

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



## **МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА Е**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Жаворонок С.В., Марчук С.И., Арабей А.А.,  
канд. биол. наук, доц. Давыдов В.В.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
01.06.2018

Регистрационный № 055-0518

**МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ  
РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА Е**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный  
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С. В. Жаворонок, С. И. Марчук, А. А. Арабей,  
канд. биол. наук, доц. В. В. Давыдов

Минск 2018

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВГЕ	— вирус гепатита Е
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	— дезоксинуклеотидтрифосфат
кДНК	— комплементарная ДНК
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ОТ	— обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	— ПЦР с обратной транскрипцией
РНК	— рибонуклеиновая кислота
УФ	— ультрафиолетовое излучение
ЭДТА	— этилендиаминтетраацетат

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод молекулярно-генетического выявления РНК вируса гепатита Е, включающий в себя реакцию обратной транскрипции и полимеразную цепную реакцию, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику ВГЕ. ПЦР с обратной транскрипцией используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), взяв в качестве матрицы мРНК, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР. Гнездовая («вложенная», англ. nested PCR) ПЦР применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим ВГЕ, в стационарных и (или) амбулаторных условиях, а также учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **1. Перечень необходимых медицинских изделий:**

- 1.1. ПЦР-бокс с УФ-лампой.
- 1.2. Программируемый термоциклер (амплификатор).
- 1.3. Весы лабораторные (0,1–10 г).
- 1.4. Высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5-2,0 мл 8000–12000 об/мин.
- 1.5. Микроцентрифуга-вортекс.
- 1.6. Холодильник (от 2 до 8 °С) с морозильной камерой (-20 °С).
- 1.7. Камера для горизонтального электрофореза.
- 1.8. Источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В.
- 1.9. СВЧ-печь.
- 1.10. УФ-трансиллюминатор.
- 1.11. Видеосистема для документирования гель-электрофореграмм, подключенная к персональному компьютеру.
- 1.12. Планшет для заливки геля, гребенки, держатели гребенок.
- 1.13. Пипетки-дозаторы переменного объема (1–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл).
- 1.14. Штативы для хранения пробирок 1,5 мл.
- 1.15. Штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл.
- 1.16. ПЦР-пробирки 0,2 и 0,5 мл.
- 1.17. Одноразовые наконечники с фильтрами до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
- 1.18. Штативы для наконечников 10 мкл, 200 мкл и 1000 мкл.
- 1.19. Емкость для сброса использованных наконечников.

1.20. Одноразовые перчатки без талька.

## **2. Перечень необходимых реактивов для проведения ПЦР:**

2.1. Набор для выделения РНК из биологических образцов.

2.2. Обратная транскриптаза.

2.3. Термостабильная ДНК-полимераза.

2.4. Ингибитор РНКазы.

2.5. 5хбуферный раствор для проведения ОТ.

2.6. 10 мМ смесь дНТФ.

2.7. 2хПЦР-Мастер-Микс (готовая смесь для проведения ПЦР, содержащая все основные компоненты: оптимизированный буфер, дНТФ, ДНК-полимеразу).

2.8. Вода для молекулярно-биологических исследований.

2.9. 10хТБЕ буфер.

2.10. Агароза для электрофореза.

2.11. Электрофоретические маркеры молекулярного веса ДНК (50–700 п.н.).

2.12. Загрузочный буфер для гель-электрофореза с красителем.

2.13. Раствор бромистого этидия для визуализации ДНК.

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

## **3. Требования, предъявляемые при выделении РНК из образцов биологического материала, проведении ПЦР и детекции продуктов амплификации**

3.1. Все этапы работы (выделение РНК из образцов биологического материала, проведение ПЦР и детекция продуктов амплификации) проводятся в отдельных помещениях согласно правилам организации ПЦР-лаборатории – инструкция по применению Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.11.2008 № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

3.2. При выделении РНК из образцов биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом.

3.3. При проведении реакции амплификации следует выполнять методические инструкции для предотвращения контаминации проб чужеродной РНК/ДНК и защиты от контаминации исследуемыми РНК/ДНК окружающего рабочего пространства.

3.4. Вся работа должна проводиться в специальных помещениях с ПЦР-боксами. Рабочее пространство должно быть обработано УФ-облучателями с интенсивностью не менее 10 лк/м<sup>3</sup>/мин в течение не менее 20 мин. Все используемые реагенты должны храниться в замороженном виде в аликвотах при -20 °С.

3.5. С гелем агарозы следует работать в перчатках и с дополнительной предосторожностью, так как бромистый этидий, добавляемый в гель, является сильным мутагеном.

3.6. Визуальную детекцию геля на трансиллюминаторе проводить только с защитным экраном либо в очках, не пропускающих УФ-излучение.

