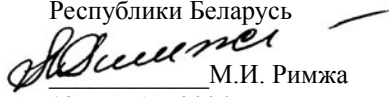


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь


М.И. Римжа

13 октября 2004 г.

Регистрационный № 210–1203

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ
ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕРДЦА**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Авторы: Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, З.Б. Квачева,
О.В. Дьяконова, З.Ф. Богуш, О.Н. Казинец

ВВЕДЕНИЕ

Энтеровирусная инфекция сердца (ЭВИС) является регулярно регистрируемой в мире патологией и имеет вполне определенную долю в структуре общей инфекционной заболеваемости. Она может быть причиной целого ряда клинических форм, имеющих как острое, так и хроническое течение: кардитов у детей и взрослых, дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), кардиомиопатий у новорожденных и детей раннего возраста. Для установления точного диагноза у таких больных необходимо осуществление вирусологической диагностики, по результатам которой могут быть внесены изменения в тактику ведения конкретного больного и назначения ему адекватного лечения.

Инструкция предназначена для врачей-кардиологов, инфекционистов, специалистов лабораторной службы (НИИ, ЦГЭ, лечебных учреждений), занимающихся вирусологической диагностикой.

1. СХЕМА ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕРДЦА

1. Сбор анамнеза на предмет наличия у больного предшествующей вирусной инфекции осуществляется лечащим врачом. При наличии в анамнезе больного симптомов вирусной инфекции лечащий врач направляет пациента на проведение первичной вирусологической диагностики (рис. 1)

2. Первичная вирусологическая диагностика, направленная на выявление энтеровирусной инфекции (ЭВИ) в организме больного, проводится специалистами лабораторной службы лечебного учреждения (при наличии соответствующей базы) или специалистами НИИ, ЦГЭ, занимающимися вирусологической диагностикой. Осуществление данной экспресс-диагностики (рис. 1) заключается в обнаружении серологических маркеров активной ЭВИ (IgM к энтеровирусам (ЭВ) в сыворотке крови больного и антигенов (Ag) ЭВ в фекалиях). В качестве метода исследования рекомендуется использовать иммуноферментный анализ (ИФА) как наиболее чувствительный из разработанных на сегодняшний день серологических методов детекции. Иссле-

дования данным методом желательнее проводить в неэпидеми-
 ческий период для снижения вероятности получения данных,
 связанных с сезонным подъемом заболеваемости ЭВИ. При по-
 лучении положительного результата проводят повторные сероло-
 гические исследования с интервалом более 6 мес. Положитель-
 ный результат исследований указывает на наличие постоянного
 антигенного стимула и является показанием для проведения мо-
 лекулярно-биологических исследований тканей сердца.

3. Результат первичной вирусологической диагностики
 ЭВИС, полученный лабораторной службой, передается леча-
 щему врачу. Он на основании представленных данных делает
 заключение о целесообразности привлечения врача-инфекци-
 олога к ведению больного. При наличии острых показаний
 (отсутствие эффекта от проводимой терапии, тяжелое, неблаго-
 приятное течение заболевания) специалистами, осуществляю-
 щими ведение данного больного, может быть рекомендовано
 проведение молекулярно-биологических и иммуногистохи-
 мических исследований биопсийного материала сердца.

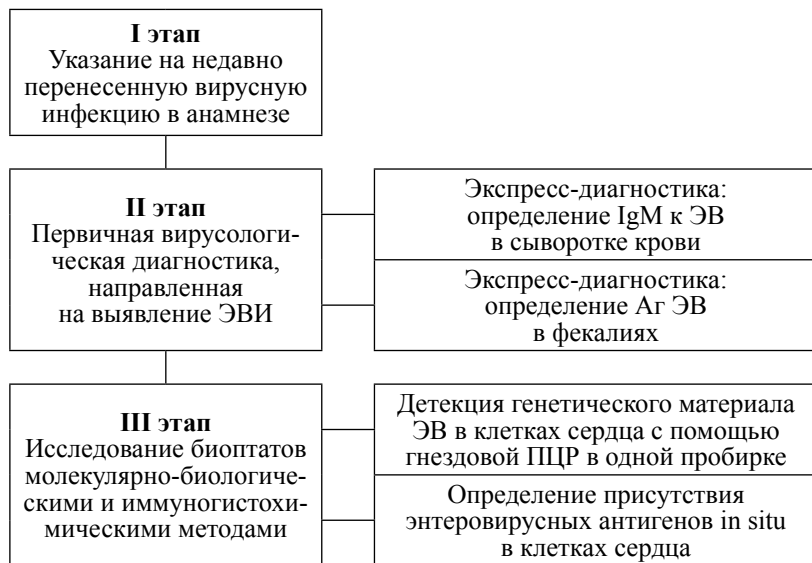


Рис. 1. Схема вирусологической диагностики ЭВИС

4. Забор эндомикардиальной биопсии производится в лечебных учреждениях, имеющих соответствующую базу (НПЦ «Кардиология»).

