

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

Н.П. Жукова

2017 г.



Регистрационный №242-1215

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДТИПА ВИЧ-1 ПО УЧАСТКУ ГЕНА pol

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

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод секвенирования участка гена *pol* ВИЧ-1, позволяющий определить под-тип, под-подтип и рекомбинантные формы ВИЧ-1, найти филогенетические связи между вирусами (например, общий источник заражения), направление заноса вируса в страну. Метод, изложенный в настоящей инструкции, может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику ВИЧ-инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и врачей-эпидемиологов организаций, осуществляющих государственный санитарный надзор.

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

2. Впервые выявленные случаи ВИЧ-инфекции.
3. ВИЧ-инфицированные ПИН.
4. Эпидрасследование случаев ВИЧ-инфекции.

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И Т.Д.

1. Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.
2. Морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже $(-20)^{\circ}\text{C}$.
3. Прилавок с температурой $(-70)^{\circ}\text{C}$;
4. Специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом.
5. Твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл, от $+25^{\circ}\text{C}$ до $+100^{\circ}\text{C}$.
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 от +2°C до +8°C с морозильной камерой.
19. Ёмкости с дезинфицирующим раствором.
20. Наборы для выделения РНК.
21. Агароза.
22. 50 x TAE буфер.
23. Дистиллированная вода.
24. 1% раствор бромистого этидия.
25. Генетический анализатор.
26. программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования.
27. Персональный компьютер (2).
28. Ацетат натрия.
29. Этиловый спирт.

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

3.1. 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 минут.

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°C до +25°C и в течение 20 суток при температуре от +2°C до +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 течении 1 суток. Каждый образец, для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

3.2 Основные правила безопасности.

3.2.1 Медицинские работники допускаются к работе после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

3.2.2 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 проведения работы запрещается.

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

3.2.4 Работа с ДНК проводится в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

3.2.5 При работе с патогенным материалом следует выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», утвержденным постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

3.2.6 Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

Зона 1 – выделение РНК;

Зона 2 – проведение ОТ и ПЦР;

Зона 3 – очистка полученных фрагментов и проведение секвенирующей 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, перчатки. Потенциально основной источник контаминации РНКазами – руки исследователя. Необходимо одевать и менять перчатки.

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

4. Получение фрагментов РНК ВИЧ для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

4.1. Выделение РНК/ДНК ВИЧ.

Для выделения РНК/ДНК ВИЧ используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК/ДНК, любого производителя. Выделение проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору.

4.2. Проведение реакции.

4.2.1 Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ для участка гена pol (1824 → 2611) проводят в объеме 10 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер – 2,0 мкл, рэндом праймер или праймер pol-11R 1,0 мкл (0,2 mM), смесь трифосфатов 0,4 мкл (25 mM), ингибитор РНКаз – 0,25 мкл (40 Ед.), обратная транскриптаза – 1,0 мкл (20 Ед), РНК-3 мкл, бидистиллированная вода – 2,35 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводят в следующем режиме: +25°C – 10 минут; 60°C – 60 минут; 70°C – 10 минут; 10°C – хранение до 1 недели.

4.2.2 Амплификация

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер polF-9, 20 мМ
3. Праймер polR-11, 20 мМ
4. Деионизированная вода
5. ПЦР-Буфер, 10х
6. $MgCl_2$, 25 мМ
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Taq-полимераза, 5 U/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.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	16,6 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 х
3.	$MgCl_2$	2 мкл	2 мМ
4.	Праймер pol9-F	0,25 мкл	0,4 мМ
5.	Праймер pol11-R	0,25 мкл	0,4 мМ
6.	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
7.	Taq-полимераза	0,2 мкл	0,625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 22 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0.2 мл для каждого исследуемого образца. Добавить 3 мкл исследуемой кДНК после реакции ОТ в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин. 10-15 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Программа амплификации:

95°C	5 мин.	} 40 циклов
95°C	30 с.	
60°C	30 с.	
72°C	1 мин.	
72°C	7 мин.	
4°C хранение		

После проведения 1-го раунда ПЦР пробирки поместить в специальный штатив и оставить в зоне 3 при плюс 4°C (не более 12 часов), либо оставить на

хранение при температуре от минус 25°C до минус 15°C не более 1 недели. Пробирки готовы к проведению второго раунда ПЦР («гнездовая» ПЦР).

