Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация молекулярно-генетических исследований биологического материала из природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Методические указания
МУК 4.2.2494—09

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация молекулярно-генетических исследований биологического материала из природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Методические указания
МУК 4.2.2494—09

ББК 51.9
О64

О64 **Организация** молекулярно-генетических исследований биологического материала из природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—16 с.

ISBN 978—5—7508—0836—6

1. Разработаны ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (А. Е. Платонов, С. Б. Гаранина, В. И. Журавлев, Г. А. Шипулин), ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (Е. А. Ткаченко, Т. К. Дзагурова), ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области (Д. В. Транквилевский), Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю. В. Дёмина, Н. Д. Пакскина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 марта 2009 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко и введены в действие 1 июня 2009 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Н. В. Кожока, Е. В. Николаева
Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 28.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,00

Тираж 500 экз. Заказ 106

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр.5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Общие положения 5
4. Сбор, хранение и транспортирование материалов, предназначенных для исследования молекулярно-генетическими методами 6
5. Рекомендуемые наборы реактивов, оборудования и расходных материалов для проведения анализа методом ПЦР 9
6. Схема проведения ПЦР-исследований полевого и клинического материала на наличие хантавирусов 9
7. Генотипирование хантавирусов и интерпретация полученных результатов 12
Список сокращений 14
Приложение 1. Координаты Референс-центра, осуществляющего дополнительное подтверждающее тестирование и генотипирование вирусов комплекса ГЛПС 14
Приложение 2. Перечень сертифицированных диагностических тест-систем, используемых для подтверждения диагноза ГЛПС у больных людей и проведения скрининговых исследований на наличие хантавирусного антигена у носителей хантавирусной инфекции 15
Приложение 3. Перечень наборов реактивов, рекомендуемых для проведения молекулярно-генетических исследований биологического материала на ГЛПС 15
Приложение 4. Наборы олигонуклеотидных праймеров, рекомендуемые в молекулярно-генетических исследованиях по определению генотипов хантавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации 16

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
1 апреля 2009 г.
Дата введения: 1 июня 2009 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация молекулярно-генетических исследований биологического материала из природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Методические указания МУК 4.2.2494—09

1. Область применения

1.1. Методические указания предназначены для использования специалистами органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами лечебно-профилактических организаций, научно-исследовательских институтов и других заинтересованных организаций.

1.2. В настоящих методических указаниях определены основные правила сбора полевого и клинического материала, предназначенного для анализа на хантавирусы методом ПЦР. Описаны порядок упаковки, хранения, транспортирования и выполнения лабораторных исследований биологических образцов, заражённых или подозрительных на заражённость хантавирусами. Предложены унифицированные методические подходы для проведения молекулярно-генетических исследований по генотипированию хантавирусов.

2. Нормативные ссылки

2.1. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.2. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

2.3. МУ 3.1.1029—01 «Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций».

2.4. МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

2.5. СП 3.1.099—96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом».

3. Общие положения

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – вирусный нетрансмиссивный зооноз, широко распространенный в Евразии, а в России занимающий первое место по заболеваемости среди природноочаговых инфекций. Возбудители ГЛПС – вирусы Пуумала, Хантаан, Сеул, Добрава и Амур – относятся к роду *Hantavirus* (семейство *Bunyaviridae)*, который включает в настоящее время более 30 различных хантавирусных серотипов или генотипов. Большинство из них являются патогенными для человека. Хантавирусы эволюционно тесно связаны с определенными видами грызунов из семейств *Arvicolinae* и *Murinae* (полевки, мыши, крысы). Вирусы передаются преимущественно респираторным путем, а источником заражения людей служат теплокровные носители, выделяющие вирус с экскретами во внешнюю среду.