5. Образцы эндомикардиальной биопсии передаются специалистам лабораторной службы, занимающимся вирусологической диагностикой. Ими осуществляется детекция Аг ЭВ, а также РНК ЭВ в клетках сердца больного (рис. 1).

6. На основании полученных на этом этапе данных лечащий врач может сделать окончательное заключение о наличии у больного ЭВИС и необходимости проведения противовирусной терапии.

2. ПРОВЕДЕНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

2.1. Отбор и обработка проб

– забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Затем кровь переносится в стеклянную пробирку без антикоагулянта;

– кровь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин (до полного образования сгустка) или помещают в термостат на 15 мин;

– центрифугируют пробирку в течение 10 мин при 3000 об./мин;

– сыворотку крови отбирают и переносят в чистую пробирку. Полученная сыворотка может храниться при температуре -20°C в течение месяца;

– отбор и обработку фекалий осуществляют в соответствии с инструкцией, прилагаемой к тест-системам для детекции Аг ЭВ методом ИФА.

2.2. Определение IgM к энтеровирусам в сыворотке крови

Детекцию IgM к ЭВ в сыворотке крови больного осуществляют методом ИФА с использованием тест-систем производства НИИ эпидемиологии и микробиологии. Постановка реакции — в соответствии с инструкцией производителя.

2.3. Выявление антигенов энтеровирусов в фекалиях

Обнаружение Аг ЭВ в фекалиях больного осуществляют методом ИФА с использованием тест-систем производства НИИ эпидемиологии и микробиологии. Постановка реакции — в соответствии с инструкцией производителя.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИСУТСТВИЯ АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ IN SITU МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Выявление Аг ЭВ в клетках сердца проводят с использованием материала эндомикардиальной биопсии.

Для проведения исследований используют срезы толщиной 4–5 мкм, полученные из фиксированных в формалине и залитых в парафин (стандартными методами) блоков ткани. Перед депарафинированием срезы должны быть высушены в течение ночи при 37° С.

3.1. Депарафинирование срезов

3.1.1. Материалы

- ксилол;
- этанол;
- трипсин;
- CaCl₂;
- сыворотки диагностические (кроличьи) к различным серогруппам ЭВ;
- сыворотка антивидовая против иммуноглобулинов кролика, меченная ФИТЦ (баранья);
- нормальная сыворотка барана*;
- эванс голубой.

3.1.2. Приготовление растворов

- 0,1% раствор трипсина готовят, растворяя трипсин в 0,1% CaCl₂, pH доводят до 7,8 с помощью 0,1% NaOH или 2% HCl;
- Трис-солевой буфер (ТСБ) готовят, растворяя в дистиллированной воде 50 мМ Трис и 100 мМ NaCl, pH 7,6;

*используют для блокирования участков неспецифического связывания (если применяют антивидовую сыворотку, меченную ФИТЦ, полученную от другого животного, в качестве блокирующего раствора используют нормальную сыворотку этого животного)

- нормальную сыворотку барана разводят в соотношении 1:30;
- диагностическую и антивидовую сыворотки разводят в соответствии с инструкцией фирмы-производителя;
- для удаления неспецифического свечения в антивидовую сыворотку, меченную ФИТЦ, добавляют эванс голубой до конечной концентрации 0,005%.

