

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

Н.П. Жукова

2017 г.



Регистрационный №242-1215

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДТИПА ВИЧ-1 ПО УЧАСТКУ ГЕНА *pol*

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Авторы:

д.м.н. В.Ф. Еремин, к.б.н. Е.Л. Гасич, С.В. Сосинович, М.В. Домнич,
А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова
06.03.2017
Регистрационный № 242-1215

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДТИПА ВИЧ-1 ПО УЧАСТКУ ГЕНА POL

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук В.Ф. Еремин, канд. биол. наук Е.Л. Гасич,
С.В. Сосинович, М.В. Домнич, А.С. Немира, О.Л. Матлах

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод секвенирования участка гена *pol* ВИЧ-1, позволяющий определить подтип, под-подтип и рекомбинантные формы ВИЧ-1, найти филогенетические связи между вирусами (например, общий источник заражения), направление заноса вируса в страну. Метод, изложенный в настоящей инструкции, может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику ВИЧ-инфекции.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и врачей-эпидемиологов организаций, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови.
2. Морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже (-20) °С.
3. Прилавок с температурой (-70) °С.
4. Специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом.
5. Твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл от +25 °С до +100°С.
6. Микроцентрифуги (5000–12000 об./мин) под пробирки типа 1,5; 0,5 мл — 2 шт.
7. Центрифуга/вортекс (1500–3000 об./мин) под пробирки 0,5; 1,5 мл — 2 шт.
8. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема — 3 комплекта.
9. Амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой).
10. УФ-трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением.
11. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания.
12. Специализированные ПЦР-боксы (ламинарные шкафы) с бактерицидной лампой.
13. Халаты и одноразовые резиновые перчатки.
14. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5; 0,5 и 0,2 мл.
15. Штативы для микропробирок и наконечников.
16. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 10; 100; 200 и 1000 мкл.
17. Одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром до 10; 100; 200 и 1000 мкл.
18. Холодильники с рабочей температурой от +2 до +8 °С с морозильной камерой.

19. Емкости с дезинфицирующим раствором.
20. Наборы для выделения РНК.
21. Агароза.
22. 50 x ТАЕ буфер.
23. Дистиллированная вода.
24. 1 % раствор бромистого этидия.
25. Генетический анализатор.
26. Программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования.
27. Персональный компьютер (2).
28. Ацетат натрия.
29. Этиловый спирт.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Впервые выявленные случаи ВИЧ-инфекции.
2. ВИЧ-инфицированные ПИН.
3. Эпидрасследование случаев ВИЧ-инфекции.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

1. Забор материала и его транспортировка в ПЦР-лабораторию.

В качестве материала для исследований используется плазма крови. Забор крови производится путем венозной пункции общепринятыми методами. Получение плазмы крови осуществляют центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин.

Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в ПЦР-лабораторию по возможности непосредственно в день забора материала. Хранить плазму можно не более 1 недели при температуре от +18С до +25 °С и в течение 20 сут при температуре от +2С до +8 °С.

Транспортировка клинического материала должна осуществляться в соответствии с требованиями по перевозке биологического материала в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосах со льдом в течение 1 сут. Каждый образец для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

2. Основные правила безопасности.

2.1. Медицинские работники допускаются к работе после инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

2.2. Все работы проводятся в изолированных помещениях (зонах), аккредитованных для работы методом ПЦР. Посторонние лица в лабораторию не допускаются. Во время работы двери боксов и предбоксов должны быть закрыты; выход из бокса во время работы запрещается.

2.3. При работе обязательно использование сменных медицинских халатов, сменной обуви, защитных масок и перчаток. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде.

2.4. Работа с ДНК проводится в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

2.5. При работе с патогенным материалом следует выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

2.6. Все исследования проводят в зонированных изолированных помещениях:

Зона 1 — выделение РНК;

Зона 2 — проведение обратной транскрипции (далее — ОТ) и ПЦР;

Зона 3 — очистка полученных фрагментов и проведение секвенирующей ПЦР;

Зона 4 — секвенирование полученных фрагментов.

Каждая зона содержит свой набор оборудования и расходных материалов. При переходе из одной зоны в другую следует менять халаты, перчатки. Потенциально основной источник контаминации РНКазми — руки исследователя. Необходимо надевать и менять перчатки.

