

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть
18 сентября 2007 г.
Регистрационный № 115-1106

**ГЕНОДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
У КАРДИОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «НИИ эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, А.А. Безручко,
К.Л. Дедюля, З.Ф. Богуш, О.Н. Казинец

Минск 2007

Инструкция предназначена для специалистов лабораторной службы НИИ, ЦГЭ, лечебных учреждений, патологоанатомических бюро, занимающихся диагностикой вирусных инфекций.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Буфер для ПЦР: 60мМ ТрисHCl (pH8,5), 15мМ (NH₄)₂SO₄, 2,2 мМ MgCl₂, 200 мкмоль dNTP.

Магния хлорид, 25 мМ раствор, (маркировка «для молекулярной биологии»).

Набор для обратной транскрипции: M-MuLV обратная транскриптаза (200 единиц/мкл), 5X буфер для обратной транскрипции (250 мМ TrisHCl (pH 8,3), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ DTT).

Тақ-полимераза (рекомбинантная или нативная), 5 единиц/мкл.

Агароза (маркировка «для молекулярной биологии»).

Борная кислота.

Бромистый этидий.

Бромфеноловый синий.

Воск для ПЦР (маркировка «для молекулярной биологии»).

Гомогенизатор механический.

ДНК-маркер 50-1000 пар оснований.

Изопропанол (маркировка «для молекулярной биологии»).

Ингибитор РНКазы.

Калия перманганат.

Ламинарный бокс или УФ-облучатель.

Ледяная уксусная кислота.

Минеральное масло (маркировка «для молекулярной биологии», или «для ПЦР»).

Набор для выделения ДНК из геля.

Набор для выделения РНК из жидких клинических образцов.

Набор для выделения РНК из тканей.

Набор дозаторов лабораторных переменного объема: 0,5-10 мкл, 2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл, 1,0-5,0 мл.

Наконечники для дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные.

Натрия гидроксид, ч.д.а по ГОСТ4328-77.

Набор инструментов: ножницы, скальпель, пинцеты.

Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл, с маркировкой «RNase, DNase free»).

Олигонуклеотиды (синтезируются под заказ).

Протеиназа К (маркировка – «для молекулярной биологии»).

ПЦР-бокс.

Раствор для стабилизации РНК.

Раствор для ДНК-деконтаминации.

Свободная от рибонуклеаз вода (маркировка – «RNAse, DNAse free»).

Смесь дезоксинуклеотрифосфатов (дНТФ), 10 mM (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Кислота соляная х.ч. по ГОСТ 3118-77.

Твердотельный термостат.

Твин 20 (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Термоциклер (амплифицирующее устройство).

Тест-система для амплификации кДНК энтеровирусов.

Транспортная среда для образцов.

Тирс.

ТрисНСI (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Фиколл (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Фосфатно-солевой буфер (ФСТБ) (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Хлороформ (х ч) ТУ 2631-02-11291058-96.

Холодильник-морозильник.

Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (не менее 14000 об/мин).

Центрифуга-вортекс.

ЭДТА (маркировка – «для молекулярной биологии»).

Этиловый спирт ректифицированный по ГОСТ 5962-67.

Общая схема генодиагностики энтеровирусной инфекции

Генодиагностика энтеровирусов включает молекулярные методы, направленные на индикацию и идентификацию энтеровирусов (ЭВ) в образцах клинического материала, полученных от кардиологических больных.

Первым этапом генодиагностики является индикация ЭВ в образцах клинического материала методом полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Она направлена на обнаружение энтеровирусной инфекции в организме и/или выявление энтеровирусной инфекции в клетках сердца больного, а также – патологоанатомическом материале. Положительный результат ОТ-ПЦР свидетельствует о наличии генетического материала ЭВ в исследуемом образце.

Идентификация ЭВ, обнаруженных в образцах клинического материала, является следующим этапом генодиагностики. Она проводится при получении положительного результата на этапе индикации ЭВ.

Идентификация ЭВ включает:

- накопление и очистка фрагмента ДНК, соответствующего участку региона, кодирующего капсидные белки ЭВ, с помощью ОТ-ПЦР;
- молекулярное типирование: секвенирование и компьютерный анализ нуклеотидной последовательности полученного фрагмента ДНК.

Для идентификации ЭВ на базе лечебного учреждения или ЦГЭ проводится только первый этап исследований, включающий накопление и очистку фрагмента ДНК, после чего материал передается в НИИ

эпидемиологии и микробиологии для дальнейшего анализа.

На рисунке 1 представлена общая схема генодиагностики энтеровирусной инфекции у кардиологических больных