На территории России эпидемически активные очаги ГЛПС расположены в основном в умеренных широтах европейской части и на Дальнем Востоке. Более 95 % случаев заражения ГЛПС происходят в европейских очагах, приуроченных к лесным ландшафтам. Здесь циркулирует хантавирус Пуумала, основным резервуаром которого в природе является европейская рыжая полевка (*Myodes glareolus*). Наиболее активная очаговая территория расположена в оптимуме ареала рыжей полевки – в широколиственных и хвойно-широколиственных лесах Приуралья и Среднего Поволжья. Почти 90 % всех зарегистрированных случаев заражения ГЛПС в Российской Федерации приходится на Приволжский федеральный округ. В дальневосточных регионах России ГЛПС вызывается хантавирусами Хантаан, Амур и Сеул, природным резервуаром которых являются полевая мышь *(Apodemus agrarius)*, восточно-азиатская мышь *(Apodemus peninsulae)* и серая крыса *(Rattus norvegicus)* соответственно.

Полученные в последнее десятилетие данные существенно меняют сложившиеся представления об этиологической природе заболеваемости ГЛПС на европейской части России, где ранее все случаи заражения ГЛПС связывали с вирусом Пуумала.

В ходе комплексных клинико-эпидемиологических, эпизоотологических и лабораторных исследований были выявлены природные очаги,

где циркулируют ранее не известные, высоко патогенные для человека вирусы-возбудители ГЛПС, относящиеся к двум иммунологически и генетически отличающимся подтипам вируса Добрава. Один из них обнаружен в популяции кавказской лесной мыши (*Apodemus ponticus*) в субтропической зоне Краснодарского края (Большой Сочи), другой – у полевых мышей (*Apodemus agrarius*) в центральных областях европейской части России. Установлено, что штаммы из этих регионов имеют существенные биологические отличия, характеризуются значительной генетической разнородностью и различным уровнем вирулентности.

В последние годы были обнаружены новые природные очаги вируса Добрава на территории Самарской, Астраханской и Омской областей. Однако окончательный вывод об ареале подвидов вируса Добрава и нозоареале ГЛПС-ДОБ на территории России можно будет сделать лишь после проведения более широких исследований.

Многообразие клинических проявлений, а также существование стертых и атипичных клинических форм при ГЛПС нередко затрудняет дифференциальную диагностику болезни, в связи с чем для верификации диагноза необходимы лабораторные исследования. Для специфической диагностики ГЛПС в России широко применяются 2 вида диагностикумов: для проведения непрямого МФА (для серодиагностики ГЛПС у больных) и ИФА для выявления хантавирусного антигена.

В свете задач по совершенствованию специфической диагностики ГЛПС, повышения качества и эффективности проводимых исследований, своевременного реагирования в случае возникновения эпидемических проявлений хантавирусных инфекций на территории Российской Федерации, актуальным является более широкое применение молекулярно-генетических методов. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является практически единственным методом, позволяющим осуществлять прямую детекцию хантавирусов в полевом и клиническом материале. Преимущества молекулярно-генетических методов приобретают особое значение при изучении хантавирусов, поскольку эти вирусы плохо размножаются в клеточных культурах, не обладают цитопатическим действием и не имеют удачной лабораторной модели инфекции. В некоторых случаях геном хантавирусов был охарактеризован задолго до того, как были выделены хантавирусные штаммы, либо, когда выделение вируса вовсе не представлялось возможным.

4. Сбор, хранение и транспортирование материалов, предназначенных для исследования молекулярно-генетическими методами

4.1. Мониторинг за возбудителями ГЛПС, исследование биологического материала иммунологическими методами проводят на базе фе-

деральных государственных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации. Проведение ПЦР – осуществляется в специализированных лабораториях, имеющих необходимый набор помещений, укомплектованных сертифицированным ПЦР-оборудованием в строгом соответствии с требованиями МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности». Исследования проводят врачи, прошедшие обучение на курсах повышения квалификации и получившие сертификат специалиста по генодиагностике инфекционных заболеваний. Порядок ПЦР-исследований материала, подозрительного на заражённость хантавирусами, проводимых на базе специализированных лабораторий, определён ниже (п.п. 4.2—4.4, 6.1—6.5).

