

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л. Пиневич

2014 г.

№251-1213

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДТИПА ВИЧ-1

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

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

Авторы:

**д.м.н. В.Ф. Бремян, к.б.н. Е.Л. Гасич, С.В.Сосинович, Е.А.Шишкин,
Е.А.Нестеровская, М.В.Домнич, О.Н.Суетнов**

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) представлен метод секвенирования участков генов env и gag ВИЧ-1, позволяющего определить субтип ВИЧ-1, найти филогенетические связи между вирусами (например, общий источник заражения), направление заноса вируса в страну.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов и врачей-эпидемиологов.

1. КОНТИНГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ МОНИТОРИНГУ

1. Впервые выявленные случаи ВИЧ-инфекции;
2. Пациенты на ВААРТ, не отвечающие на терапию;
3. ВИЧ-инфицированные ПИН из одного региона;

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ

1. вакутайнеры с ЭДТА с переходником для забора крови;
2. морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже -20°C ;
3. прилавок с температурой -70°C ;
4. специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом;
5. твердофазный термостат для пробирок объемом 1,5 мл, $25-100^{\circ}\text{C}$;
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 $+2-8^{\circ}\text{C}$ с морозильной камерой;
19. емкости с дезинфицирующим раствором;
20. наборы для выделения РНК;
21. агароза;
22. 50 x TAE 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.

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

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

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

Правила транспортировки и хранения материала. Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в лабораторию в ПЦР-лабораторию по возможности непосредственно в день забора материала. Хранить плазму можно не более 1 недели при температуре от 18 до 25°C и в течение 20 суток при температуре плюс 2-8 °C и до года при температуре минус 16-25 °C.

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

3.2 Основные правила безопасности.

3.2.1 Персонал допускается к работе только после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

3.2.2 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 проведения работы запрещается.

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

3.2.4 Работа с ДНК должна проводиться в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

3.2.5 При работе с патогенным материалом следует четко выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» (постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

3.2.6 Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

Зона 1 – выделение РНК;

Зона 2 – проведение 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 РНКазами – руки исследователя. Необходимо одевать и менять перчатки.

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

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

4.1. Выделение РНК/ДНК ВИЧ.

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

4.2. Проведение реакции.

4.2.1 Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию для получения кДНК ВИЧ для участков генов gag (p17/p24) и env (участок петли V3 gp120) проводят в объеме 20 мкл по следующей прописи: 5x РТ-буфер – 4,0 мкл, обратный праймер (3'VNOT-для гена env и SK 39 для гена gag) 0,5 мкл, смесь трифосфатов 1,0 мкл (10mM), ингибитор РНКаз – 0,5 мкл, обратная транскриптаза – 1,0 мкл, РНК-10мкл, бидистиллированная вода – 2,5 мкл. Реакцию обратной транскрипции проводят в следующем режиме: 42°C – 60 мин; 70°C – 15 мин. После проведения 1-го раунда ПЦР пробирки поместить в специальный штатив и оставить в зоне 3 при плюс 4°C. Пробирки готовы к проведению второго раунда ПЦР («гнездовая» ПЦР).

4.2.2 Амплификация

Полимеразную цепную реакцию в «гнездовом» варианте проводят на амплификаторе любого производителя в два этапа в объеме 25мкл по следующей прописи:

1 этап.

Для генотипирования по гену env:

Реагенты	ПЦР	Исходная концентрация	мкл/обр
ддН ₂ О			16,8
дНТП	200uM	100mM	2,5
праймер A0909	0,5μM	10 uM	0,25
праймер3'V3NOT	0,5μM	10 uM	0,25
10xбуфер	1x	10x	2,5
MgCl ₂	2 mM	100 mM	0,5
Taq полимераза	1 U	5U/μl	0,2
Образец			2

Для генотипирования гена по гену gag:

Реагенты	ПЦР	Исходная концентрация	мкл/обр
ддН ₂ О			16,8
дНТП	200μM	100mM	2,5
праймер А0309	0,5μM	10 μM	0,25
праймер SK39	0,5μM	10 μM	0,25
10хбуфер	1х	10х	2,5
MgCl ₂	2 mM	100mM	0,5
Тақ полимераза	1 U	5U/μl	0,2
Образец			2

ПЦР проводят в следующем режиме:

1. 95°C 3'
 2. 95°C 30"
 3. 55°C 30"
 4. 72°C 2'
 5. 72°C 10'
 6. 4°C - хранение
- } 35 циклов

2 этап. Для 2 раунда используется ДНК после 1 раунда. Состав реакционной смеси для генотипирования по гену env:

Реагенты	ПЦР	Исходная концентрация	мкл/обр
ддН ₂ О			17,0
дНТП	200 μM	100 μM	0,4
праймер А0627	1 μM	100 μM	0,25
праймер А0624	1 μM	100 μM	0,25
10хбуфер	1х	10х	2,5
MgCl ₂	2,5 mM	100 mM	0,4
Тақ полимераза	1 U	5U/μl	0,2
Образец			2

По гену gag:

Реагенты	ПЦР	Исходная концентрация	мкл/обр
ддН ₂ О			17,0
дНТП	200 μM	100 μM	0,4
праймер A0492-	1 μM	100 μM	0,25
праймер A0491-2	1 μM	100 μM	0,25
10xбуфер	1x	10x	2,5
MgCl ₂	2,5 mM	100 mM	0,4
Taq полимераза	1 U	5U/μl	0,2
Образец			2

ПЦР проводят в следующем режиме:

1. 95°C 3'
 2. 95°C 30"
 3. 55°C 30"
 4. 72°C 2'
 5. 72°C 10'
 6. 4°C - хранение
- } 25 циклов

Размер амплифицированного продукта для гена env 380 п.н., для гена gag -750 п.н.

4.3 Учет результатов проводят в 2,% агарозном геле.

Учет результатов проводится визуально. Молекулярная масса продуктов ПЦР определяется согласно молекулярной массе ДНК-маркера.

Специфический продукт ДНК при проведении ПЦР в «гнездовом» варианте для env-гена ВИЧ имеет размер фрагмента, равный 380 пар нуклеотидов, для gag: 750 пар нуклеотидов (рис. 1).

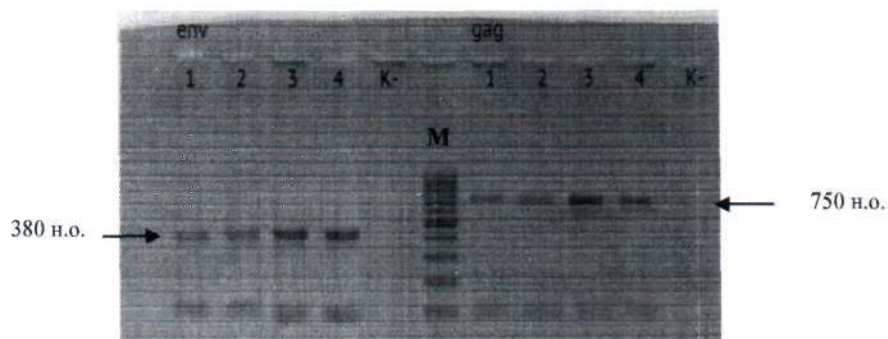


Рисунок 1 - Анализ продуктов ПЦР фрагментов ДНК ВИЧ-1 по участкам генов env и gag, где №1-4 – анализируемые пробы, К- отрицательный контроль, М – маркер.

5. Очистка полученных фрагментов с использованием коммерческих наборов для очистки продуктов ПЦР.

С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Состав реакционной смеси:

ддН ₂ O	4 мкл
праймер прямой и обратный	4 мкл
5xбуфер	7 мкл
Bigdye Terminator	1 мкл
ДНК	4 мкл
Общий объем 20 мкл	

Секвенирующую ПЦР проводят в следующем режиме:

96°C 10 сек
96°C 10 сек
50°C 5 мин
72°C 4 мин
4°C - хранение

} 25 циклов

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

6. Проведение анализа полученных результатов по определению генотипа вируса и его филогенетических связей.

Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей и определения их филогенетических связей используются стандартные программы, предназначенные для обработки полученных данных типа SeqScape, BioEdit, MEGA 4.

