

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения

Главный государственный санитарный врач

_____ Римжа М.И.

28 декабря 2005 г.

Регистрационный № 193-1205

**ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫ-
ЯВЛЕНИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛЕВОМ И
КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Научно-исследовательский институт эпидемиоло-
гии и микробиологии

Авторы: Т.И. Самойлова, А.А. Михайлова, Т.В. Амвросьева, А.А. Безручко

Инструкция предназначена для специалистов НИИ, лабораторий санитарно-эпидемиологической службы и лечебно-профилактических учреждений, занимающихся диагностикой вирусных инфекций.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Весы технические аптечные.
4. Весы торсионные.
5. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания.
6. Иономер (рН-121).
7. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
8. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл.
9. Посуда лабораторная (чашки Петри, колбы, пробирки).
10. Термостат, регулируемый до $37 \pm 0,5$ °С.
11. Фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2-7,4).
12. Холодильник-морозильник (минус 20 °С, +4 °С).
13. Центрифуга (1500 об/мин).
14. Этиловый спирт (этанол, ГОСТ 5962-67).

Необходимые материалы и оборудование для осуществления ПЦР-исследований изложены в п.п. 3, 4, 5.1, 5.3.

1. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Молекулярно-биологические методы исследований направлены на выявление генетического материала арбовирусов. Наиболее часто для этих целей применяется полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции,

которая обладает рядом преимуществ: высокой специфичностью, чувствительностью и быстротой исполнения.

До последнего времени для лабораторной диагностики арбовирусных инфекций (КЭ, ЗНЭ и др.) в Беларуси использовали серологические реакции, такие как РСК, РТГА, РН, которые обладают высокой специфичностью и чувствительностью, но уступают по скорости установления диагноза таким экспресс-методам как полимеразная цепная реакция (ПЦР): специфическая амплификация нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами. Праймеры для ПЦР подбирают таким образом, чтобы обеспечить амплификацию специфического фрагмента вирусного генома. Благодаря высокой чувствительности реакции, присутствующие в полевом и клиническом материале последовательности даже в минимальном количестве (одна вирусная последовательность на 100 000 – 1 000 000 нормальных клеток) могут легко выявляться с помощью ПЦР. Каждый раунд ПЦР занимает от 2 до 5 мин, для получения результата необходимо 25-50 раундов. Весь анализ можно провести в течение одного дня. ПЦР-праймеры обычно имеют размеры от 18 до 25 нуклеотидов. Их можно синтезировать с помощью автоматических синтезаторов ДНК, имеющихся в крупных исследовательских центрах. Праймеры можно приобрести у ряда коммерческих фирм. Подбор праймеров – ключевое звено ПЦР, поскольку ими определяется возможность амплификации и выявление нужной последовательности, уровень чувствительности анализа.

Детекцию РНК арбовирусов осуществляют в образцах ликвора, сгустках и сыворотках крови, а также в полевом материале (клещи, комары, мошки) методом полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

При проведении ПЦР-исследований следует учитывать принцип разделения лаборатории на три зоны, с отдельным набором оборудования и материалов в каждой. Первая зона предназначена для выделения РНК из природного или клинического материала. Во второй зоне осуществляют постановку реакции обратной транскрипции и ПЦР. Третья зона предназначена для постановки

электрофореза и учёта результатов, она должна быть максимально удалена и изолирована от первых двух зон. Движение материалов и сотрудников происходит строго в направлении от первой к третьей зоне. Противозидемический режим работы при ее организации и выполнении должен соответствовать режиму работы с микроорганизмами II группы патогенности, к которой относятся арбовирусы.

2. ОТБОР И ОБРАБОТКА ПРОБ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Отбор и обработка сгустков крови

Кровь от обследуемых больных следует брать как можно раньше, в самом начале заболевания, в период высокой температуры. Оптимальными сроками для выделения вируса являются первые 2-3 дня лихорадочного периода. Кровь отбирают стерильно в стеклянную или пластмассовую пробирку в объеме 0,5-1,0 мл и хранят при -20 °С до исследования. В работу берут 10 %-ю суспензию, приготовленную на фосфатном буферном растворе рН 7,2-7,4.

2.2. Отбор и обработка сывороток крови

Кровь для получения сыворотки забирают на 3-5 день от начала заболевания также в стеклянную или пластмассовую пробирку в объеме 1,0-1,5 мл. Выдерживают в термостате 30 мин при 37 °С для скорейшего свёртывания. Центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку отбирают и исследуют или хранят при -20 °С до исследования. Многократные замораживания-оттаивания сывороток нежелательны, так как это может привести к деградации вирусных нуклеиновых кислот.

2.3. Отбор проб ликвора

Ликвор или СМЖ берется при помощи спинномозговой пункции квалифицированным врачом-специалистом. Полученный материал не требует предварительной обработки и до исследования храниться при -20 °С.

2.4. Обработка полевого материала (клещи, комары, мошки)

После сбора и доставки в лабораторию полевого материала, комаров и клещей усыпляют эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5мл.

Иксодовых клещей при исследовании на вирус клещевого энцефалита и других возбудителей природно-очаговых инфекций исследуют отдельно по фазам развития. В одну пробу берут напитавшихся самок в количестве не более трех, голодных самок - до 20; нимф напитавшихся - до 20, голодных нимф - до 150; личинок напитавшихся – до 30. При исследовании на арбовирусы комаров объединяют в биопробы по 50-100 экземпляров. При необходимости проводят исследования отдельных особей. Мошек объединяют в пробы, включая в каждую до 250 экземпляров.