4.2. Сбор клинического материала осуществляет медицинский персонал лечебно-профилактического учреждения, обученный правилам работы с ООИ. Наиболее информативным клиническим материалом для исследования методом ПЦР является кровь (плазма крови) от больных ГЛПС, полученная не позднее 8 сут. от начала заболевания. Взятие крови у больных пациентов проводится в герметично закрывающуюся пробирку с 6 %-м раствором ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) в соотношении 1 : 20 или пробирку с 3,8 %-м раствором цитрата натрия в соотношении 1 : 9. Использование гепарина в качестве антикоагулянта не допускается. Для получения плазмы закрытые пробирки с кровью несколько раз переворачивают для смешивания с консервантом и затем центрифугируют при 3 000 об./мин в течение 3—5 мин. Чтобы не допускать повторного замораживания проб, аликвоты плазмы предварительно разливают по 200—300 мкл в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Для выделения РНК используют 100 мкл плазмы крови, остаток материала замораживают и сохраняют при температуре минус 20 °С до конца исследования.

4.3. Сбор полевого материала для исследования на хантавирусы, а также отлов мышевидных грызунов и учёт их численности проводится в соответствии с нормативными методическими документами.

Пункты учета и отлова выбираются в соответствии с возможностью изучения относительной численности и видового состава мелких млекопитающих в совокупности с наибольшим числом доступных стаций (открытых и закрытых лугополевых, лесокустарниковых, околоводных). В выбранных стациях в вечерние часы зоологами выставляются линии из больших или малых ловушек. В утренние часы следующего дня производится выемка мелких млекопитающих из ловушек, учёт и упаковывание в тканевые мешочки или прочные одноразовые полиэтиленовые пакеты (каждая особь в отдельную упаковку).

Далее в лаборатории ООИ проводят вскрытие зверьков в следующем порядке. При вскрытии животных под контролем опытного зоолога проводится определение возрастного и полового состава добытых особей, их репродуктивной активности, уточнение видовой принадлежности. Для проведения лабораторных исследований на хантавирусы от каждого зверька в стерильные одноразовые пробирки (типа «Эппендорф») отдельно отбирают: лёгкое, сердце, печень, полоску фильтровальной бумаги, пропитанную кровью из грудной полости или сердца. Пробирки нумеруются согласно протоколу вскрытия и замораживаются в сосуде Дьюара (в жидком азоте) или в сумке – холодильнике с сухим льдом.

С целью предотвращения контаминации место разреза перед вскрытием зверька тщательно протирают одноразовым ватно-марлевым тампоном, обильно смоченным 96 %-м спиртом. Во время вскрытия зверьков используют два набора стерильных пинцетов и ножниц. Одним набором делают разрез кожи и подкожной клетчатки, вторым – брюшной и грудной стенок, отбор частей легкого, печени и сердца. После вскрытия каждого зверька оба набора инструментов тщательно протирают ватно-марлевым тампоном, пропитанным антисептиком, и стерилизуют в пламени спиртовки.

При исследовании полевого материала методом ПЦР готовят суспензии органов, для чего кусочки ткани размером 1—2 см растирают стерильно пестиком в фарфоровой ступке, постепенно добавляя 1—2 мл 0,15 М раствора натрия хлорида. Для каждого образца используется стерильный инструментарий и отдельный набор из пестика и ступки. Для выделения РНК используют 150 мкл суспензии, остаток материала замораживают и сохраняют при температуре минус 20 °С до конца исследования.

4.4. Упаковка, условия хранения и транспортирования материалов для проведения лабораторной диагностики ГЛПС должны соответствовать требованиям нормативных методических документов.

Все материалы, доставляемые для исследования в лабораторию, должны быть герметично упакованы в плотно закрывающиеся пластмассовые пробирки или флаконы с завинчивающимися крышками, помещёнными в полиэтиленовый пакет с ватой (или другим гигроскопичным материалом). В полиэтиленовый пакет вкладывают бланк направления с указанием: наименования направляющего учреждения, ф., и., о. больного, его возраста и местожительства, предварительного диагноза, вида материала, даты и времени взятия материала. Все пробирки, флаконы и прочие ёмкости должны быть маркированы в соответствии с направляемым списком. Герметично закрытые полиэтиленовые пакеты помещают в термоконтейнер (термос) с охлаждающими элементами или пакетами со льдом.