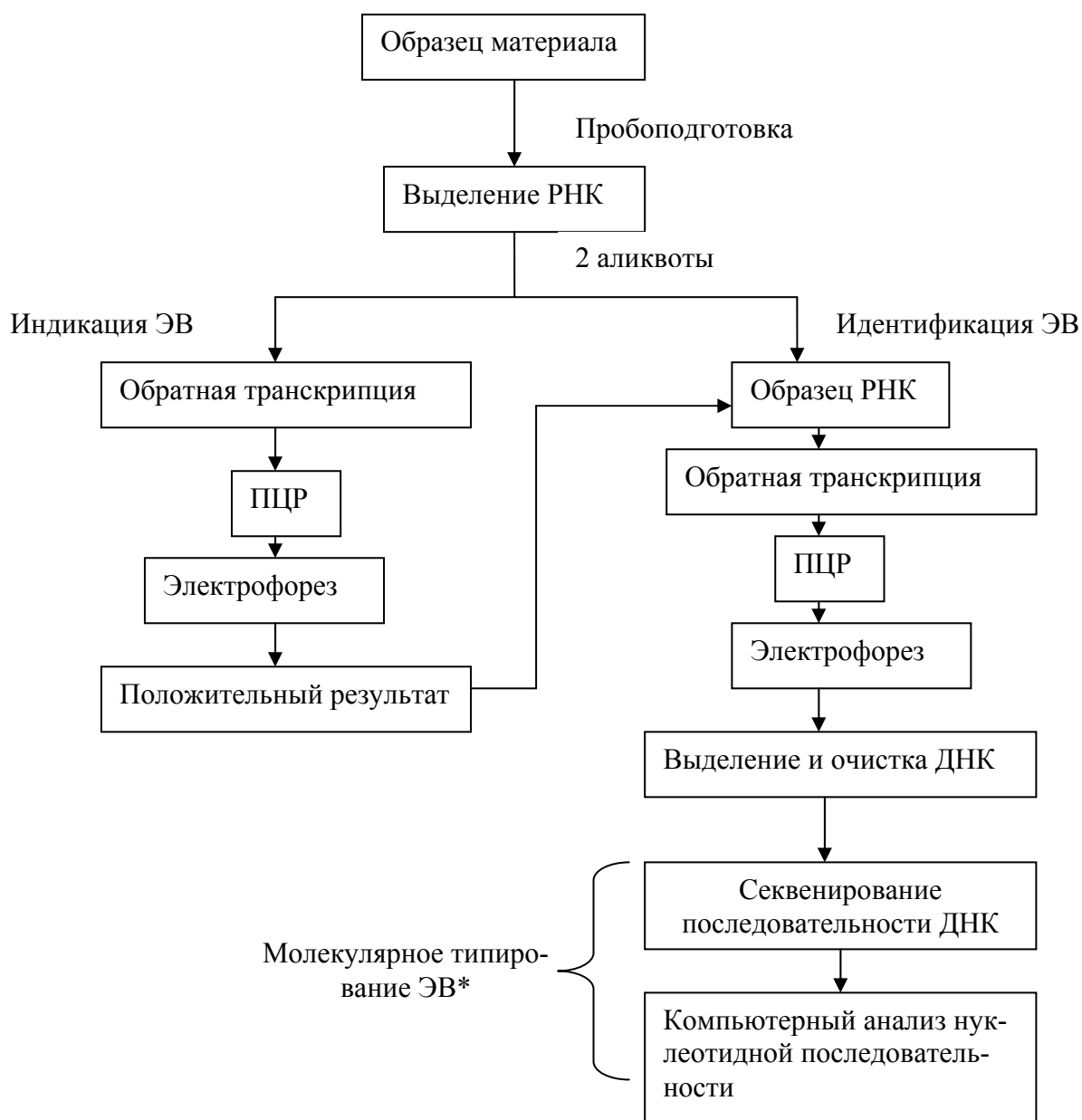


Рисунок 1 – Схема генодиагностики энтеровирусной инфекции у кардиологических больных

*Примечание – Выполняется на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии

Требования к организации рабочего места при проведении генодиагностики

Для проведения генодиагностики пространство лаборатории должно быть разделено на зоны (рисунок 2).