3.1.3. Постановка

- удаляют парафин со срезов в 3 сменах ксилола, по 2 мин в каждой смене;
- проводят срезы через батарею спиртов (96%, 96%, 70%), по 2 мин в каждом;
- тщательно промывают срезы водопроводной водой и споласкивают в дистиллированной;
- прогревают срезы в дистиллированной воде при 37° С в течение 5–10 мин;
- стряхивают со стекол воду и помещают их в 0,1% раствор трипсина на 10 мин (если используют фермент, который хранился в виде раствора более недели, то время протеолитической обработки может быть увеличено);
- останавливают ферментативную обработку, опустив стекла со срезами в дистиллированную воду, а затем в ТСБ. Антитела и блокирующий раствор наносят на влажные срезы;
- наносят на срезы каплю нормальной сыворотки барана, не промывая срезы удаляют избыток сыворотки, оставив влажной только ту часть предметного стекла, на которой находится срез;
- наносят на срезы диагностические сыворотки (в рабочем разведении);
- помещают стекла с нанесенными сыворотками во влажную камеру и инкубируют при 37° С в течение 1 ч;
- промывают стекла в ТСБ 3 раза по 5–7 мин, вытирают досуха все стекло, кроме той части, где находится срез;
- наносят на срезы сыворотку антивидовую против иммуноглобулинов кролика, меченную ФИТЦ (в рабочем разведении);
- помещают стекла с нанесенной сывороткой во влажную камеру и инкубируют при 37° С в течение 30 мин;
- промывают стекла в ТСБ 3 раза по 10 мин;

– параллельно с описанными выше манипуляциями проставляют контроли специфичности свечения в соответствии с инструкцией производителя люминесцирующих антител.

Полученные препараты исследуют под люминесцентным микроскопом. В случае положительных результатов в цитоплазме клеток, содержащих Аг ЭВ, обнаруживается перинуклеарно расположенное свечение.

Окрашенные препараты рекомендуется изучать под микроскопом сразу же после приготовления. Их можно хранить при 4° С, но интенсивность флуоресценции постепенно падает.

Необходимо отметить, что выявление Аг ЭВ в тканях сердца является достаточно сложной диагностической процедурой, репрезентативность результатов которой может зависеть от ряда моментов и, прежде всего, от качества исследуемого материала. Положительный результат однозначно указывает на наличие у больного ЭВИС. Отрицательный результат при детекции Аг ЭВ в тканях сердца не может служить абсолютным доказательством отсутствия ЭВИС. В данном случае необходимо провести ПЦР-диагностику (полимеразная цепная реакция), которая позволит сделать окончательный вывод о наличии либо отсутствия у данного больного ЭВИС.

4. ДЕТЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ЭНТЕРОВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СО СТАДИЕЙ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Детекцию РНК ЭВ осуществляют в клиническом материале, полученном от больного в результате эндомиокардиальной биопсии. Для выявления РНК ЭВ могут быть использованы как нативные, так и фиксированные образцы тканей. При работе с фиксированными образцами тканей сердца необходимым этапом является депарафинирование препаратов, осуществляемое перед выделением из них РНК.

Поскольку РНК значительно менее стабильна, чем ДНК, необходимым условием при проведении ПЦР-диагностики РНК ЭВ в тканях сердца является использование так называемого внут-

ренного маркера сохранности РНК в исследуемом образце ткани. В качестве такого маркера выступает мРНК гена β-актина. После выделения РНК из пробы проводят ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ ПЦР), направленную на выявление мРНК гена β-актина («внутреннего маркера»). Отрицательный результат свидетельствует о полной деградации РНК в данной пробе, и, следовательно, о ее непригодности для проведения ПЦР-диагностики в отношении ЭВ. При получении положительного результата данную пробу РНК исследуют методом ОТ ПЦР для детекции ЭВ. Постановка реакции ОТ в отношении РНК β-актина и энтеровирусной РНК проводится по единому протоколу, за исключением праймера, используемого в реакции.

4.1. Праймерные последовательности

Праймерные последовательности синтезируют под заказ различные фирмы-производители, в том числе Литех, Синтол (Россия).

Для диагностики РНК ЭВ в тканях сердца используют следующие праймеры (см. табл.).

**Праймеры для диагностики
РНК энтеровирусов в тканях сердца**

Этап использования	Название	Последовательность
Детекция мРНК β-актина	AF (прямой)	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'
	AR (обратный)	5'-GATCCTCACCGAGCGCGGCTACA-3'
Детекция РНК ЭВ	НП1 (прямой)	5'-CGCCTGTTTTATACCCCTCCCCAA-3'
	НП2 (обратный)	5'-ACACCCAAAGTAGTCGGTTCGCTGC-3'
	ВП3 (прямой)	5'-AAGCACTTCTGTTACCC-3'
	ВП4 (обратный)	5'-ATTCAAGGGGCCGGAGGA-3'

Расчет рабочих концентраций праймеров

Поставка праймеров производителем осуществляется в количестве, которое измеряется в оптических единицах (ОЕ) на мл. Для расчета рабочих концентраций праймеров необходимо перевести ОЕ в мкМ. Для праймера длиной А пар нуклеотидов (п. н.), поставляемом в количестве В ОЕ, пересчет осуществляется следующим образом:

1. Определяют молекулярную массу (ММ) одноцепочечной ДНК (оцДНК) по формуле:

$$\text{ММ} = 330 \text{ дальтон (ММ 1 п. н.)} \times \text{А}$$

2. Определяют концентрацию праймера, исходя из того, что 1 ОЕ оцДНК соответствует концентрации 37 мкг/мл, В ОЕ — концентрации $37 \times \text{В}$ мкг/мл.

3. Определяют концентрацию праймера (С) в мкМ:

$$\text{С} = (37 \times \text{В} \times 1000) / (330 \times \text{А})$$

Ряд фирм-производителей ревертазы в инструкциях по постановке реакции ОТ указывают не концентрацию праймеров в мкМ, а количество праймера, добавляемого в реакцию (в пмоль). В этом случае пересчет ОЕ в пмоль следует производить по формуле:

$$\text{D} = \text{В} / (0,01 \times \text{А}),$$

где D — количество праймера (в пмоль), содержащегося в 1 мкл раствора.

4.2. Меры предосторожности и правила работы при постановке полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции

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

Все этапы ПЦР выполняют в стерильных условиях с использованием перчаток, свободных от талька.

Постановку ОТ ПЦР осуществляют как минимум в 3 рабочих зонах:

Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка ПЦР-реагентов.

Зона 2а (вытяжной шкаф) — депарафинирование образцов.

Зона 2б (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) — подготовка проб и контролей, выделение РНК, внесение проб в пробирки с ПЦР-реагентами, проведение амплификации.

Зона 3 — детекция амплифицированной ДНК.

Пробы из зоны 3 запрещено переносить в зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей. Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты необходимо менять при переходе из одной зоны в другую.

4.3. ПЦР-контроли

Для контроля специфичности ПЦР используют положительный и отрицательные контроли. При постановке реакции в отношении мРНК β-актина в качестве положительного контроля используют образец свежей ткани сердца, хранившийся в условиях глубокой заморозки (-70°C). При постановке реакции в отношении РНК ЭВ в качестве положительного контроля используют любой ЭВ (вируссодержащая культуральная жидкость), в качестве отрицательных контролей используют стерильную дистиллированную воду. Все манипуляции, начиная с выделения РНК, проводят для проб и для контролей.

4.4. Материалы

- ксилол или октан;
- TRI-реагент (Sigma) или «РибоЗоль-микро» (Амплисенс);
- хлороформ;
- изопропанол;
- этанол;
- 5× или 10× буфер для ОТ (поставляется в наборах для ОТ);
- обратная транскриптаза (вируса птичьего миелобластоза или вируса лейкемии мышей Молони) (поставляется в наборе);
- смесь дезоксинуклеотрифосфатов (ДНТФ);
- ингибитор РНКазы;
- олигонуклеотиды (прямой и обратный праймеры не менее 3 ОЕ/мл);
- 10× ПЦР-буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 25 ммоль раствор MgCl_2 ;

- Таq-полимераза;
- воск для ПЦР;
- минеральное масло;
- свободная от рибонуклеаз вода;
- диэтилпирокарбонат (ДЭПК).

4.5. Подготовка реагентов

Свободную от рибонуклеаз воду готовят посредством обработки деионизованной или бидистиллированной воды 0,1% ДЭПК при 37° С в течение ночи с последующим автоклавированием при 0,5 атм 15 мин.

4.6. Оборудование

- ламинарный бокс или стерилизуемое УФ-излучением помещение;
- ножницы, скальпель;
- фарфоровая ступка для гомогенизации тканей;
- одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл);
- автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1 мл;
- сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами;
- центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением и скоростью не менее 10000 g;
- встряхиватель («Вортекс»);
- термоциклер (амплифицирующее устройство).