4.5. После забора клинического материала в больничном стационаре образцы крови с консервантом доставляются в ПЦР-лабораторию в охлажденном состоянии не позднее 12 ч с момента взятия, образцы плазмы – не позднее 2 сут. (при температуре не выше 2—4 °С). При транспортировании и хранении материалов следует избегать повторного размораживания проб. При необходимости образцы полевого и клинического материалов (суспензии органов и плазму крови) можно хранить в течение 3—6 мес. при температуре не выше минус 20 °С.

5. Рекомендуемые наборы реактивов, оборудования и расходных материалов для проведения анализа методом ПЦР

5.1. На этапах подготовки проб для исследования и анализа результатов ПЦР необходимо использовать только сертифицированные наборы реактивов (прилож. 3). **Использование несертифицированных тест-систем и наборов реактивов, возможно только для научных целей.**

5.2. При проведении ПЦР-исследований рекомендуется использовать оборудование и расходные материалы, перечень которых приводится в МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

6. Схема проведения ПЦР-исследований полевого и клинического материала на наличие хантавирусов

Для исследований полевого и клинического материала методом ПЦР применяется традиционная схема анализа, включающая экстракцию РНК, обратную транскрипцию, постановку ПЦР и учёт результатов. Требования и рекомендации по использованию необходимых наборов реактивов, оборудования и расходных материалов для проведения ПЦР-исследований приведены выше (п.п. 5.1, 5.2).

6.1. *Описание методики выделения РНК из плазмы крови.* РНК из плазмы крови выделяют методом нуклеосорбции в присутствии гуанидинтиоцианата. Для этого в каждую пробирку вносят по 450 мкл лизирующего раствора (в состав которого входят: гуанидинтиоцианат – 5,2 М; динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – Na_2-ЭДТА – 12,5 мМ; трис-(оксиметил)-аминометан-гидрохлорид – трис-HCl – 10 мМ; тритон X-100 – 2 %) и добавляют 100 мкл исследуемого образца, используя наконечники с аэрозольным барьером. Плотно закрытые пробирки с пробами тщательно перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 с при 5 тыс. об./мин на микроцентрифуге для удаления капель. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляют по 30 мкл ресуспендированного сорбента, представляющего собой 40 %-ю суспензию

силикагеля в деионизованной воде, и оставляют в штативе на 5 мин, периодически встряхивая содержимое на вортексе. Для осаждения сорбента все пробирки центрифугируют при 10 тыс. об./мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Затем проводят удаление супернатанта, используя для этого вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Далее в каждую пробирку добавляют по 400 мкл раствора для отмывки (состоящего из: гуанидинтиоцианата – 5,0 М; Na_2-ЭДТА – 0,0125 М; трис-HCl – 0,01 М), перемешивают на вортексе до полного ресуспендирования сорбента и центрифугируют 30 с при 10 тыс. об./мин. Удаляют супернатант как описано выше. Добавляют в пробирки по 500 мкл 70 %-го раствора этилового спирта, тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе и центрифугируют 30 с при 12 тыс. об./мин. После удаления супернатанта повторяют отмывку спиртом аналогичным способом. Добавляют в пробирки по 400 мкл ацетона, тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе и центрифугируют 30 с при 10 тыс. об./мин. После тщательного удаления супернатанта из каждой пробирки их помещают с открытыми крышками в термостат при температуре 60 °С на 7 мин для подсушивания сорбента.

В заключение в пробирки добавляют по 50 мкл раствора для элюции (трис-HCl 0,01 М; Na_2-ЭДТА – 0,001 М) и прогревают в термостате при 56 °С в течение 7 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугируют пробирки при 12 тыс. об./мин в течение 2 мин. Полученный супернатант используют для постановки реакции обратной транскрипции и ПЦР.