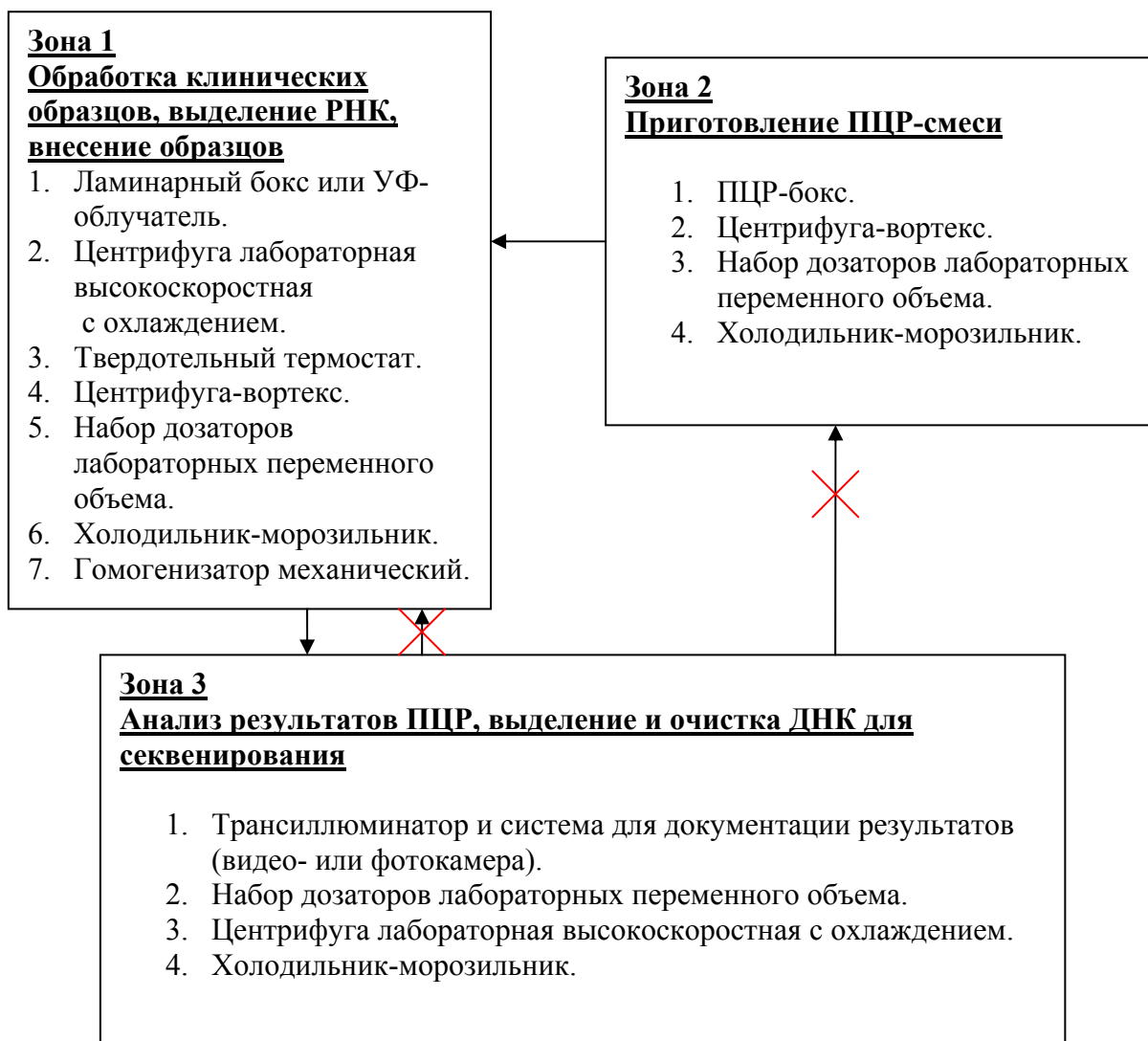


Рисунок 2 – Схема организации лаборатории для проведения генодиагностики

Все манипуляции с исследуемым материалом проводят при соблюдении правил работы с вирусами III-IV группы.

Все этапы ПЦР выполняют с использованием перчаток, свободных от талька. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую.

Каждая зона должна быть оснащена комплектом оборудования, как указано на рисунке 2. Запрещается переносить оборудование из одной зоны в другую. Все используемые в работе наконечники для лабораторных дозаторов должны иметь аэрозольный барьер.

Объекты исследования

Генодиагностику ЭВ осуществляют в образцах клинического материала, полученных инвазивным и неинвазивным путем, а также в образцах секционного материала, как свежих, так и архивных (таблица 1).

Таблица 1 – Виды материала, используемого для генодиагностики энтеровирусной инфекции у кардиологических больных

Клиническая форма	Вид исследуемого материала	Оценка положительного результата
Острый мио-, пери-, эндокардит	Носоглоточный смыв	Энтеровирусная инфекция
	Сыворотка крови	Энтеровирусная инфекция
	Суспензия фекалий	Энтеровирусная инфекция
	Перикардialная жидкость (только перикардит)	Энтеровирусная инфекция клеток сердца
Хронический мио-, пери-, эндокардит, кардиомиопатии и др.	Эндомиокардиальный биоптат	Энтеровирусная инфекция клеток сердца
	Секционный материал тканей сердца	Энтеровирусная инфекция клеток сердца
	Сыворотка крови	Энтеровирусная инфекция
Хронический мио-, пери-, эндокардит, кардиомиопатии и др.	Перикардialная жидкость (только перикардит)	Энтеровирусный перикардит
	Эндомиокардиальный биоптат	Энтеровирусная инфекция клеток сердца
	Секционный материал тканей сердца	Энтеровирусная инфекция клеток сердца

Обнаружение ЭВ в носоглоточном смыве, фекалиях и/или сыворотке крови свидетельствует о наличии энтеровирусной инфекции в организме больного.

Обнаружение ЭВ в образцах эндомиокардиальной биопсии, перикардialной жидкости или образцах секционного материала тканей сердца свидетельствует о наличии энтеровирусной инфекции в клетках сердца больного.

Для эффективной индикации ЭВ у больных острым мио-, пери-, эндокардитом лабораторные исследования проводят на 3-х образцах клинического материала, полученных от одного и того же больного.

У больных хроническим мио-, пери-, эндокардитом и кардиомиопатиями обнаружение ЭВ в носоглоточном смыве и/или фекалиях не является диагностически значимым. Материалом для исследования у таких больных являются образцы эндомиокардиальной биопсии и/или перикардialной жидкости (у больных хроническим перикардитом).

Индикация ЭВ в образцах перикардialной жидкости и эндомиокардиальной биопсии является диагностически значимой как при

острой, так и при хронической формах заболевания, т. к. свидетельствует об энтеровирусной инфекции, локализованной в клетках сердца больного.

При индикации ЭВ в секционном материале тканей сердца максимальная эффективность достигается при использовании свежих или специальным образом фиксированных образцов (фиксация в растворе для стабилизации РНК).

При отсутствии свежих или специальным образом фиксированных образцов индикация ЭВ может осуществляться в архивных образцах секционного материала, фиксированных в нейтральном формалине и залитых в парафин. Образцы архивного материала тканей сердца, хранящиеся в формалине без заливки в парафин, для генодиагностики **не используются**.

Описание необходимых этапов пробоподготовки при исследовании различных видов клинического или секционного материала приведено в таблице 2 и подробно описано в разделе «Подготовка образцов для исследования».