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК
2. Праймер polF-7, 20 мМ
3. Праймер polR-11, 20 мМ
4. Деионизированная вода
5. ПЦР-Буфер, 10х
6. MgCl₂, 25 мМ
7. Смесь дНТФ, 25 мМ
8. Taq-полимераза, 5 U/мкл

Протокол реакции:

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовьте ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1.	Деионизированная вода	17,4 мкл	-
2.	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 х
3.	MgCl ₂	2 мкл	2 мМ
4.	Праймер pol7-F	0,4 мкл	0,2 мМ
5.	Праймер pol11-R	0,30 мкл	0,2 мМ
6.	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
7.	Taq-полимераза	0,2 мкл	0,625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл 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 секунд.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

Программа амплификации:

Программа амплификации:

95°C	5 мин.	} 35 циклов
95°C	30 с.	
60°C	30 с.	
72°C	1 мин.	
72°C	7 мин.	
4°C хранение		

4.2.3 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

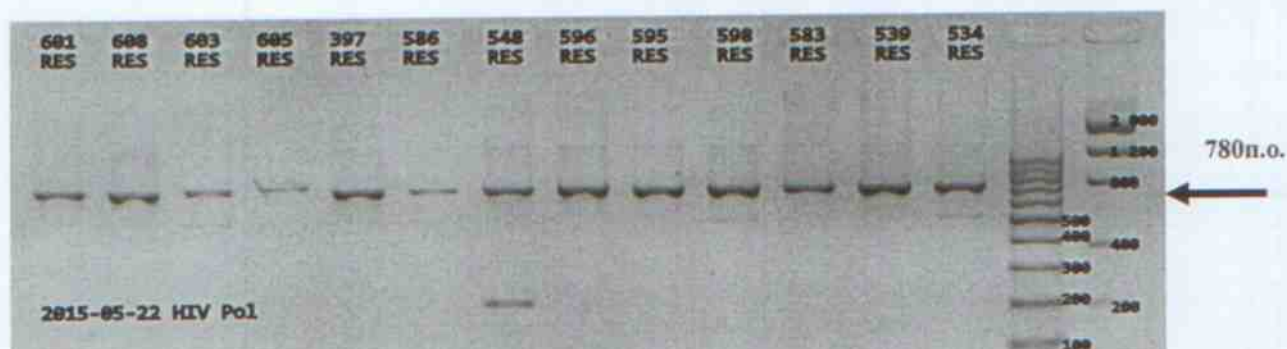


Рисунок 1 - Электрофорез продуктов ПЦР после первого раунда

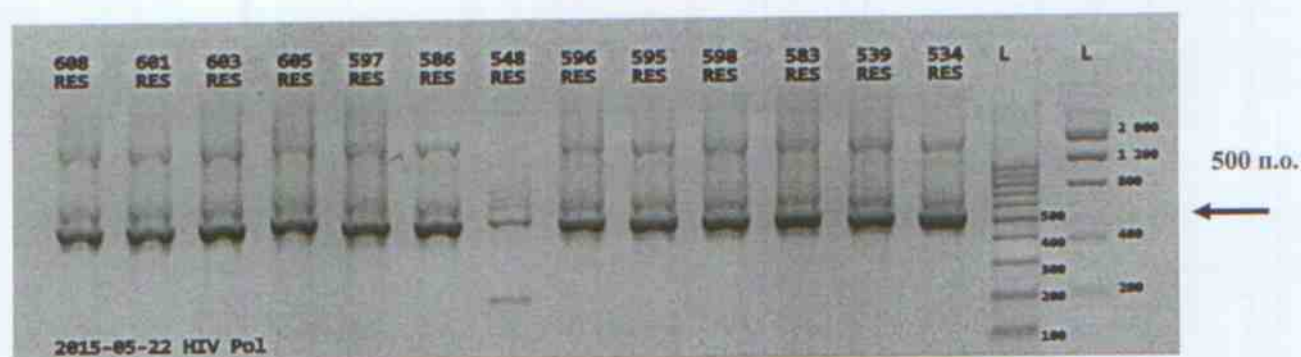


Рисунок 2 - Электрофорез продуктов ПЦР после второго раунда

5. Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК.

6. Секвенирующая ПЦР

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

ддН ₂ О	4 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5хбуфер	7 мкл
Bigdye Terminator	1 мкл
ДНК	4 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	

Аmplицированные пробы очищаются методом преципитации, вносятся 20 мкл HiDi Formamid и загружаются в генетический анализатор.

