

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н. Кроткова

« 15 » 05 2023 г.

Регистрационный № 017-0223



**МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА
ГЕПАТИТА Е**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

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

Минск, 2023

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВНQ1	- гаситель флуоресценции
FAM	- карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель (520 нм)
ВГЕ	- вирус гепатита E
ГЕ	- гепатит E
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксинуклеотидтрифосфат
кДНК	- комплементарная ДНК
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- ПЦР с обратной транскрипцией
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	- ПЦР в режиме реального времени
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 в режиме реального времени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику гепатита Е.

Инструкция на метод разработана в соответствии с санитарными нормами и правилами «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов» утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 № 11.

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Выявление РНК ВГЕ применяется при обращении за медицинской помощью:

пациентов, инфицированных вирусом гепатита неустановленной этиологии в целях дифференциальной диагностики острого гепатита;

лиц, которые в пределах инкубационного периода находились в эндемичных по ВГЕ странах;

лиц, которые были в контакте с пациентом с установленным клиническим диагнозом «Вирусный гепатит Е».

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимых медицинских изделий.

1. Программируемый термоциклер (амплификатор) для проведения ПЦР-РВ в комплекте с компьютером и программным обеспечением для управления прибором, хранения данных и анализа.
2. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
3. ПЦР-бокс.
4. Высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5-2,0 мл не менее 10 000 g.
5. Блендер (гомогенизатор) с погружным тефлоновым пестиком.
6. Микроцентрифуга вортекс.
7. Твердотельный термостат для микропробирок 1,5 мл и 2,0 мл.
8. Холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (-20°C).
9. Дозаторы переменного объема (1-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл).
10. Штативы для наконечников 10 мкл, 200 мкл и 1000 мкл.
11. Штативы для ПЦР-пробирок 0,2 мл.
12. Штативы для пробирок 1,5 мл и 2,0 мл.
13. Емкость для сброса использованных наконечников.

Перечень расходных материалов.

1. Вакуумные пробирки для отбора крови с ЭДТА (фиолетовый цветовой код).
2. Одноразовые пробирки для ПЦР 0,2 мл с оптическими крышками россыпью или объединенные в стрипы по 8 штук. Допускается использование микропланшетов для ПЦР с оптической пленкой.

3. Одноразовые пробирки 1,5 и 2,0 мл.
4. Одноразовые наконечники с фильтрами до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
5. Одноразовые неопудренные перчатки.

Перечень реактивов.

1. Набор реагентов для выделения РНК из биологического материала, основанный на применении колонок с сорбирующей мембраной.
2. Набор реагентов для проведения обратной транскрипции.
3. Набор реагентов, включающих готовую смесь для проведения ПЦР-РВ.
4. Набор олигонуклеотидных праймеров и зонд (в соответствии с последовательностями, указанными в таблице 1).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

1. ПЦР-РВ с обратной транскрипцией используется для выделения известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы РНК вируса, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР-РВ. В ПЦР-РВ используют два праймера для установления точек начала и окончания амплифицируемой последовательности кДНК и ДНК-зонд с флуорохромом и гасителем флуоресценции, необходимый для визуализации положительного результата реакции.

2. Все работы (выделение РНК из образцов биологического материала, проведение ПЦР и детекция продуктов амплификации) проводятся в отдельных помещениях согласно инструкции по применению от 13.11.2008 г. № 090-1008 «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)».

3. **Отбор и подготовка биологического материала.**

3.1. Биологическим материалом, используемым в рамках настоящего метода, являются образцы крови, мочи, фекалий, либо образцы органов и тканей, полученные в результате биопсии (аутопсии).

3.2. Отбор биологического материала проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 10.11.2015 г. № 1123 «Об утверждении Инструкции о порядке организации преаналитического этапа лабораторных исследований».

3.3. При работе с образцами биологического материала необходимо соблюдать меры безопасности как при работе с потенциально инфицированным материалом.

3.4. Отбор крови осуществляется в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА).

3.5. Из образцов фекалий готовится 10-20% осветлённый экстракт. Для этого к образцам фекалий, находящимся в специальных ёмкостях для отбора и хранения или в иной таре, добавляют физраствор в количестве 1 к 5-9 частям фекалий. Взвесь интенсивно встряхивают на вортексе, 1 мл суспензии переносят в микро пробирки и центрифугируют в течение 2-5 мин. при 3000 об./мин. Над осадочная жидкость используется для выделения РНК.

3.6. Образцы органов и тканей, полученных в результате биопсии (аутопсии), обрабатывают также, как в п. 2.5., предварительно измельчив их блендером (гомогенизатором) с тефлоновым пестиком и ступкой.

4. Выделение РНК.

4.1. Выделение РНК проводят с использованием набора реагентов для выделения РНК из биологического материала, основанного на применении колонок с сорбирующей мембраной. Специальные критерии к степени очистки, получаемых фракций РНК не предъявляются. Допускается наличие примесей ДНК в получаемых образцах.

4.2. Выделение РНК проводят в соответствии с алгоритмом действий, изложенным в инструкции по применению производителя набора реагентов.