Перед началом работы проводят обработку пола, стен, мебели боксового помещения дезинфицирующими средствами и облучение ультрафиолетом за 1 ч до начала работы в течение не менее 30 мин. Рабочее пространство ламинарного шкафа и автоматические дозаторы перед работой обрабатывают с использованием спиртосодержащих антисептиков и ультрафиолетовых облучателей в течение не менее 30 мин.

3. Получение фрагментов РНК ВИЧ для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

3.1. Выделение РНК/ДНК ВИЧ

Для выделения РНК/ДНК ВИЧ используются коммерческие наборы, предназначенные для выделения РНК/ДНК любого производителя. Выделяют согласно инструкции, прилагаемой к набору.

3.2. Проведение реакции

3.2.1. Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ для участка гена *pol* (1824 → 2611) проводят в объеме 10 мкл по следующей прописи: 5x RT-буфер — 2,0 мкл, рэндом праймер или праймер *pol-11R* 1,0 мкл (0,2 мМ), смесь трифосфатов 0,4 мкл (25 мМ), ингибитор РНКаз — 0,25 мкл (40 Ед), обратная транскриптаза — 1,0 мкл (20 Ед), РНК — 3 мкл, бидистиллированная вода — 2,35 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводят в следующем режиме: +25 °С — 10 мин; 60 °С — 60 мин; 70 °С — 10 мин; 10 °С — хранение до 1 недели.

3.2.2 Амплификация

Первый раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК.

2. Праймер *pol-9F*, 20 мМ.

3. Праймер *pol-11R*, 20 мМ.

4. Деионизированная вода.

5. ПЦР-буфер, 10x.

6. MgCl₂, 25 mM.
7. Смесь дНТФ, 25 mM.
8. Taq-полимераза, 5 U/мкл.

Протокол реакции: для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток приготовить ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

№№ п/п	Компонент	Объем, x1 образец	Конечная концентрация
1	Деионизированная вода	16,6 мкл	-
2	ПЦР-Буфер	2,5 мкл	1 x
3	MgCl ₂	2 мкл	2 mM
4	Праймер pol-9F	0,25 мкл	0,4 mM
5	Праймер pol-11R	0,25 мкл	0,4 mM
6	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 mM
7	Taq-полимераза	0,2 мкл	0,625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 22 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Добавить 3 мкл исследуемой кДНК после реакции ОТ в каждую пробирку. Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин 10–15 с.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси — 25 мкл.

Программа амплификации:

- 95 °C 5 мин
- 95 °C 30 с
- 60 °C 30 с 40 циклов
- 72 °C 1 мин
- 72 °C 7 мин
- 4 °C хранение



После 1-го раунда ПЦР пробирки поместить в специальный штатив и оставить в зоне 3 при +4 °C (не более 12 ч) либо оставить на хранение при температуре от -25 до -15 °C не более 1 недели. Пробирки готовы к проведению второго раунда ПЦР («гнездовая» ПЦР).

Второй раунд

Компоненты ПЦР:

1. кДНК.
2. Праймер pol-7F, 20 mM.
3. Праймер pol-11R, 20 mM.
4. Деионизированная вода.
5. ПЦР-буфер, 10x.
6. MgCl₂, 25 mM.
7. Смесь дНТФ, 25 mM.
8. Taq-полимераза, 5 U/мкл.

Протокол реакции: для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, приготовьте ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец.

№№ п/п	Компонент	Объем, х1 образец	Конечная концентрация
1	Деионизированная вода	17,4 мкл	-
2	ПЦР-буфер	2,5 мкл	1 х
3	MgCl ₂	2 мкл	2 мМ
4	Праймер rol-7F	0,4 мкл	0,2 мМ
5	Праймер rol 11R	0,30 мкл	0,2 мМ
6	Смесь дНТФ	0,2 мкл	0,2 мМ
7	Тақ-полимераза	0,2 мкл	0,625 Ед

Аккуратно перемешать ПЦР-смесь, кратко осадить.

Добавить по 23 мкл ПЦР-смеси в пробирки объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца. Добавить 2 мкл исследуемой ДНК после первого раунда ПЦР в каждую пробирку.

Аккуратно перемешать смесь на вортексе, осадить центрифугированием при 6000 об./мин 10–15 с.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси — 25 мкл.

Программа амплификации:

95 °С 5 мин

95 °С 30 с

60 °С 30 с 35 циклов

72 °С 1 мин

72 °С 7 мин

4 °С хранение



3.2.3. Электрофорез продуктов амплификации

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием бромида этидиума в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля — 1,8 % (рисунок 1).

Буфер для электрофореза — 0,5 %.

Tris [оксиметил]аминометан (Tris).

Борная кислота.

Na₂EDTA.

Объем ДНК для электрофореза — 5 мкл.

Объем загрузочного буфера — 1 мкл.

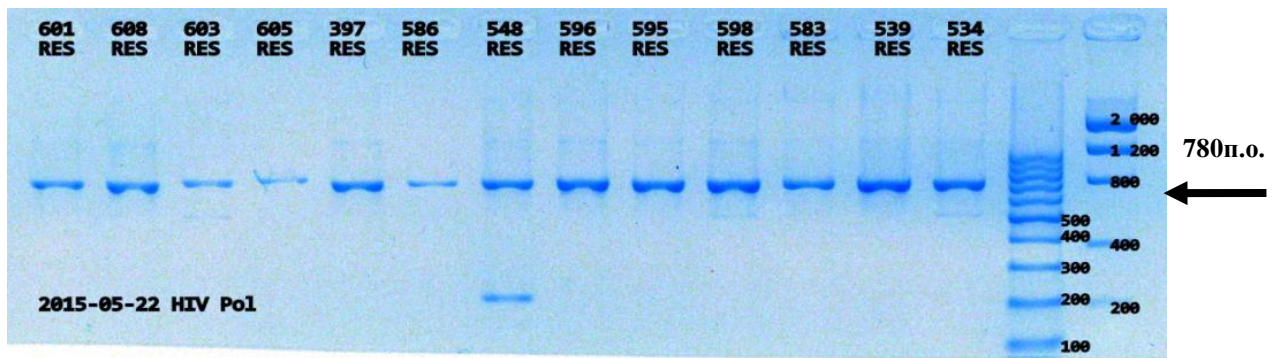


Рисунок 1. — Электрофорез продуктов ПЦР после первого раунда

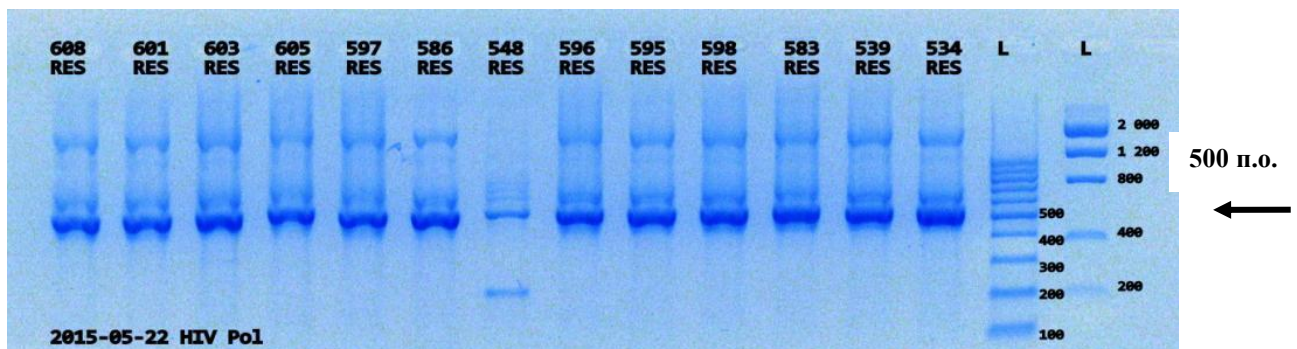


Рисунок 2. — Электрофорез продуктов ПЦР после второго раунда

4. Очистка продуктов амплификации

Очистка продуктов амплификации осуществляется на колонках для очистки ДНК.

5. Секвенирующая ПЦР

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

ддН ₂ О	4 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5x буфер	7 мкл
Bigdye Terminator	1 мкл
ДНК	4 мкл
Общий объем 20 мкл	

Секвенирующую ПЦР проводят в следующем режиме:

96 °С 10 с

96 °С 10 с

50 °С 5 мин

72 °С 4 мин

4 °С — хранение

25 циклов

Аmplифицированные пробы очищаются методом преципитации, вносится 20 мкл HiDi Formamid и пробы загружаются в генетический анализатор.