Предварительная обработка проб:

- клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 % этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3-5 с. при 5000 об/мин для удаления капель с крышки пробирки;

- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки;

- вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3-5 с при 5000 об/мин;

- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки;

- переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7 мл 0,15 М раствора хлорида натрия и гомогенизируют пробу;

- наконечником с аэрозольным барьером переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 1 минуты для осветления пробы.

РНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК из комаров используют данную методику обработки проб за исключением этапов отмывки в 96 % этаноле и 0,15 М растворе хлорида натрия.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Выделение РНК осуществляют с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя.

Материалы и оборудование:

- настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
- твердотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25-100 °С;
- вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой;
- микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 14000 об/мин;
- центрифуга/вортекс;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл;
- холодильник на 2-8 °С и на -20 °С;
- емкость с дезинфицирующим раствором.

Работают только в одноразовых перчатках, используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 5 %-ный раствор хлорамина или в специальную емкость с 1N раствором соляной кислоты.

4. РЕКАЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция осуществляются с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией производителя.

Принцип анализа:

Метод ОТ-ПЦР включает два этапа:

На первом этапе при температуре 37 °С происходит реакция обратной транскрипции: специфическое связывание олигонуклеотида-праймера с вирусной РНК и синтез вирусной кДНК (комплиментарной ДНК) с помощью *обратной транскриптазы (ревертазы)*.

На втором этапе проводится амплификация полученной кДНК в ПЦР, каждый цикл которой включает три стадии. На первой стадии при температуре 94-95° С происходит денатурация двойных цепей нуклеиновых кислот, синтезированных в ходе ПЦР, а также комплексов праймеров с ДНК-матрицами. На второй стадии ПЦР два олигонуклеотида-праймера, строго специфичные к определённым участкам вирусной кДНК/ДНК, связываются (образуют гибриды с помощью водородных связей) с этими участками НК (стадия отжига) при температуре, определяемой нуклеотидной последовательностью праймеров. На третьей стадии при температуре 72 °С с участием термофильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) и дезоксинуклеозидтрифосфатов происходит синтез новых цепей ДНК. Инициация синтеза ДНК происходит в местах связывания олигонуклеотидов-праймеров с вирусной кДНК/ДНК матрицей.

Таким образом, за цикл (три стадии) происходит удвоение каждой из двух антипараллельных цепей вирусной НК. При проведении 20 таких циклов теоретически происходит увеличение количества исходной ДНК примерно в миллион раз.

Для увеличения чувствительности анализа ПЦР может проводиться в варианте “nested”-ПЦР («гнездовая» ПЦР), как, например, в тест-системе «ВектоВКЭ-РНК-ампли-100» производства «Вектор-Бест» (Россия): первый раунд –

с “внешней” парой олигонуклеотидов-праймеров, второй раунд – с “внутренней” парой олигонуклеотидов-праймеров и аликвотой реакционной смеси ПЦР первого раунда. Размер специфического ампликона в первом раунде ПЦР — 340 пар оснований, во втором раунде ПЦР — 171 пара оснований.

Материалы и оборудование:

- амплификатор;
- центрифуга лабораторная типа «Эппендорф»;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс»;
- снежная или льдо-водяная баня;
- набор автоматических микропипеток с переменным объемом;
- наконечники к микропипеткам;
- пробирки полипропиленовые, 1,5 и 0,5 мл типа «Эппендорф».

5. АНАЛИЗ ПЦР-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК (учет результатов)

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез.

Материалы и оборудование:

- агароза для электрофореза;
- ДНК-маркер 50-1000 пар оснований;
- этилендиаминтетраацетат (ЭДТА);
- фиколл;
- бромфеноловый синий;
- трис;
- бромистый этидий;
- ледяная уксусная кислота;
- борная кислота.
- прибор для горизонтального электрофореза;
- гребенки для горизонтального электрофореза;
- источник питания (источник постоянного тока);

- трансиллюминатор;
- фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в ультрафиолете;
- автоматические пипетки и наконечники.

5.1. Подготовка реагентов

Буферы для электрофореза:

ТАЕ (50X) на 1 л	0,04 М Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты) 0,002 М ЭДТА (100 мл 0,5 М ЭДТА pH 8,0)
ТБЕ (5X) на 1 л	0,089 М 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 °С или в микроволновой печи до полного расплавления.

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

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

5.2. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят в резиновых перчатках. Все реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. ниже).

5.3. Обезвреживание реагентов

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 часов. Добавляют

1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

5.4. 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 12000 об./мин 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 агароза была полностью им покрыта;
- 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.

5.5. 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 проницаемых материалов.

Качество проведенного анализа считается удовлетворительным при выполнении следующих условий:

- наличие в дорожке положительного контрольного образца полосы ДНК специфического размера;

- отсутствие специфической полосы в дорожке отрицательного контрольного образца.

Во всех других случаях результаты исследования не учитываются.

Проба считается положительной при наличии в соответствующей дорожке геля полосы ДНК, совпадающей по размеру (т.е. находящейся на одном уровне) с полосой положительного контроля.

Размер полос определяют по соотношению с ДНК-маркером.

Результаты можно фиксировать посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании ультрафиолетовых фильтров.

6. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ДЕТЕКЦИИ РНК АРБОВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ ОТ-ПЦР И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Отсутствие специфической полосы в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Отсутствие специфической полосы в препарате положительного контроля может быть следствием деградации РНК/ДНК на одном из этапов исследования и/или внесения в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения:

- на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпиروкарбонатом вода во избежание загрязнения препарата РНКазами.

Наличие специфической полосы в препарате отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон;
- работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую;

- использование отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон.