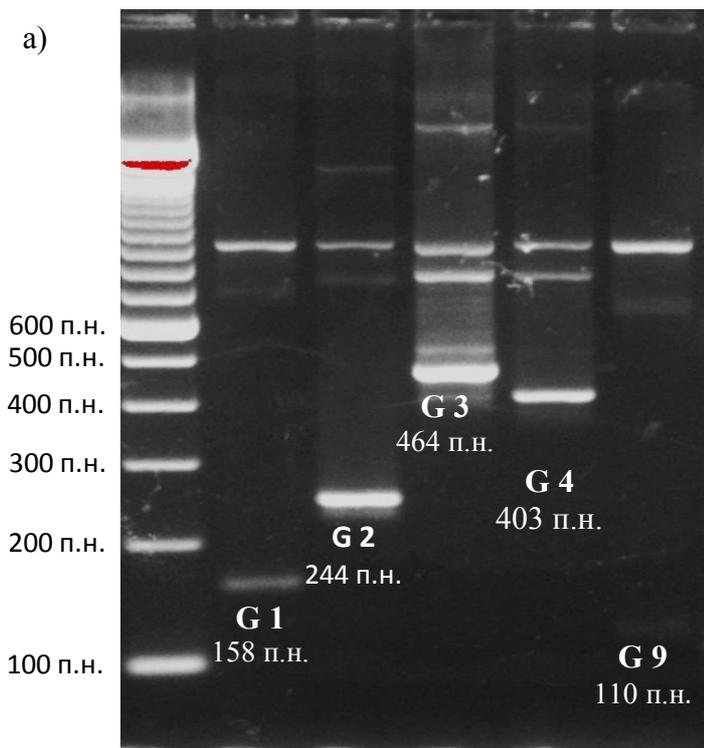
3. В лунки геля вносят 10 мкл продукта амплификации второго раунда, который предварительно в лунке планшетов смешивают с 2 мкл бромфенолового синего (либо в ином количестве в пропорции 5:1).

4. Для контроля размера синтезированных фрагментов используют молекулярно-весовой маркер ДНК, содержащий фрагменты 100 п.н., 200 п.н., 300 п.н., 400 п.н., 500 п.н., 600 п.н., 800 п.н., 1000 п.н.

5. Электрофорез проводят при 115В в течение 80 мин.

6. Для визуализации используют любую стандартную видеосистему (трансиллюминатор с видеосистемой), для переноса изображения на компьютер используется программное обеспечение, позволяющее фиксировать полученные изображения гелей.

7. Учет проводят по появлению специфической полосы на расстоянии, соответствующем длине пробега синтезируемого фрагмента ДНК (Рисунок 1, 2, 3).



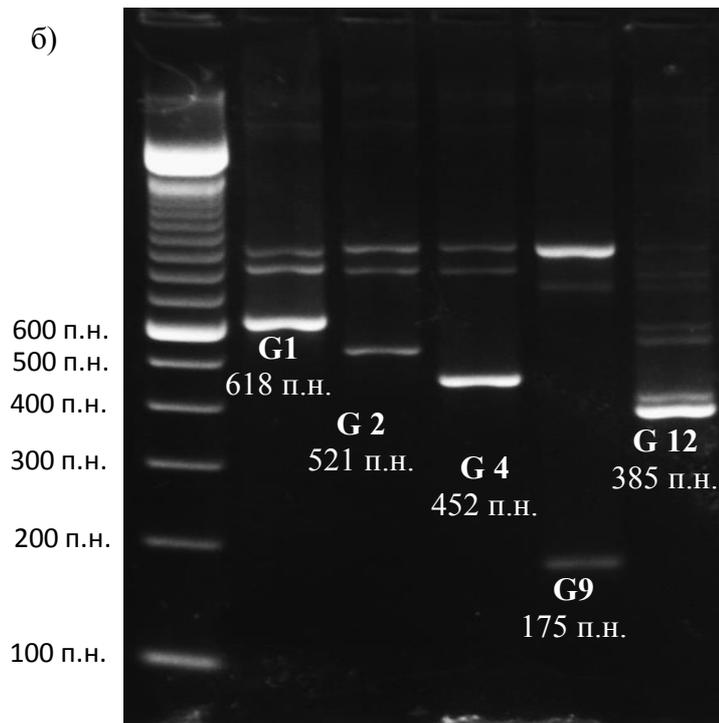


Рисунок 1 – Расположение продуктов второго раунда ОТ-ПЦР с использованием основного набора праймеров (а) и альтернативного набора праймеров (б) для определения G-генотипа.