4.7. Депарафинирование тканей

– срез ткани (толщина 5–10 мкм) или биоптат (1–2 мм³) измельчают с помощью ножниц и/или скальпеля и помещают в стерильную микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл (пробирки должны быть сухими, так как вода мешает депарафинированию);

- добавляют 1 мл выбранного растворителя (ксилол или октан), встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 2 мин (парафин при этом должен полностью раствориться);
- собирают ткань центрифугированием при 12000 g в течение 5 мин, после чего супернатант сливают;

- добавляют в пробирку 1 мл 95% этанола и встряхивают (ткань при этом должна приобрести беловатый цвет);
- центрифугируют при 12000 g и сливают супернатант;
- повторяют промывку этанолом еще раз;
- ткань подсушивают в эксикаторе в течение 30 мин, после чего проводят выделение РНК.

4.8. Выделение РНК

Выделение РНК осуществляют с использованием коммерческих наборов «РибоЗоль-микро» (Амплисенс, Россия) или TRI-реагента (Sigma, USA) в соответствии с инструкцией производителя.

Хранение выделенной РНК

РНК можно хранить в течение месяца в изопропанолe при -20°C . Для длительного хранения к раствору РНК добавляют 2 объема 70% этанола (температура хранения -70°C).

4.9. Обратная транскрипция

Стандартные реакционные смеси для ОТ производятся различными фирмами (Sigma, Promega, Amersham, Fermentas). В состав реакционных смесей входят буферный раствор(ы) и фермент — обратная транскриптаза (ревертаза) различного происхождения. Ингибитор РНКазы и смесь ДНТФ поставляются отдельно.

Постановка:

- в пробирки на 0,2 или 0,5 мл вносят 10–14,5 мкл РНК-пробы, 10–15 пмоль обратного праймера*;
- смесь аккуратно перемешивают, осаждают центрифугированием и помещают в термоциклер на 10 мин при 70°C ;
- по истечении времени нагревания пробирки достают и помещают на лед;
- в пробы добавляют $5\times$ или $10\times$ буфер для ОТ (конечная концентрация — $1\times$), 1 мкл ДНТФ (100–200 мкМ), обратную транскриптазу (100–200 ед.), ингибитор РНКаз (20 ед.). Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Его при необходимости доводят с помощью свободной от РНКаз воды;

*для детекции β -актина вносят праймер AR, для обнаружения РНК ЭВ — праймер НП2 (последовательности праймеров указаны выше)

- смесь перемешивают, осаждают центрифугированием и выдерживают при комнатной температуре 10–15 мин;
- пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 50 мин при 37–42° С (время и температура, необходимые для работы фермента, указываются в инструкции производителя).

После синтеза кДНК на РНК-матрице пробы используют для ПЦР-амплификации.

4.10. Полимеразная цепная реакция

4.10.1. Полимеразная цепная реакция для обнаружения мРНК β-актина

Постановка:

- в рабочей зоне 1 проводят подготовку ПЦР-смеси: в пробирки на 0,2 или 0,5 мл помещают 2,5 мкл 10× ПЦР-буфера (конечная концентрация — 1×), 1 мкл ДНТФ (100–200 мкМ), 1 мкл праймера AF (20 мкМ), 1 мкл праймера AR (20 мкМ), 0,5–1,0 мкл Taq-полимеразы (2,5–5 ед.);

- 10 мкл пробы после ОТ вносят в подготовленную ранее пробирку с ПЦР-смесью;

- объем доводят до 25 мкл с помощью свободной от ДНКаз воды;

- минеральное масло в объеме 100 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования пробирок на 0,5 мл и термоциклеров без нагреваемой крышки;

- пробы помещают в термоциклер и проводят 40 циклов амплификации в следующих режимах: денатурация 94° С — 1 мин; отжиг 58° С — 1 мин; элонгация 72° С — 1 мин.

Порядок учета результатов описан в разделе 5.7. Отрицательный результат свидетельствует о деградации РНК в пробе. Такой материал не может быть использован для проведения ПЦР-диагностики в отношении ЭВ.

При получении положительного результата, указывающего на сохранность РНК в исследуемом материале, проводятся дальнейшие исследования, направленные на выявление в данной пробе РНК ЭВ.