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Скрининговые исследования интенсивности эпидемического и эпизоотического процессов ВГЕ на эндемичных и неэндемичных территориях.
2. Заболевания и патологические состояния человека, вызванные ВГЕ.
3. Дифференциальная диагностика острого гепатита людей.
4. Эпидемиологическое расследование случаев ВГЕ.
5. Скрининговые исследования донорской крови и ее продуктов на присутствие ВГЕ.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### *Выделение РНК из образцов биологического материала*

Для исследований проводится забор биологических жидкостей (кровь, моча), фекалий либо образцов различных органов и тканей в стерильные пробирки. Забор крови осуществляется в пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА).

Из образцов фекалий готовится 10–20 % осветленный экстракт. Для этого пробы фекалий объемом 1,0 мл (0,4–1,0 г) помещают в отдельные стерильные пробирки и к каждому образцу добавляют по 4,0 мл физиологического раствора. Взвесь интенсивно встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин, после чего супернатанты переносят в новые пробирки и повторно центрифугируют в течение 20 мин при 10000 об/мин. Полученные надосадочные жидкости отбираются и переносятся в отдельные пробирки для дальнейшего анализа.

Образцы органов и тканей предварительно измельчают специальными приспособлениями (погружной блендер, гомогенизатор и пр.).

Все дальнейшие манипуляции осуществляются согласно методике производителя наборов для выделения общей фракции РНК, в т. ч. и вирусной, из биологических образцов.

Полученные пробы РНК сразу же используются для постановки ОТ- ПЦР.

### *Аmplификация (проведение ПЦР)*

Выявление РНК ВГЕ проводится в два раунда. Первый раунд включает стадию обратной транскрипции участков РНК в кДНК и их последовательную многократную амплификацию с типоспецифическими внешними праймерами. Второй раунд включает амплификацию продукта первого раунда с внутренними праймерами (таблица 1). Использование вложенной (гнездовой) ПЦР позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности анализа.

Таблица 1. — Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для первого и второго раундов ПЦР

Последовательность	Положение	Направление	Позиция в геноме*
5' - ААУТАТГСМСАГТАССGGGTTG -3'	Внешний	Прямой	5687–5708

Продолжение таблицы 1

5' - СССТТАТСТГСТГАГСАТТСТС - 3'	Внешний	Обратный	6395–6414
5' - GTYATGYTYTGCATACAGGCT - 3'	Внутренний	Прямой	5972–5993
5' - AGCCGACGAAATYAATTCTGTС - 3'	Внутренний	Обратный	6298–6319
* — нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму VGE Burma (номер в базе данных GenBank M73218).			

### ***Подготовка рабочей амплификационной смеси (ОТ-ПЦР-1) для первого раунда ПЦР***

В отдельной пробирке вместимостью 0,5–1,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на (N+1) пробы и двух контролей (положительного и отрицательного) (таблица 2).

За 20–30 мин до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все реагенты из морозильника (кроме ферментов), разморозить их содержимое, перемешать на вортексе в течение 5 с и центрифугировать для осаждения капель.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для амплификации вместимостью 0,2–0,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (на льду).

При приготовлении рабочей амплификационной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами). Имеет смысл готовить общую рабочую смесь, которая содержит все компоненты, за исключением образцов исследуемой РНК. Объем каждого составляющего компонента умножается на количество образцов (N+1). Ее следует готовить непосредственно перед амплификацией (таблица 2).

Таблица 2. — Компоненты реакционной смеси для первого раунда ПЦР, совмещенной с ОТ.

Компоненты*	Объем для 1 пробы (мкл)	Объем для (N+1) проб (мкл)
Вода для ПЦР	7,5	7,5 x (N+1)
Буфер для обратной транскриптазы (5X)	5	5 x (N+1)
Смесь дНТФ (10 мМ)	2	2 x (N+1)
Внешний праймер прямой (10 мкМ)	1,5	1,5 x (N+1)
Внешний праймер обратный (10 мкМ)	1,5	1,5 x (N+1)
Ингибитор РНКазы (20 ЕД/мкл)	1,0	1 x (N+1)
Обратная транскриптаза (200 ЕД/мкл)	1,0	1 x (N+1)
ДНК-полимераза (5 ЕД/мкл)	0,5	0,5 x (N+1)
Объем смеси на 1 пробирку	20	20 x (N+1)
Исследуемая РНК	5	
* — компоненты вносятся в порядке, указанном в данной таблице.		

Общая реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется и разливается по 20 мкл по отдельным ПЦР-пробиркам.

В каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами вносится по 5 мкл образца исследуемой РНК согласно запланированной схеме и пипетируется для тщательного перемешивания содержимого пробирок.

После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор, запрограммированный на режим ОТ-ПЦР-1 (таблица 3).

Таблица 3. — Программа амплификации первого раунда (ОТ-ПЦР-1)

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Обратная транскрипция	42	1 ч	1
Дезактивация фермента ОТ	94	5 мин	1
Денатурация	94	30 с	35
Отжиг	45	30 с	
Элонгация	72	45 с	
Финальная элонгация	72	7 мин	1
Хранение	4		

После окончания полимеразной цепной реакции все ПЦР-пробирки извлекаются из амплификатора. Штатив с пробирками помещается в холодильник до проведения второго раунда ПЦР.

#### ***Подготовка рабочей амплификационной смеси (ПЦР-2) для второго раунда ПЦР***

В отдельной пробирке вместимостью 0,5–1,5 мл (на льду) приготовить рабочую смесь для амплификации из расчета на (N+1) пробы и двух контролей (положительного и отрицательного) (таблица 2).

За 20–30 мин до приготовления реакционной ПЦР-смеси извлечь все реагенты из морозильника, разморозить их содержимое на льду и встряхнуть на вортексе в течение 5 с.

Приготовить и пронумеровать ПЦР-пробирки для проведения амплификации в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль (на льду).

При приготовлении рабочей реакционной смеси каждый компонент добавляется отдельным наконечником с аэрозольными барьерами (фильтрами). Ее следует готовить непосредственно перед амплификацией (таблица 4).

Таблица 4. — Компоненты реакционной смеси для второго раунда ПЦ

Компоненты*	Объем для 1 пробы (мкл)	Объем для (N+1) проб (мкл)
Вода	6,5	6,5 x (N+1)
ПЦР-Мастер-Микс	12,5	12,5 x (N+1)
Внутренний праймер прямой (10 мкМ)	1,0	1 x (N+1)
Внутренний праймер обратный (10 мкМ)	1,0	1x (N+1)
Объем смеси на 1 пробирку	21	19 x (N+1)
Реакционная смесь первого раунда, содержащая кДНК	4	

\*— компоненты вносятся в порядке, указанном в данной таблице.



Общая реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется для осаждения капель и разливается по 21 мкл по отдельным пробиркам.

Затем в каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами вносится по 4 мкл образца кДНК, полученного в первом раунде ПЦР, согласно запланированной схеме и пипетируется для тщательного перемешивания содержимого пробирок.

После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор, запрограммированный на режим ПЦР-2 (таблица 5).

Таблица 5. — Программа амплификации второго раунда ПЦР

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	94	5 мин	1
Денатурация	94	30 с	35
Отжиг	45	30 с	
Элонгация	72	45 с	
Финальная элонгация	72	7 мин	1
Хранение	4		

После окончания амплификации все ПЦР-пробирки извлекаются из амплификатора. Штатив с пробирками помещается в холодильник до проведения электрофореза продуктов реакции.

#### ***Детекция продуктов амплификации***

Для детекции продуктов амплификации используется метод горизонтального гель-электрофореза, основанный на том, что смесь макромолекул под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры. Однородные фрагменты ДНК представляют на электрофореграмме единую фракцию в виде полос. Продукты амплификации анализируют в 2 % агарозном геле.

1. Залить в камеру для электрофореза ТБЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 10хТБЕ в 10 раз (рН = 8,3): 70 мл 10хТБЕ добавить к 630 мл дистиллированной воды.

2. Для приготовления 2 % геля к 3,0 г агарозы добавить 15 мл 10хТБЕ буфера и 132 мл дистиллированной воды.

3. Приготовленную агарозную смесь расплавить в СВЧ-печи до однородности.

4. Охладить расплавленную агарозу до температуры от 50 до 60 °С. Добавить к 150 мл расплавленной агарозы 3,75 мкл 1 % раствора бромистого этидия. Перемешать до однородной окраски, избегая аэрации раствора. Затем раствор агарозы залить в кювету для геля. Для получения в агарозном геле лунок для внесения образцов нужно предварительно перед заливкой агарозы установить в кювету гребенку (ее зубцы не должны доставать до дна примерно 1 мм), при этом толщина гребенки и толщина геля должны обеспечить объем лунок не менее 20–25 мкл. После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести кювету с гелем в камеру для проведения электрофореза.

5. Если Мастер-Микс второго раунда ПЦР не содержит в своем составе глицерин и краситель, то необходимо подготовить к электрофорезу образцы амплифицированной ДНК, для чего смешать их с буфером для внесения (5:1, О/О).

6. Внести в лунки геля по 15–20 мкл амплифицированной ДНК в последовательности, соответствующей нумерации проб или схеме нанесения образцов. Для контроля размера полученных фрагментов использовать коммерческие маркеры размера ДНК при каждом электрофорезе наряду с образцами.