Таблица 2 – Забор и пробоподготовка различных видов материала

Вид исследуемого материала	Особенности забора и пробоподготовки
Носоглоточный смыв	Забор в транспортную среду, не требует пробоподготовки
Кровь	Получение сыворотки
Фекалии	Получение суспензии
Перикардальная жидкость	Не требует пробоподготовки
Эндомиокардиальный биоптат	Забор в транспортную среду или раствор для стабилизации РНК Гомогенизация
Секционный материал тканей сердца	
А) Свежий 1 вариант	Заморозка при -20°C сразу после забора, хранение и транспортировка без размораживания Фиксация в растворе для стабилизации РНК
2 вариант	Гомогенизация
Б) Архивный	Депарафинирование Гомогенизация

Забор образцов

Забор образцов клинического и секционного материала осуществляется стерильными одноразовыми инструментами в стерильные пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками.

Забор образцов эндомикардиальной биопсии осуществляется в пробирку, содержащую 250 мкл транспортной среды или 250 мкл раствора для стабилизации РНК.

Транспортировка и хранение образцов эндомикардиальной биопсии осуществляется при +4°C. При использовании транспортной среды допускается хранение образца в течение 6-8 ч, при фиксации образца в растворе для стабилизации РНК срок хранения увеличивается до 1 недели.

Забор свежих образцов секционного материала осуществляется в пластиковую стерильную одноразовую пробирку с завинчивающейся крышкой. Непосредственно после забора образцы замораживаются при -20°C и транспортируются при этой же температуре. Следует избегать хранения замороженных образцов.

Забор свежих образцов секционного материала может также осуществляться в пробирку, содержащую раствор для стабилизации РНК. В этом случае следует соблюдать следующее соотношение объема раствора/образца: 1 кусок ткани 5x5x2 мм фиксируется в 1 мл раствора для стабилизации РНК. Забранный таким образом материал подлежит транспортировке при +4°C и может храниться в таких же условиях в течение недели.

Подготовка образцов для исследования

Носоглоточный смыв и перикардиальная жидкость не требуют предварительной пробоподготовки перед выделением РНК.

Образцы цельной крови инкубируют в течение 30 мин при температуре 37°C, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего сыворотку отбирают в стерильную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Эндомикардиальный биоптат извлекают из транспортной среды или раствора для стабилизации РНК и помещают в пробирку с лизирующим раствором, входящим в состав набора для выделения РНК. Гомогенизируют с помощью механического гомогенизатора.

Свежий или фиксированный в растворе для стабилизации РНК образец секционного материала тканей сердца извлекают в стерильную чашку Петри и с помощью стерильных ножниц/скальпеля и пинцета отделяют фрагмент 5x5x2 мм (около 100 мг). Этот фрагмент помещают в пробирку с лизирующим раствором, входящим в состав набора для выделения РНК, и гомогенизируют с помощью механического гомогенизатора.

Архивные образцы секционного материала подлежат депарафинированию. Для этого стерильным скальпелем отделяют фрагмент парафинового блока 5x5x2 мм, содержащий фиксированную ткань сердца. Можно также использовать 2-3 парафиновых среза, размером 10x5x0,1 мм. Исследуемый материал помещают в стерильную пробирку и измельчают стерильными ножницами. После этого в пробирку добавляют 250 мкл ТрисНСI-буфера, рН 8,0, содержащего 0,5% Твин20 и прогревают при 95°C в течение 10 мин. Затем пробирки центрифугируют при 5000 об/мин 30 с и помещают на лед. Образовавшийся парафиновый диск удаляют стерильным наконечником. Осадок тканей дважды

промывают 250 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСТБ), добавляют протеиназу К до конечной концентрации 200 мкг/мл и 200 единиц ингибитора РНКаз. Пробирки инкубируют 2 ч при 55°C, после чего проводят выделение РНК.

Индикация энтеровирусов в образцах клинического материала

Для индикации ЭВ в образцах клинического материала используют выявление РНК ЭВ с помощью ОТ-ПЦР.

Мишенью для реакции служит фрагмент РНК, расположенный в консервативных участках 5'-нетранслируемого региона генома ЭВ.

Положительный результат реакции указывает на присутствие в исследуемом материале вирусов рода *Enterovirus*.

Полученный в результате этой ОТ-ПЦР фрагмент ДНК не может быть использован для молекулярного типирования и после учета результатов реакции утилизируется вместе с гелем.

Выделение РНК из жидких клинических образцов

Для выделения РНК из жидких образцов клинического материала (сыворотка крови, носоглоточный смыв, перикардальная жидкость) могут быть использованы коммерческие наборы 2-х типов: основанные на адсорбции РНК на силиконовом носителе и последующей элюции или основанные на экстракции РНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом.

Для достижения максимальной эффективности выделения РНК из жидких образцов клинического материала рекомендуется использовать наборы, основанные на экстракции РНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом.

Выделение РНК из образцов тканей

Для выделения РНК из образцов тканей сердца (эндомиокардиальный биоптат, свежий, фиксированный в растворе для стабилизации РНК или архивный секционный материал) используют **только** наборы, основанные на экстракции РНК гуанидин-изотиоцианолом и последующем осаждении изопропанолом.

Выделение РНК с помощью наборов, основанных на гуанидиновой экстракции, осуществляют следующим образом:

- обработку пробы до стадии осаждения изопропанолом осуществляют в соответствии с инструкцией производителя;
- после переноса водной фазы, содержащей РНК, в пробирку с изопропанолом добавляют 5 мкл матричного раствора гликогена с концентрацией 1 мг/мл;
- затем пробирку инкубируют при -20°C в течение 7 сут. для максимально эффективного осаждения РНК;
- после инкубации пробирку извлекают и дальнейшие этапы проводят в соответствии с инструкцией производителя.