4.3. Полученные фракции РНК сразу же используются для постановки реакции обратной транскрипции.

5. Постановка реакции обратной транскрипции.

5.1. Реакцию обратной транскрипции проводят при помощи набора реагентов, который включает буферный раствор и фермент ДНК-полимеразу, основанного на использовании случайных гексамеров, но не специфических праймеров.

5.2. Для проведения одной реакции обратной транскрипции следует использовать 10 мкл общей фракции РНК.

5.3. Реакцию обратной транскрипции проводят в соответствии с алгоритмом действий, изложенным в инструкции по применению производителя набора реагентов для проведения этой реакции.

5.4. После окончания реакции обратной транскрипции, штатив с пробирками помещается в холодильник до проведения следующего этапа. Допускается длительное хранение образцов при температуре (-18°C).

5.5. Допускается транспортировка образцов кДНК при температуре окружающей среды не выше ($+35^{\circ}\text{C}$) в течение 2-4 часов или при температуре в емкости с образцами не выше ($+12^{\circ}\text{C}$) в течение 24 часов.

6. Постановка реакции ПЦР-РВ.

6.1. ПЦР-РВ проводят с использованием набора реагентов, содержащего готовую смесь, включающую все необходимые компоненты для проведения реакции и обеспечивающие детекцию распада флуоресцентных зондов в ходе ПЦР-РВ (5' – 3' экзонуклеазная активность).

6.2. В реакции ПЦР-РВ используют набор олигонуклеотидных праймеров и зонд, обеспечивающих специфичность реакции и выявление нуклеотидной последовательности, характерной для РНК ВГЕ, который изготавливается по заказу.

6.3. Последовательности олигонуклеотидов для проведения ПЦР-РВ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные последовательности праймеров и зонда, используемые для ПЦР-РВ

Последовательность	Направление	Позиция в геноме*
5' – GCRGTGGTTTCTGGGGTG – 3'	Прямой	5259-5277
5' – FAM – GGYTGATTCYCAGCCCTT – BHQ1 – 3'	Зонд	5280–5298
5' – AAGGGGTTGGTTGGATGA – 3'	Обратный	5314–5332

*– нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму ВГЕ *Virma* (номер в базе данных GenBank M73218)

6.4. Олигонуклеотиды должны поставляться в лиофилизированном виде в защищенной от света упаковке.

6.5. Каждый олигонуклеотид и зонд растворяют отдельно в воде для ПЦР. Готовят растворы с конечной концентрацией равной 500 нМ (10 - 12 пикомоль/мкл при условии использования конечного объема смеси 25 мкл).

6.6. Реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ готовят в соответствии с алгоритмом действий, изложенным в инструкции по применению производителя набора реагентов для проведения этой реакции.

6.7. Готовая реакционная смесь перемешивается на вортексе, центрифугируется для осаждения капель и разливается по 15 мкл в каждую пробирку для ПЦР.

6.8. В каждую пробирку для ПЦР отдельными наконечниками с фильтрами вносится по 10 мкл образца кДНК. После внесения образца пробирки сразу помещаются в амплификатор, запрограммированный на режим ПЦР (таблица 2).

Таблица 2 – Программа амплификации ПЦР-РВ

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация первичная	95	2 мин.	1
Денатурация	95	10 сек.	50
Отжиг/элонгация с детекцией по каналу FAM	57	59 сек.	

6.9. После окончания амплификации все ПЦР-пробирки извлекаются из амплификатора и утилизируются без вскрытия.

7. Учет результатов ПЦР-РВ.

7.1. Учет результатов ПЦР-РВ проводится по каналу FAM после окончания реакции.

7.2. Результаты ПЦР-РВ следует считать валидными, в случае соблюдения следующих условий (рисунок 1):

7.2.1. уровень флуоресценции положительной контрольной пробы превысил значение пороговой линии до 40 цикла (выставляется автоматически или вручную исходя из 10% от максимального уровня флуоресценции положительной контрольной пробы);

7.2.2. уровень флуоресценции отрицательной контрольной пробы не пересек пороговую линию до 40 цикла амплификации;

7.2.3. рост уровня флуоресценции отрицательной контрольной пробы не выявлен или детектирован после 40 цикла.