4.10.2. Полимеразная цепная реакция для обнаружения РНК энтеровирусов

Для определения низкого количества вирусной РНК в пробах применяется гнездовая модификация ПЦР. При постановке метода используют 2 набора праймеров: с первой парой осуществляется накопление фрагмента энтеровирусной РНК, затем вводится вторая пара праймеров, ограничивающих участок внутри выбранного ранее, и проводится следующая реакция, что позволяет значительно повысить чувствительность обнаружения РНК ЭВ. Во избежание контаминации ампликонами первого раунда для детекции РНК ЭВ в тканях сердца рекомендуется использовать модифицированную гнездовую ПЦР в одной пробирке.

Постановка:

– в рабочей зоне 1 проводят подготовку ПЦР-смесей 1 и 2 (в пробирках на 0,2 или 0,5 мл). ПЦР-смесь 1 (на N пробирок): 2,5 мкл $10\times$ ПЦР-буфера (конечная концентрация — $1\times$) \times N, 3 мкл $MgCl_2$ (3 мМ) \times N, 0,5 мкл Taq-полимеразы (2,5 ед.) \times N, 4 мкл H_2O \times N. ПЦР-смесь 2 (на N пробирок): 1 мкл ДНТФ (100–200 мкМ) \times N, 1 мкл праймера НП1 (0,25 мкМ) \times N, 1 мкл праймера НП2 (0,25 мкМ) \times N, 1 мкл праймера ВП3 (25 мкМ) \times N, 1 мкл праймера ВП4 (25 мкМ) \times N;

– разделяют 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° С), и вносят 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 ОТ вносят в подготовленные для ПЦР пробирки;

– минеральное масло в объеме 25 мкл наслаивают на подготовленные пробы в случае использования пробирок на 0,5 мл и термоциклеров без подогреваемой крышки;

– программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации: денатурация 95° С — 5 мин; денатурация 95° С — 10 с, отжиг 65° С — 10 с, элонгация 72° С — 10 с

(36 циклов); денатурация 95° С — 10 с, отжиг 50° С — 10 с, элонгация 72° С — 10 с (42 цикла). При использовании амплификаторов с регулированием температуры по матрице (MiniCycler, PTC-100) длительность каждого сегмента цикла увеличивается от 10 с до 1 мин;

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

5. АНАЛИЗ ПЦР-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК

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

5.1. Материалы

- агароза для электрофореза;
- ДНК-маркер 50–1000 пар оснований;
- ЭДТА;
- фиколл;
- бромфеноловый синий;
- Трис;
- бромистый этидий;
- ледяная уксусная кислота;
- борная кислота.

5.2. Подготовка реагентов

– буферы для электрофореза. ТАЕ (50×) 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 (5×) на 1 л: 0,089 М Трис-борат (54 г Трис, 27,5 г борной кислоты), 0,002 М ЭДТА (20 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0);

– 1,5–2% агароза — 1,5–2 г агарозы на 100 мл 1× буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100° С 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.

5.3. Оборудование

- прибор для горизонтального электрофореза;
- гребенки для горизонтального электрофореза;
- источник питания (источник постоянного тока);
- трансиллюминатор;
- фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в УФ;
- автоматические пипетки и наконечники.

5.4. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

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

5.5. Обезвреживание реагентов

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л 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 ч. Затем добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

5.6. Постановка

- 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 g

в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы, амплифицированные без минерального масла, не требуют подготовки;

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

– прибор для электрофореза наполняют 1× 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.

5.7. Учет результатов

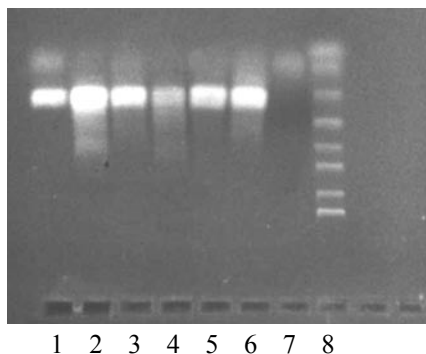
Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора, либо используют емкости из УФ-проницаемых материалов.

При постановке ОТ ПЦР для детекции мРНК β-актина положительные пробы должны содержать ампликон размером 493 п. н. Размер полосы определяют по соотношению с ДНК-маркером.

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 (рис. 2).