Полученный раствор РНК разделяют на 2 аликвоты. Одну аликвоту используют для индикации ЭВ, а другую хранят при -70°C. При получении

положительного результата на этапе индикации ЭВ эта аликвота используется в ОТ-ПЦР для накопления фрагмента капсид-кодирующего региона генома ЭВ и последующего молекулярного типирования ЭВ.

Полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) для индикации энтеровирусов

Индикация ЭВ в образцах материала (клинического или секционного) от больных острым мио-, пери-, эндокардитом осуществляется с помощью коммерческих наборов для детекции РНК ЭВ методом ПЦР или с помощью гнездовой ПЦР в одной пробирке.

Индикация ЭВ в образцах материала (клинического или секционного) от больных хроническим мио-, пери-, эндокардитом или кардиомиопатиями осуществляется только с помощью гнездовой ПЦР в одной пробирке.

Примерные последовательности

В зависимости от того, какой вариант постановки ОТ-ПЦР используется, в реакцию вводятся различные типы праймеров (таблицы 3, 4).

Таблица 3 – Варианты постановки ОТ-ПЦР

Вариант постановки ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция	ПЦР
С помощью коммерческого набора	Гексануклеотиды	Праймеры входят в состав набора
Гнездовая ПЦР в одной пробирке	Гексануклеотиды или специфический праймер НП2	НП1 (прямой) НП2 (обратный) ВП3 (прямой) ВП4 (обратный)

Таблица 4 – Праймеры для проведения гнездовой ПЦР в одной пробирке

Название	Последовательность
НП1 (прямой)	5'-CGCCTGTTTTATACCCCTCCCCAA-3'
НП2 (обратный)	5'-ACACCCAAAGTAGTCGGTTCGCTGC-3'
ВП3 (прямой)	5'-AAGCACTTCTGTTACC-3'
ВП4 (обратный)	5'-CGGAGGACTACCAA-3'

Праймерные последовательности синтезируют под заказ различные фирмы-производители.

Поставка праймеров производителем осуществляется в количествах, измеряющихся в оптических единицах (ОЕ) в мл раствора. Для праймера, длиной *A* пар нуклеотидов (п.н.), поставляемом в количестве *B* ОЕ, пересчет осуществляется следующим образом:

$$D = B / (0,01 \times A), \quad (1)$$

где *D* – количество ртоl праймера, содержащееся в 1 мкл раствора.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием коммерческих наборов в соответствии с прилагаемой инструкцией.

В состав наборов для обратной транскрипции входят буферный раствор(ы) и фермент – обратная транскриптаза (ревертаза) различного происхождения. Ингибитор РНКазы и смесь дНТФ могут входить в состав набора или поставляются отдельно.

В качестве затравки реакции используют специфический обратный праймер, или синтетические гексануклеотиды.

Постановка:

- в 0,2мл или 0,5мл пробирки вносят – 10-14,5 мкл РНК пробы, 10-15 pmol обратного праймера (таблицы 3,4);

- смесь аккуратно перемешивают, осаждают центрифугированием и помещают в термоциклер (70°C) на 10 мин;

- по истечении времени нагревания пробирки достают и помещают на лед;

- в пробы добавляют: 5X или 10X буфер для обратной транскрипции (конечная концентрация – 1X), 1мкл дНТФ (100-200 мкМ), обратную транскриптазу (100-200 ед.), ингибитор РНКаз (20 ед.). Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Объем реакционной смеси при необходимости доводят с помощью свободной от РНКаз воды.

- смесь перемешивают, осаждают центрифугированием и выдерживают при комнатной температуре 10-15 мин;

- пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 50 мин при 37-42°C (время и температура необходимые для работы фермента указываются в инструкции производителя).

Полимеразная цепная реакция

Постановка ПЦР с помощью тест-систем для амплификации кДНК энтеровирусов осуществляется согласно инструкции производителя.

Постановка гнездовой ПЦР в одной пробирке:

- в рабочей Зоне 2 проводят подготовку ПЦР смесей 1 и 2

ПЦР-смесь 1 (на N пробирок)	2,5 мкл x (N+1) - 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X), 3 мкл x (N+1) - MgCl ₂ (3 мМ) 2,5 ед x (N+1) - Taq-полимеразы 4 мкл x (N+1) - H ₂ O
ПЦР-смесь 2 (на N пробирок)	1 мкл x (N+1) - дНТФ (100-200 мкМ), 1мкл x (N+1) - праймера НП1 (0,25 pmol), 1 мкл x (N+1) - праймера НП2 (0,25 pmol), 1 мкл x (N+1) - праймера ВП3 (25 pmol), 1 мкл x (N+1) - праймера ВП4 (25 pmol),

- раскапывают ПЦР-смесь 2 по 5 мкл на N пробирок (учитывая положительный и отрицательный контроли);
- воск для ПЦР расплавляют, погружая пробирку с воском в емкость с горячей водой (температура воды 80-90°C), и раскапывают расплавленный воск по 20 мкл в пробирки с ПЦР-смесью 2;
- после застывания воска в каждую пробирку вносят по 10 мкл ПЦР-смеси 1;
- 10 мкл пробы после обратной транскрипции вносят в подготовленные для ПЦР пробирки;
- минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без подогреваемой крышки;
- программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже.