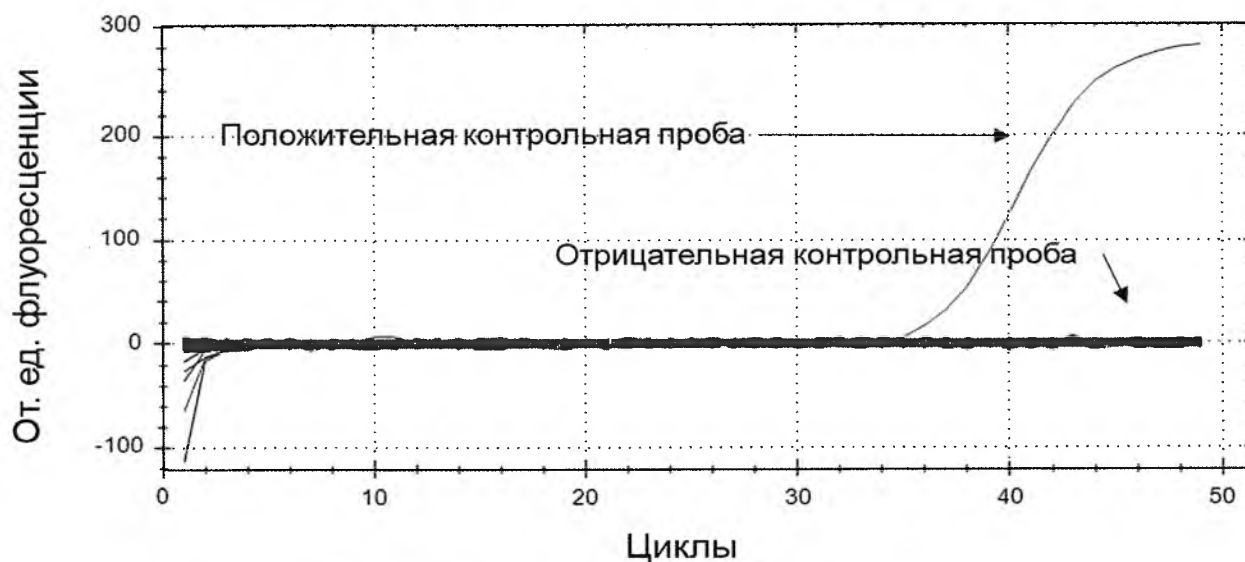


Рисунок 1 – Критерии учета результатов ПЦР-РВ

7.3. Учет результатов качественной ПЦР-РВ.

7.3.1. Реакция качественной ПЦР-РВ считается положительной в следующих случаях (рисунок 2):

7.3.2. кривые флуоресценции анализируемых образцов пересекают пороговую линию;

7.3.3. рост уровня флуоресценции анализируемых образцов зарегистрирован, например, анализируемый образец №3 – 22 цикл амплификации, анализируемый образец №5 – 32 цикл амплификации.

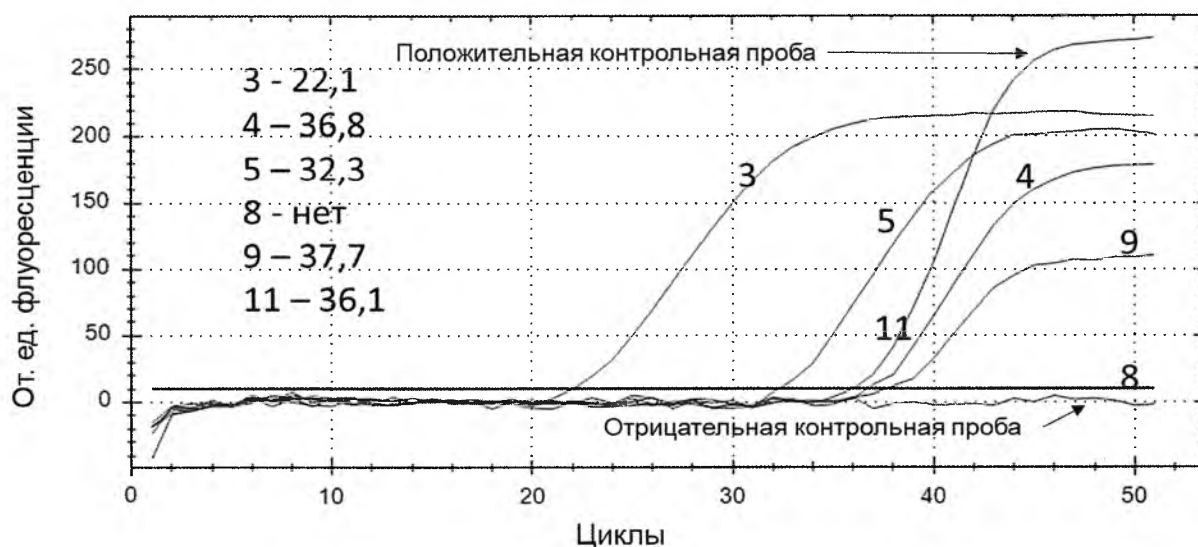


Рисунок 2 – Пример визуализации и учета результатов ПЦР-РВ

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки проведения исследования представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Отсутствие роста флуоресценции в контрольных образцах

Причина	Пути устранения
Отсутствие РНК или разрушение РНК в процессе хранения	Убедиться в наличии кДНК в образце. При отсутствии, низкой концентрации, высокой степени загрязнения выделить РНК повторно и провести реакцию обратной транскрипции для положительного контроля.
Разрушение реагентов	Большинство реагентов чувствительны к повторному замораживанию-оттаиванию, поэтому реагенты рекомендуется аликвотировать.
Неверно установленная программа амплификации	Установить программу амплификации согласно настоящей инструкции.

Таблица 4 - Наличие неспецифических продуктов реакции

Причина	Пути устранения
Контаминация, неспецифический рост, иное	<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 УФО-дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.</p> <p>Использование верифицированных положительного и отрицательного контролей.</p>