Использование молекулярно-генетических методов позволяет проводить постоянный молекулярно-эпидемиологический мониторинг за циркуляцией ВИЧ на территории страны, определять субтипы ВИЧ и его рекомбинантные формы, установить родственные связи с целью выявления источников инфицирования и направлений заноса вируса, совершенствовать систему профилактических мероприятий, направленных как на сокращение появления новых случаев инфицирования, так и предотвращения их распространения.

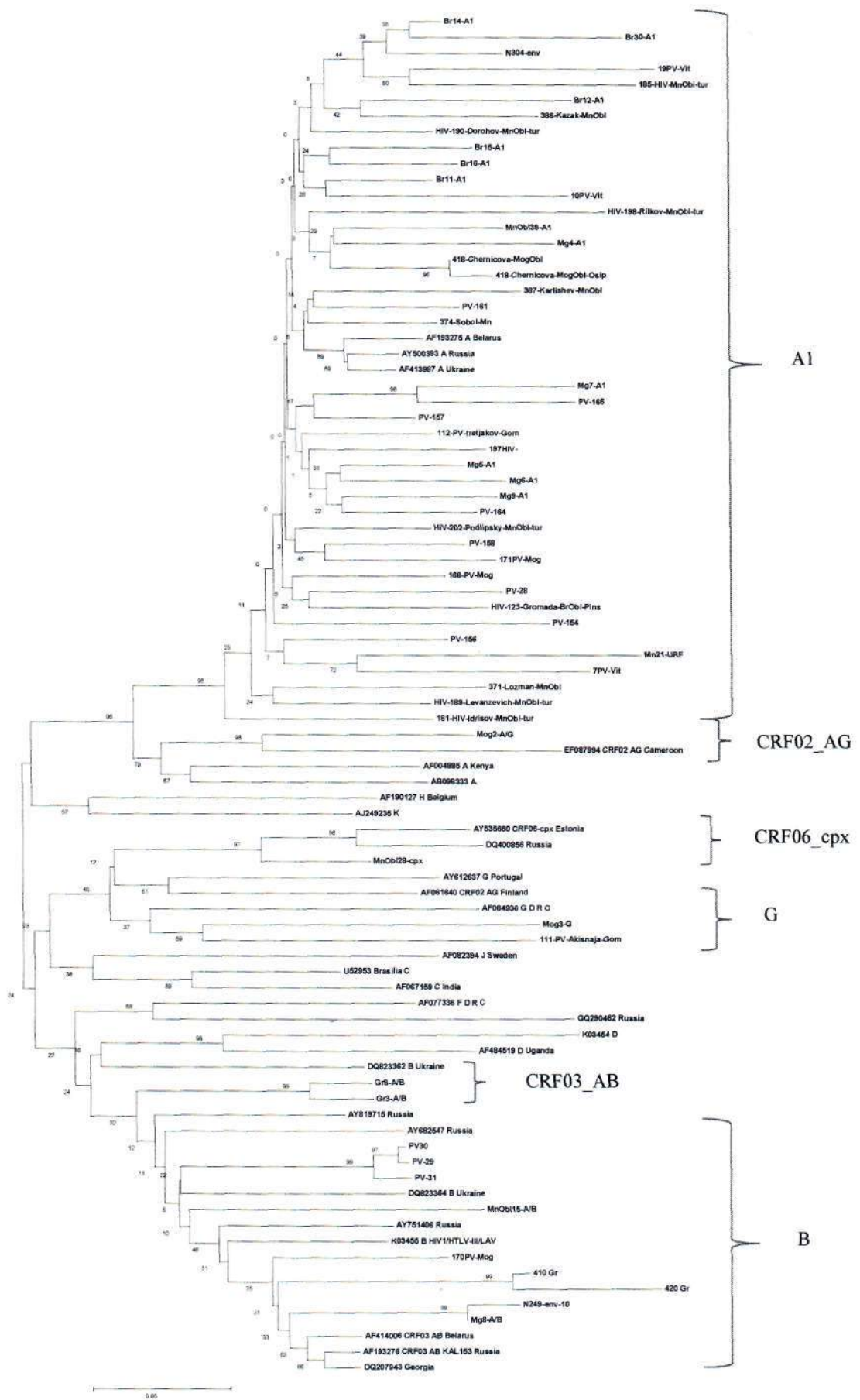


Рисунок 2 - Филогенетический анализ образцов ВИЧ по гену env