Режим амплификации:

- денатурация 95°C – 5 мин	
- денатурация 95°C – 10 с*	36 циклов
- отжиг 65°C – 10 с*	
- элонгация 72°C – 10 с*	
- денатурация 95°C – 10 с*	42 цикла
- отжиг 50°C – 10 с*	
- элонгация 72°C – 10 с*	

*Примечание – При использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице длительность каждого сегмента цикла увеличивается с 10 с до 1 мин)

- когда температура в ячейке амплификатора достигнет 80-95°C, ставят программу на паузу, помещают пробирки в ячейки амплификатора, закрывают крышку и снимают программу с паузы.

Учет результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле

Подготовка реагентов

Буферы для электрофореза:

ТАЕ (50X) на 1 л	0,04 М Трис-ацетат (242г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты 0,002 М ЭДТА (100мл 0,5 М ЭДТА pH 8,0)
ТБЕ (5X) на 1 л	0,089М Трис-борат (54г. Трис, 27,5 г. борной кислоты 0,002М ЭДТА (20мл 0,5М ЭДТА pH 8,0)

1,5-2% агароза – 1,5-2 г агарозы на 100 мл 1X буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100°C до полного расплавления.

Бромистый этидий – матричный раствор 10мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55-56°C агарозы до конечной концентрации 0,1-10 мкг/мл.

Буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 20% фиколл 400, 0,1М ЭДТА.

Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Все реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5М раствора калия перманганата и 1 объем 2,5М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Добавляют 1 объем 2,5М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

Постановка электрофореза

- В электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1 мм;

- подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть;

- после застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки, гель помещают в прибор для электрофореза так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду;

- в случае использования минерального масла проводят подготовку ПЦР-продуктов, добавляя 100 мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12000g в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы амплифицированные без минерального масла не требуют подготовки;

- 15 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы вносят в чистые пробирки и добавляют 3 мкл буфера для проб, перемешивают;

- прибор для электрофореза наполняют 1X буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы гель был полностью им покрыт;

- через слой жидкости, внимательно, в отдельные лунки вносят по 15-20 мкл ДНК маркера, положительный, отрицательный контроли и пробы;

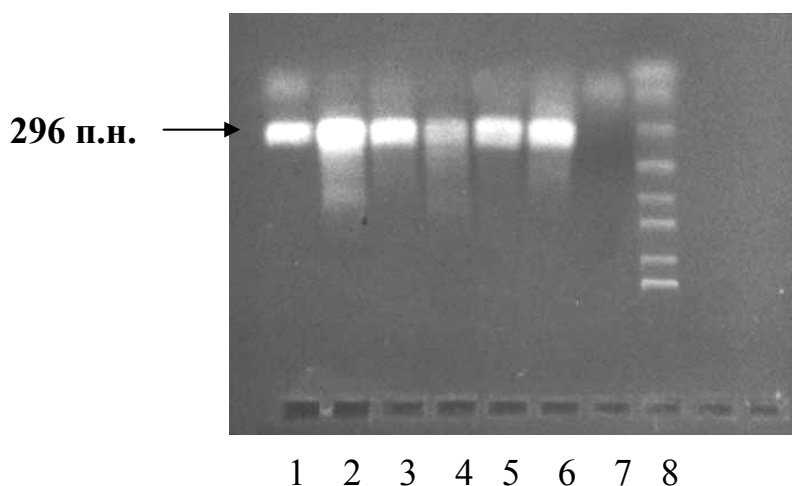
- электрофорез проводят при напряжении 10 В/см.

Учет результатов

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора, либо используют емкости из УФ-прозрачных материалов.

При постановке ОТ-ПЦР для выявления в исследуемом материале РНК ЭВ положительные образцы должны содержать полосу ДНК размером 296 п.н.

Результаты фиксируют посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ-фильтров (рисунок 3).



1 – коксаки В1; 2 – коксаки А9; 3 – ЕСНО6; 4 – ЕСНО 11; 5 – ЕСНО 15; 6 – ЕСНО20;
7 – отрицательный контроль; 8 – ДНК-маркер

Рисунок 3 – Фотография амплифицированной РНК различных энтеровирусов с использованием гнездовой ПЦР в одной пробирке. Электрофорез в 2% агарозном геле

Интерпретация положительного результата индикации ЭВ методом ОТ-ПЦР

Положительный результат, полученный при индикации ЭВ в образцах носоглоточного смыва, сыворотки крови и фекалиях больного острым мио-, пери-, эндокардитом свидетельствует о наличии энтеровирусной инфекции в организме больного.

Индикация ЭВ только в фекалиях или носоглоточном смыве больного имеет ограниченную диагностическую значимость.

Индикация ЭВ в сыворотке крови, а также в 2-х и более исследованных образцов, указывает на генерализацию инфекции и является диагностически значимой.

Индикация ЭВ в образце перикардиальной жидкости у больных как острым, так и хроническим перикардитом является диагностически значимой.

Положительный результат, полученный при индикации ЭВ в образцах эндомикардиальной биопсии или образцах серкционного материала тканей сердца, указывает на энтеровирусную инфекцию в клетках сердца. Он является диагностически значимым для больных как острым, так и хроническим мио-, пери-, эндокардитом, а также кардиомиопатиями.

Возможные проблемы при детекции РНК энтеровирусов с помощью ОТ-ПЦР и их устранение

Ложноотрицательный результат

Получение ложноотрицательного результата может быть обусловлено:

- деградацией РНК в исследуемом образце;
- наличием ингибиторов в пробе или их внесением при постановке реакций;

- неспецифической контаминацией реакционной смеси ДНК-продуктами предшествующих ПЦР.