Рис. 2. Фотография амплифицированной РНК различных ЭВ с использованием гнездовой ПЦР в одной пробирке (электрофорез в 2% агарозном геле):
1 — Коксаки В1, 2 — Коксаки А9,
3 — ЕСНО 6, 4 — ЕСНО 11,
5 — ЕСНО 15, 6 — ЕСНО 20,
7 — отрицательный контроль,
8 — ДНК-маркер (Sigma)



6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕРДЦА

Осуществление вирусологической диагностики ЭВИС в соответствии со схемой, изложенной в данной инструкции, включает в себя комплекс диагностических процедур, позволяющих в конечном итоге сделать вывод о наличии либо отсутствии ЭВИС у конкретного больного. При этом ключевым фактором, определяющим установление диагноза ЭВИС, является адекватная интерпретация результатов, полученных на каждом этапе.

Положительный результат, полученный при проведении II этапа диагностики (обнаружение одного или двух серологических маркеров ЭВИ) свидетельствует о недавно перенесенной человеком ЭВИ, но не указывает на локализацию патологического процесса. Получение положительного результата при проведении повторных серологических исследований (с интервалом более 6 мес.) указывает на наличие в организме больного постоянного антигенного стимула в виде очага хронической ЭВИ и является показанием для проведения III этапа диагностики.

Положительный результат, полученный на III этапе (выявление хотя бы одного из диагностических маркеров: Аг или РНК ЭВ *in situ* в сердце), является прямым подтверждением у больного диагноза ЭВИС. В связи с тем, что ЭВИС может сопровождаться синтезом вирусных белков в клетках сердца на уровне, ниже детектируемого, необнаружение Аг ЭВ не свидетельствует об отсутствии ЭВИС. Положительный результат при ПЦР-исследовании тканей сердца указывает на присутствие РНК ЭВ *in situ* и является достаточным основанием для установления диагноза ЭВИС.

7. ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ОСУЩЕСТВЛЕНИИ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕРДЦА И ИХ УСТРАНЕНИЕ

7.1. Осложнения при проведении серологической диагностики и их устранение

При постановке реакций ИФА для диагностики антиэнтеровирусных IgM в сыворотке крови больного и Аг ЭВ в фекалиях с использованием коммерческих тест-систем необходимо четко

соблюдать условия постановки, изложенные в прилагаемой инструкции. Недопустимо повторное использование одноразовых наконечников для автоматических пипеток. Кроме того, чрезвычайно важно соблюдение условий и сроков хранения исследуемого материала (сыворотки крови хранят при -20°C в течение месяца, фекалии — только в обработанном виде (осветленная суспензия) при -20°C). При хранении материала желательно избегать его повторного замораживания — оттаивания.

7.2. Осложнения при определении присутствия антигенов энтеровирусов *in situ* методом иммунофлуоресценции и их устранение

Чтобы убедиться в достоверности положительного результата, полученного на данном этапе, необходимо исключить возможность неспецифических реакций. Для этого проверяют степень окрашивания:

- в качестве первого слоя вместо диагностических антисывороток к ЭВ наносят неиммунную сыворотку;
- проводят окрашивание препаратов без нанесения диагностических антиэнтеровирусных сывороток.

Результаты окрашивания должны быть отрицательными.

При наличии сильной фоновой флуоресценции используют более высокие разведения диагностических и/или антивидовой сывороток.

7.3. Осложнения при детекции генетического материала (РНК) энтеровирусов с помощью полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции 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 указывает на возможную деградацию РНК и/или внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения:

- при проведении данного этапа исследований необходимо использовать одноразовую стерильную пластиковую посуду и наконечники на всех стадиях постановки во избежание внесения

ингибиторов реакции;

– для разведения выделенной РНК применяется только обработанная ДЕПК вода во избежание загрязнения препарата РНКазы.

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

– соблюдение пространственного разделения рабочих зон (см. раздел 4.2);

– работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую;

– использование отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон.

8. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СЕРДЦА

Противопоказания для осуществления первичной вирусологической диагностики (детекция антиэнтеровирусных IgM в сыворотке крови и Ag ЭВ в фекалиях больных) отсутствуют.

Противопоказанием к проведению исследований тканей сердца иммуногистохимическими и молекулярно-биологическими методами является состояние больного, при котором противопоказано осуществление процедуры забора кардиальной биопсии.

9. ТАКТИКА ВЕДЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ПОДТВЕРЖДЕННОЙ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СЕРДЦА

При наличии у больного лабораторно подтвержденного диагноза ЭВИС рекомендуется совместное ведение таких больных врачом-кардиологом и инфекционистом с назначением ими этиопатогенетической терапии.