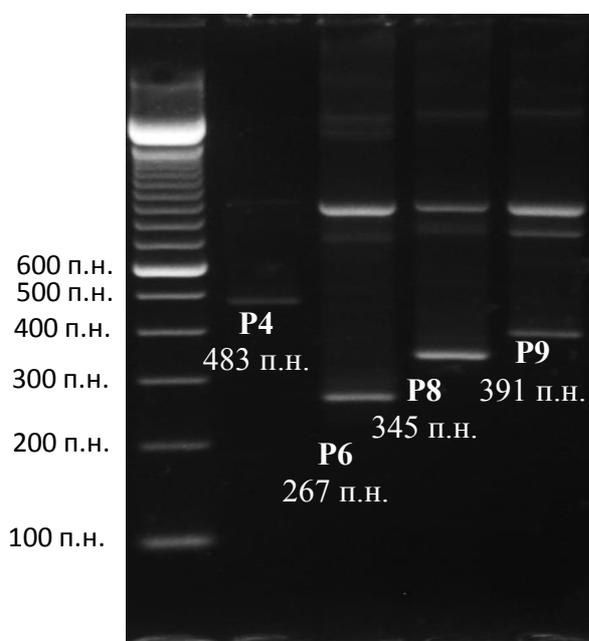


Рисунок 3 – Расположение продуктов второго раунда ОТ-ПЦР с использованием описанного набора праймеров для определения [P]-генотипа.

Перечень возможных ошибок при выполнении и пути 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.

Основная причина ложноположительных результатов – контаминация. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии подготовки пробы. Появление как специфических, так и не специфических продуктов в отрицательном контроле свидетельствуют о возможной контаминации и в пробах.

Использование положительного контроля с заведомо известным генотипом позволит оценить успешность прохождения ПЦР-реакции и ее специфичность.

Оценивать результат ПЦР-реакции можно только при отсутствии как специфических, так и не специфических продуктов амплификации в отрицательном контроле, и наличие специфических продуктов амплификации в положительном контроле.

Таблица 9 – 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	Убедится в наличие РНК в пробе. При отсутствии, низкой концентрации, высокой степени загрязнения выделить РНК повторно. Выделенную РНК хранить при температуре -20°C и ниже

Продолжение таблицы 9

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 10 – 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>	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Разделение функциональных рабочих зон; <input type="checkbox"/> соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов; <input type="checkbox"/> использование отдельных лабораторных халатов в каждой рабочей зоне; <input type="checkbox"/> использование одноразовых перчаток без талька; <input type="checkbox"/> использование наконечников для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля; <input type="checkbox"/> использование одноразовых пластиковых пробирок, посуды, наконечников; <input type="checkbox"/> химическая и УФ дезинфекция всех поверхностей рабочих зон; <input type="checkbox"/> использование положительного и отрицательного контролей.

Таблица 11 – Наличие специфических продуктов реакции в первом раунде ПЦР и отсутствие или наличие неспецифических продуктов во втором раунде ПЦР

Причина	Пути устранения
Отсутствие в реакционный смеси второго раунда праймеров для данного генотипа	Использование альтернативного набора праймеров для второго раунда
Наличие контаминации при постановке второго раунда	См. таблицу 10
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

Изложенный в настоящей инструкции метод генотипирования ротавирусов группы А с использованием мультиплексной полугнездовой ОТ-ПЦР позволит проводить идентификацию как широко распространенных (G1-4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9]), так и редких (G8 и G12) генотипов ротавирусов, и может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику РВИ, а также для генетического мониторинга ротавирусов с целью определения доминирующих генотипов, установления смены временных и территориальных особенностей их распространения и прогнозирования эпидемической ситуации.