6. Анализ полученных результатов и построение филогенетического дерева по участку гена pol в соответствии с рисунком 3.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных: SeqScape, BioEdit, MEGA 6 и/или аналогичные компьютерные программы.

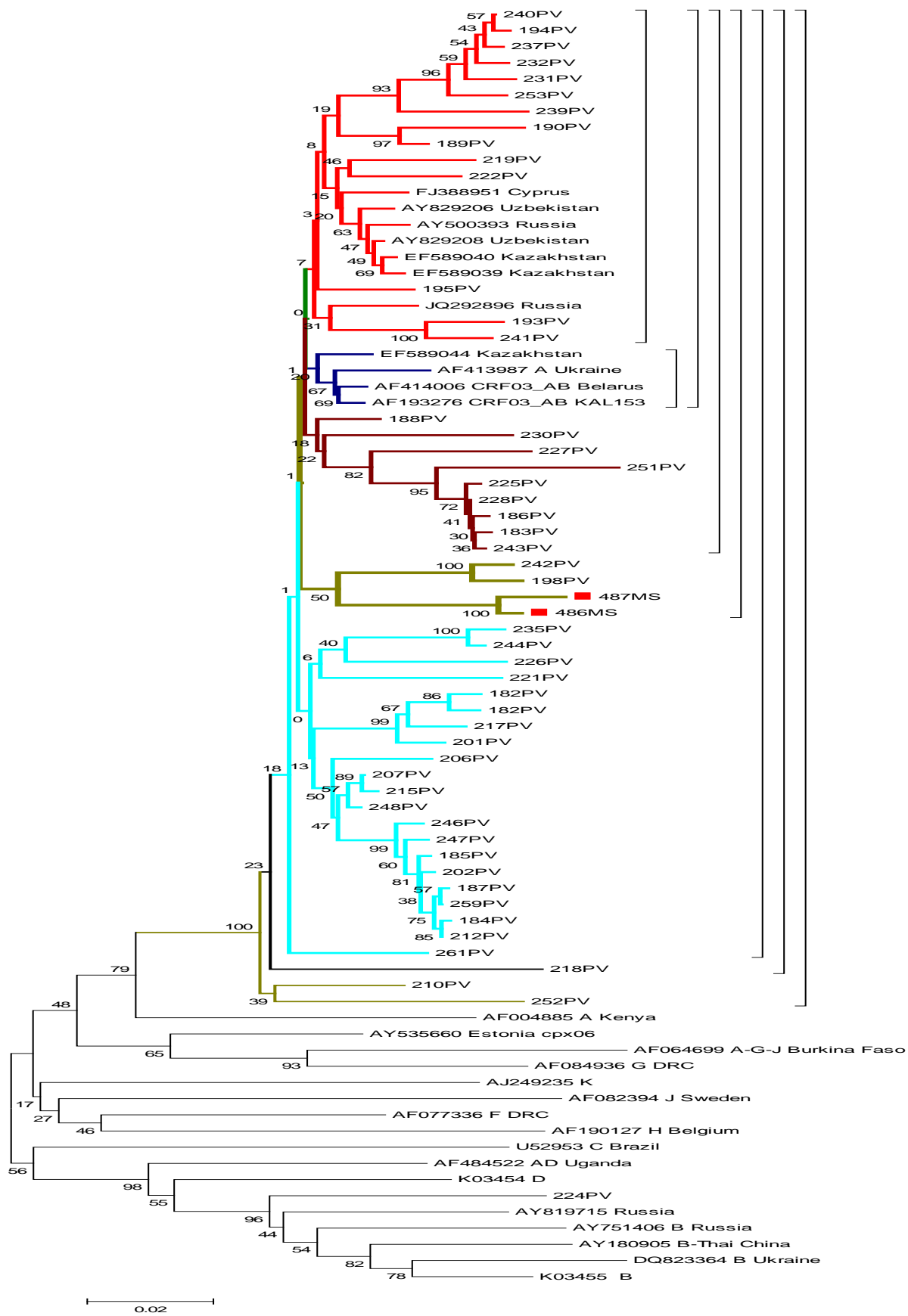


Рисунок 3. — Филогенетическое дерево ВИЧ-1 по участку гена pol