Деградация РНК в исследуемом образце может быть обусловлена нарушением условий забора, хранения и/или транспортировки образцов.

Наиболее уязвимым материалом являются образцы тканей сердца, так как высокое содержание внутриклеточных РНКаз приводит к быстрой деградации молекул РНК, содержащихся в клетках, и непригодности материала для исследований. Установление факта деградации РНК проводится путем исследования образца на наличие в нем мРНК β-актина. Протокол проведения ОТ-ПЦР для детекции мРНК β-актина изложен в «Инструкции по осуществлению вирусологической диагностики энтеровирусных инфекций сердца» (регистрационный № 210-1203 от 13.10.2004 г.). Получение отрицательного результата ОТ-ПЦР на мРНК β-актина свидетельствует о деградации молекул РНК в исследуемом образце и непригодности его для дальнейших исследований.

Для предотвращения деградации РНК в исследуемом образце следует соблюдать следующие меры предосторожности:

- забор образцов клинического материала проводят только стерильными одноразовыми инструментами;

- при заборе образцов секционного материала все инструменты предварительно обрабатывают спиртом и обжигают;

- для забора образцов используют только пластиковые одноразовые пробирки с маркировкой «RNase, DNase free»;

- забор свежих образцов тканей сердца осуществляется в пробирки с раствором для стабилизации РНК или замораживается при -20°C **непосредственно** после забора;

- не допускается повторное замораживание-оттаивание исследуемых образцов в ходе транспортировки и/или хранения.

При установлении факта деградации РНК в исследуемом образце архивного секционного материала рекомендуется проведение повторного исследования другого образца, полученного от того же пациента.

Причиной ложноотрицательного результата индикации ЭВ методом ОТ-ПЦР может являться наличие в пробе химических и/или биологических веществ, ингибирующих реакцию. Наиболее уязвимыми с точки зрения присутствия ингибиторов ПЦР являются образцы фекалий и сыворотки крови больного. При постановке ОТ-ПЦР этих видов материала рекомендуется проводить параллельные исследования 2-х образцов РНК от одного больного:

№ 1 – цельный образец РНК;

№ 2 – образец РНК, разведенный в 2 раза добавлением равного объема H_2O .

При обработке образцов крови больного для получения сыворотки следует избегать гемолиза, т. к. гемолизированные образцы сыворотки крови непригодны для исследования. В таком случае проводят повторный забор

крови от пациента.

Постановку всех стадий реакции осуществляют в перчатках, свободных от талька. Попадание талька с перчаток в пробирку с реакционной смесью может приводить к ингибированию реакции.

Все стадии генодиагностики, начиная с пробоподготовки, проводят только в пластиковых одноразовых пробирках с маркировкой «RNAse, DNAse free».

О неспецифической контаминации рабочих зон и/или реактивов ДНК-продуктами предыдущих реакций можно судить по выявлению в электрофорезе полос ДНК любого размера или светящихся пятен (шмеров) в пробирке с отрицательным контролем.

При обнаружении неспецифической контаминации рабочих зон и/или реактивов проводят обработку всех доступных поверхностей и оборудования, находящегося в зонах 1 и 2 (рисунок 2) раствором для ДНК-деконтаминации. После этого проводят УФ-облучение этих зон в течение ночи.

После проведения обработки осуществляют повторные исследования образцов клинического или секционного материала.

Ложноположительный результат

Основной причиной ложноположительного результата является специфическая контаминация исследуемых проб продуктами предыдущих амплификаций. Она может носить тотальный или спорадический характер.

При наличии тотальной контаминации присутствие полосы ДНК специфического размера обнаруживается во всех или почти всех дорожках (включая дорожку отрицательного контроля) геля после проведения электрофореза. Этот тип контаминации легко обнаруживаем, в отличие от спорадической контаминации. При обнаружении тотальной контаминации проводят обработку всех доступных поверхностей, оборудования и пипеток растворами для ДНК-деконтаминации. Проводят смену спецодежды персонала. После этого помещения зон 1 и 2 подвергают УФ-облучению в течение ночи. Проводят замену всех используемых реактивов.

После обработки проводят забор смывов с поверхностей и оборудования, находящегося в рабочих зонах 1 и 2 (рисунок 2). Забор смывов осуществляют стерильным ватным тампоном в пробирки с транспортной средой. Затем все смывы исследуют в ПЦР. При получении положительного результата хотя бы в одном из исследуемых смывов обработку повторяют.

Спорадическая контаминация выражается в наличии специфической полосы только в некоторых дорожках и может не присутствовать в дорожке отрицательного контроля. Такой тип контаминации выявить значительно сложнее, чем тотальный. Поэтому основным средством борьбы со спорадической контаминацией являются профилактические мероприятия. Для профилактики спорадической контаминации проводят обработку всех доступных поверхностей и оборудования зон 1 и 2 (1 раз в неделю). Кроме этого с периодичностью 1 раз в месяц необходимо проводить ПЦР-исследования смывов с рабочих поверхностей.

Идентификация ЭВ в образцах клинического материала

При получении положительного результата на этапе индикации ЭВ, проводят идентификацию обнаруженных ЭВ. В исследованиях используют 2-ю аликвоту РНК, хранящуюся при -70°C .

Первым этапом идентификации ЭВ является гнездовая ОТ-ПЦР для накопления фрагмента региона, кодирующего основной капсидный белок (VP1) генома ЭВ. Реакцию проводят с использованием праймеров, указанных в таблице 5.

