

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач

И.П. Жукова
« 11 » декабря 2018 г.
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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
19.12.2018
Регистрационный № 023-1118

**МЕТОД ПОСТМОРТАЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА
БЕШЕНСТВА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. А. Г. Красько, канд. мед. наук Л. М. Рустамова,
О. Р. Князева, Л. П. Родионова, С. Ф. Семенов, Т. С. Старинская

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод постмортального выявления бешенства в биологическом материале на основе использования реакции обратной транскрипции, совмещенной с амплификацией диагностически значимых участков генома вируса бешенства в режиме реального времени, и/или обратной транскрипции, совмещенной с амплификацией диагностически значимых участков генома с последующим секвенированием и молекулярно-генетическим биоинформационным типированием.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей лабораторной практики.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Медицинская техника:

термоциклер с оптическим модулем;
центрифуги с охлаждением на 14 000 об/мин;
микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 000 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 °С).

Изделия медицинского назначения:

пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5; 0,2; 2 мл);
наконечники полимерные с фильтрами для автоматических дозаторов 1–10, 10–100, 100–1000 мкл;
штативы для пробирок.

Материалы для сбора клинических образцов:

пробирки герметичные с крышками на 15 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-й группы биологического риска.

Реагенты для ПЦР и секвенирования:

праймеры и зонды;
набор реагентов для проведения ОТ-ПЦР (Taq-полимераза с 10x буфером, Mg²⁺, смесь дезоксинуклеотидов, деионизированная вода);
набор реагентов для проведения секвенирующей ПЦР (праймеры, BigDye Terminator v.3.1, 5x буфер, деионизированная вода);
формамид для молекулярной биологии (HiDi Formamid);
агароза для гель-электрофореза;

этидиум бромид;
маркер молекулярного веса;
колонки 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;
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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция может быть использована для постмортального выявления вируса бешенства при энцефалитах и подозрении бешенства, не подтвержденных лабораторными исследованиями, а также молекулярно-генетических исследований изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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.

Правила забора, транспортировки и хранения биологического материала

Забор биологического материала следует производить с соблюдением правил работы с ПБА 3-й 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», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2.

Биологический материал помещают в стерильные герметичные разовые пробирки объемом 15 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 ч 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 до 8 °С — не более 4–6 ч, при -20 °С —

до двух недель; при -70°C — до 1 года, при -185°C — более 1 года (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.

Молекулярно-генетические исследования с целью выявления генетического материала вируса бешенства в биологическом материале

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.

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 флуорофора FAM:

RabN-F-Rt: GAGGACTGCTCGGGGCTGGT

Длина олигонуклеотида: 20 н.о. T_m : $60,3^{\circ}\text{C}$

RabN-R-Rt: GGGGACTTCCCACTCAAGCCCA

Длина олигонуклеотида: 22 н.о. T_m : $60,1^{\circ}\text{C}$

RabN-Pr-Rt: FAM-TGAGCCAGGACAAGAGACAGCTGT-BHQ1

Длина олигонуклеотида: 24 н.о. T_m : $59,6^{\circ}\text{C}$

10x ОТ-ПЦР-буфер, 25 mM MgCl_2 , 25 mM смесь трифосфатов, смесь ферментов: 10 000 Ед/мкл обратная транскриптаза/5 Ед/мкл Taq-полимераза, деионизированная 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.

| 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 mM |
| 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 |

| Компонент | Объем, x1 образец | Конечная концентрация |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| 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 с.

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-цикловая амплификация — 95 °С — 20 с, 60 °С — 30 с — детекция сигнала с 5-го цикла по каналу FAM, 72 °С — 20 с (45 повторов).

3. Учет результатов

Для детекции вируса бешенства анализируют кривую накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM. Результат реакции оценивают как положительный, если значение 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. 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 — 60,1 °С.

RabN-R-Rt — САСТТGTCCCАТАТАGСАТСС, позиция 965 н.о., размер праймера 21 н.о., температура отжига — 59,9 °С.

Размер амплифицируемого фрагмента — 383 п.о. Этот фрагмент позволяет провести дополнительное исследование путем секвенирования полученных ПЦР-продуктов для окончательной идентификации вируса бешенства.

Используется 10x ОТ-ПЦР-буфер, 25 мМ MgCl₂, 25 мМ смесь трифосфатов, смесь ферментов: 10000 Ед/мкл обратная транскриптаза/5 Ед/мкл Таq-полимераза, деионизированная 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.

| Компонент | Объем, х 1 образец | Конечная концентрация |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Деионизированная 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-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 с.

Помещают пробирки в амплификатор. Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданной программе.

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-цикловая амплификация — 95 °С — 20 с, 60 °С — 20 с, 72 °С — 40 с (40 повторов).

Учет результатов

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 %. Учет результатов проводят с использованием проходящего УФ-света, длина волны 302 нм на приборе любого производителя с фотодокументированием.

Технология используемого метода молекулярно-генетического типирования вируса бешенства

Типирование изолятов вируса бешенства проводится путем определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов РНК генома вируса бешенства и последующего сравнения с образцами международного банка GenBank методами биоинформационного анализа.

Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется колоночным или преципитационным методами на коммерческих наборах в соответствии с инструкцией производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей — секвенирующая ПЦР
 С подготовленными пробами выполняют секвенирующую ПЦР.
 Состав реакционной смеси:

| Компоненты | Объем |
|-----------------------------------|---------|
| Деионизированная 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 °С — 5 мин; 95 °С — 10 с, 50 °С — 5 с, 60 °С — 2 мин (25 повторов); 4°С — хранение.

Продукты секвенирующей ПЦР очищают от невключенных нуклеотидов методом преципитации.

Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) продуктов ПЦР

К очищенной пробе добавляют по 20 мкл Ni-Di™ Formamide, перемешивают 5 с на вортексе, сбрасывая кратким центрифугированием капли со стенок пробирок. Помещают пробирки в термостат при 95 °С на 2 мин. Немедленно образцы помещают на лед. Подготовленные пробы вносят по 10 мкл в планшет генетического анализатора.

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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ 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 при | Деградация РНК и/или низкое содержание исходной РНК | Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения РНК |

| Проблема | Возможная причина | Пути устранения |
|--|---|---|
| диагностической амплификации | 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 путем использования в реакции контрольных образцов |
| Невозможность прочтения сиквенсов на генетическом анализаторе | Смесь из нескольких ПЦР-продуктов в реакции секвенирования | Повторить процедуру выделения ПЦР-продуктов и реакцию секвенирования |
| | Недостаточная очистка продуктов реакции секвенирования | Повторить реакцию секвенирования и провести тщательную очистку ее 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 |