

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°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, 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 MgCl₂, 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 ₂ | 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 - 60.1⁰С.

RabN-R-Rt – CACTTGTCCCATATAGCATCC, позиция 965 н.о., размер праймера 21 н.о., температура отжига -59.9⁰С.

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 MgCl₂, 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 ₂ | 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, длина 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 |

| Проблема | Возможная причина | Пути устранения |
|--|--|---|
| 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. |