Таблица 5 – Праймеры для накопления 3' VP1-кодирующего региона генома ЭВ в гнездовой ПЦР

Название	Последовательность (5'–3')	Ориентация
VP1-1S	GGTTYGAYITGGARITACITTYGT	Прямой
VP1-1A	TGIGAYTGRTAYCTIKYKGGRTARTA	Обратный
VP1-2S	ARWTWATGTAYRTICCCICGIG	Прямой
VP1-2A	CCIGTKKWRCAYKRCAYCTIGC	Обратный

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции на этапе идентификации ЭВ проводят так же, как описано в разделе «Реакция обратной транскрипции». В качестве затравки используют синтетические гексануклеотиды или праймер VP1-1A (таблица 5).

Полимеразная цепная реакция для накопления фрагмента VP1-региона генома ЭВ

Постановка:

- в рабочей Зоне 2 проводят подготовку ПЦР-смеси № 1 (для 1-го раунда) и № 2 (для 2-го раунда реакции)

ПЦР-смесь № 1
(на N пробирок)

2,5 мкл x (N+1) - 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X),
3 мкл x (N+1) – MgCl_2 (3 мМ)
0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимеразы (2,5 ед.)
1 мкл x (N+1) – дНТФ (100-200 мкМ),
1 мкл x (N+1) – праймера VP1-1S (40 pтol),
1 мкл x (N+1) – праймера VP1-1A (40 pтol),
6 мкл x (N+1) – H_2O

ПЦР-смесь № 2
(на N пробирок)

2,5 мкл x (N+1) – 10X ПЦР буфера (конечная концентрация 1X),
3 мкл x (N+1) – MgCl₂ (3 мМ)
0,5 мкл x (N+1) – Taq-полимеразы (2,5 ед.)
1 мкл x (N+1) – дНТФ (100-200 мкМ),
1 мкл x (N+1) – праймера VP1-2S (80 pтol),
1 мкл x (N+1) – праймера VP1-2A (80 pтol),
13 мкл x (N+1) – H₂O

- раскапывают ПЦР-смесь № 1 по 15 мкл, а ПЦР-смесь № 2 – по 22 мкл на N пробирок (учитывая положительный и отрицательный контроли);
- маркируют пробирки так, чтобы на каждую пробу приходилась по одной пробирке ПЦР-смеси № 1 и № 2;
- пробирки с ПЦР-смесью № 2 убирают в холодильник, а пробирки с ПЦР-смесью № 1 используют для постановки 1-го раунда реакции
- 10 мкл пробы после обратной транскрипции вносят в пробирки с ПЦР-смесью № 1;
- минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без подогреваемой крышки;
- программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже:

Режим амплификации 1-го раунда:

- денатурация 95°C - 5 мин	
- денатурация 95°C – 30 с*	
- отжиг 55°C – 3 мин	35 циклов
- элонгация 72°C – 40 с*	

*Примечание – При использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице длительность денатурации увеличивается до 1 мин, элонгации – до 1 мин 30 с

- после окончания 1-го раунда реакции пробирки с ПЦР-смесью №2 извлекают из морозильника и вносят в них по 3 мкл продуктов 1-го раунда амплификации
- внесение продуктов 1-го раунда осуществляют с максимальной осторожностью, во избежание контаминации; отрицательный контроль вносят предпоследним, а положительный – последним.
- минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования 0,5 мл пробирок и термоциклеров без подогреваемой крышки.

- программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным ниже

Режим амплификации 2-го раунда:

- денатурация 95°C - 5 мин	
- денатурация 95°C – 30 с*	40 циклов
- отжиг 50°C – 3 мин	
- элонгация 72°C – 40 с*	

*Примечание – При использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице длительность денатурации увеличивается до 1 мин, элонгации – до 1 мин 30 с

Учет результатов и выделение фрагмента ДНК

Для учета результатов и выделения фрагмента ДНК проводят электрофорез в 2%-ом агарозном геле, как описано в «Учет результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле».

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером.

При наличии в трансиллюминаторе переключателя между коротковолновой и длинноволновой областью УФ-излучения он должен быть переведен в положение, соответствующее длинноволновому УФ-излучению. При этом гель не должен подвергаться УФ-облучению дольше, чем в течение 30 с-1 мин.

Продуктом реакции является фрагмент ДНК размером 630 п.н.

При наличии в дорожках геля соответствующей полосы она аккуратно и быстро вырезается с помощью стерильных пинцета и скальпеля. Вырезанный фрагмент геля помещается в стерильную пластиковую пробирку и маркируется в соответствии с номером пробы.

После этого проводят выделение и очистку полученного фрагмента ДНК с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК из геля.

Полученный в результате чистый препарат ДНК передается в НИИ эпидемиологии и микробиологии для молекулярного типирования.

Молекулярное типирование ЭВ

Молекулярное типирование ЭВ выполняется на базе ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» и включает секвенирование и компьютерный анализ нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК.

Секвенирование ДНК проводят в термоциклической реакции с использованием коммерческих наборов. Электрофорез и анализ продуктов реакции выполняют на автоматическом ДНК-анализаторе с использованием соответствующего программного обеспечения. После этого полученный фрагмент нуклеотидной последовательности ЭВ сравнивают с участками последовательности различных прототипных штаммов различных серотипов ЭВ. По результатам анализа устанавливают серотип ЭВ.