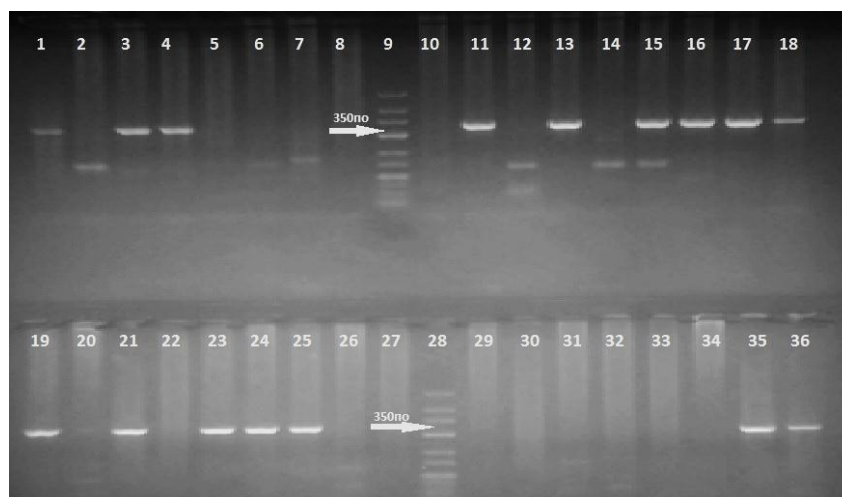
7. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение электрического поля 5–7 В/см. Провести электрофоретическое разделение продуктов в направлении от катода (–) к аноду (+).

### ***Визуализация результатов электрофореза***

Контроль за электрофоретического разделения осуществляется визуально по движению полос красителей. Оптимальное время разгонки — 60 мин при напряжении электрического поля 6–8 В/см.

После окончания электрофореза извлечь гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.

Включить трансиллюминатор или любой детектирующий прибор для геле-документации и проанализировать результаты анализа. Фрагменты амплифицированной ДНК видны в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением. Длины фрагментов оцениваются относительно маркера молекулярного веса ДНК. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляет 350 п.н., что определяется по наличию данной полосы в электрофоретическом треке образца и расценивается как положительный результат на наличие ВГЕ в образце (рисунок).



**Рисунок — Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР образцов кроликов**

1, 3, 4, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 35, 36 дорожки — образцы фекалий, в которых обнаруживается ВГЕ (полоса 350 п.н.); 2, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 20, 22, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34 дорожки — образцы фекалий, в которых не обнаруживается ВГЕ (отсутствие полосы 350 п.н.);

9, 28 дорожки — маркер молекулярного веса ДНК (сверху вниз: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 п.н)

## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ 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. Особенно опасны ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб, контроль которых невозможно осуществить во время ПЦР-анализа. Не следует в качестве антикоагулянта при заборе крови использовать гепарин либо цитрат натрия, так как они ингибируют ПЦР. Хранение биологического материала производят в морозильной камере при  $-70^{\circ}\text{C}$  не более 1 года.

Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении работы в ПЦР-лаборатории. С особым вниманием и осторожностью следует отнестись к возможности контаминации как источнику ложноположительных результатов. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при выделении ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления положительного результата в отрицательном контроле свидетельствуют о наличии перекрестной контаминации образцов, контаминации помещений, оборудования и реагентов продуктами амплификации (ампликонами).

Таблица 6. — 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	Убедиться в наличии РНК в пробе. При отсутствии, низкой концентрации, высокой степени загрязнения выделить РНК повторно. Выделенную РНК хранить при температуре $-20^{\circ}\text{C}$ и ниже
Разрушение реагентов	Большинство реагентов чувствительно к повторному замораживанию-оттаиванию, поэтому реагенты рекомендуется разливать на отдельные постановки
Неверно установленная программа амплификации	Установить программу амплификации согласно настоящей инструкции

Таблица 7. — 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>	<p>Разделение функциональных рабочих зон.</p> <p>Соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов.</p> <p>Использование отдельных лабораторных халатов в каждой рабочей зоне.</p> <p>Использование одноразовых перчаток без талька.</p> <p>Использование наконечников для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля.</p> <p>Использование одноразовых пластиковых пробирок, посуды, наконечников.</p> <p>Химическая и УФ-дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.</p> <p>Использование положительного и отрицательного контролей</p>

Таблица 8. — Наличие специфических продуктов реакции в первом раунде ПЦР и отсутствие или наличие неспецифических продуктов во втором раунде ПЦР

Причина	Пути устранения
Отсутствие в реакционной смеси второго раунда праймеров для данного генотипа	Использование альтернативного набора праймеров для второго раунда
Наличие контаминации при постановке второго раунда	См. таблицу 7
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