7. Проведение анализа полученных результатов и построение филогенетического дерева по участку гена *rol* в соответствии с рис. 3.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных: SeqScape, BioEdit, MEGA 6 и/или аналогичные компьютерные программы.

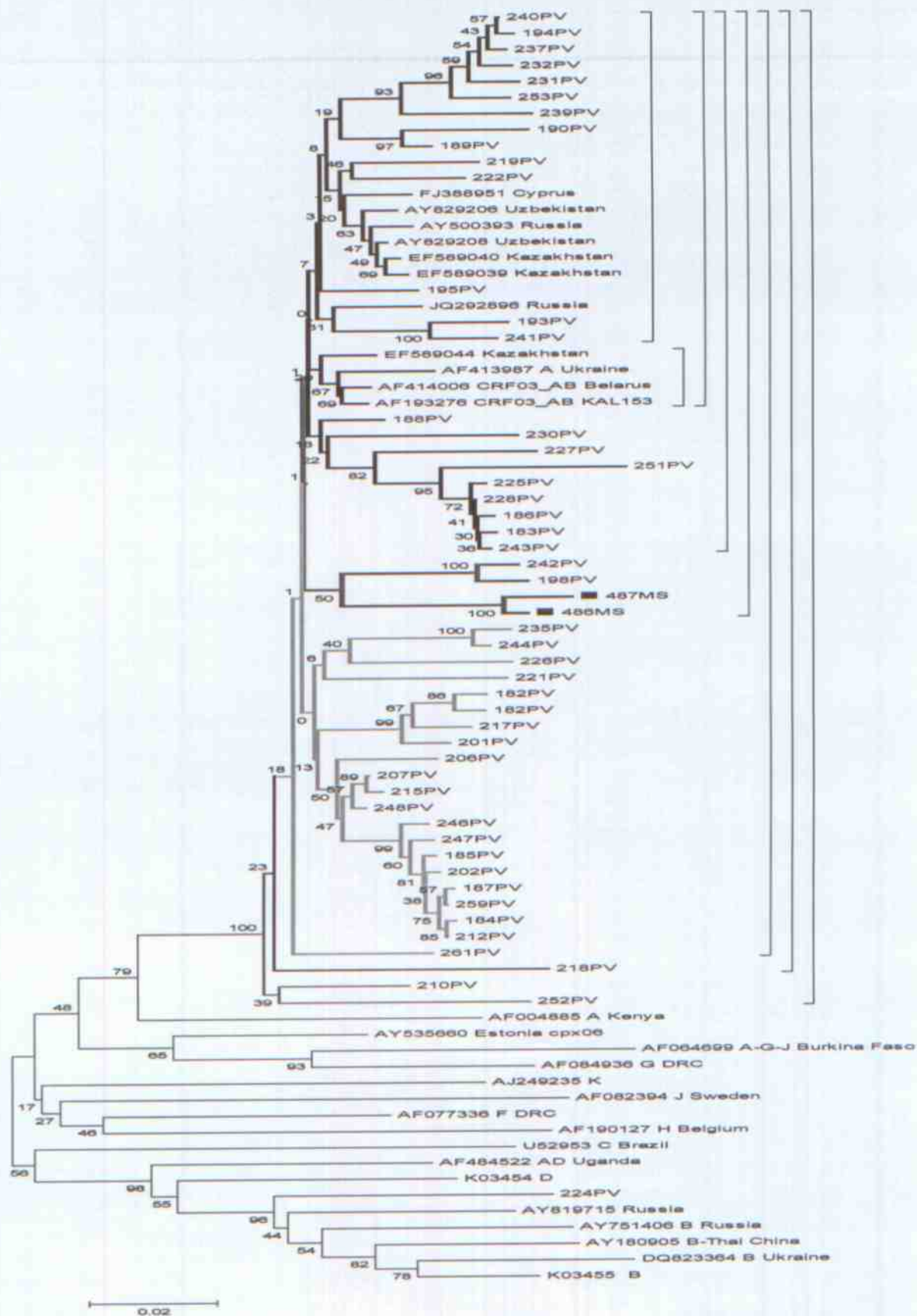


Рисунок 3 - Филогенетическое дерево ВИЧ-1 по участку гена pol