6.2. *Описание методики выделения РНК из суспензий внутренних органов мелких млекопитающих.* Для экстракции РНК из легочных суспензий используют двухэтапную экстракцию РНК. На первом этапе:в пробирки объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками вносят по 400 мкл лизирующего раствора (в состав которого входят: гуанидинтиоцианат – 25 %; цитрат натрия – 0,12 мМ (pH = 7,0); саркозил натрия – 0,26 %; кислый фенол – 44 % и меркаптоэтанол – 0,35 %). В пробирки с лизирующим буфером добавляют по 150 мкл образца, используя наконечник с аэрозольным барьером. Плотно закрывают крышки и перемешивают на вортексе. Далее к лизированным образцам добавляют 30 мкл ацетата натрия – 0,1 М (pH = 4,0), перемешивают на вортексе и центрифугируют 5 с при 10 тыс. об./мин. В эти же пробирки добавляют 300 мкл буфера (кислый фенол), перемешивают на вортексе и центрифугируют 5 с при 10 тыс. об./мин. Далее вносят в пробирки по 100 мкл хлороформа, встряхивают на вортексе в течение 1 мин и помещают в холодильник при 2—8 °С на 10 мин. Затем центрифугируют пробирки в течение 10 мин при 12—14 тыс. об./мин.

Для проведения второго этапа экстракции осторожно вынимают пробирки из центрифуги и, не задевая промежуточной фазы, переносят 450 мкл водной фазы в пробирку, содержащую 450 мкл лизирующего буфера и 30 мкл сорбента, и последовательно повторяют все процедуры экстракции РНК, описанные выше в п. 6.1 (методика выделения РНК из плазмы крови).

6.3. *Описание методики проведения обратной транскрипции для получения кДНК.* Обратную транскрипцию проводят со случайными праймерами. Готовится общая реакционная смесь из расчёта количества анализируемых образцов. Для этого в пробирку с 0,02 М дитиотрейтолом (ДТТ) добавляют 125 мкл реакционной смеси, содержащей: дезоксинуклеозидтрифосфаты – дНТФ в концентрации 0,002 М; трис-(оксиметил)-аминометан-гидрохлорид (трис-HCl) – 0,1 М; калия хлорид – 0,15 М; магния хлорид – 0,006 М; случайные праймеры – 3 ОЕ/мл. К полученному раствору добавляют 6 мкл ревертазы (MMLV) в концентрации 200 Ед/мкл и все реагенты аккуратно перемешивают на вортексе 1—2 с. Реакция проводится в реакционном буфере в объеме 60 мкл (с учетом 30 мкл пробы). Для этого в каждую пробирку вносят по 30 мкл готовой реакционной смеси и добавляют 30 мкл РНК-пробы, затем всё осторожно перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. В результате реакции обратной транскрипции получают кДНК, которую используют для последующей постановки ПЦР.

6.4. *Описание методики проведения ПЦР.* Реакция проводится в растворе следующего состава: смесь дНТФ в концентрации 1 мМ; фермент ДНК-полимераза «ДиаТак» – 0,1 ед./мкл, трис-HCl – 0,17 М; аммония сульфат – 42 мМ; магния сульфат – 7,5 мМ; бычий сывороточный альбумин – 0,25 г/л; Tween-20 – 0,025 %; глицерин – 20 %; ксиленцианол – 0,02 % и смесь из двух праймеров HantS/F–HantS/R или HantM/F–HantM/R (прилож. 4), каждый в концентрации 3 пмоль/мкл.

Реакция проводится в реакционном буфере в объеме 25 мкл (с учетом 10 мкл кДНК) при использовании режима «горячего старта». При этом реакционная смесь (нижняя), содержащая праймеры и дезоксинуклеозидтрифосфаты, должна быть отделена слоем воска от верхней реакционной смеси, содержащей ПЦР-буфер и фермент. Расплавление воска и перемешивание смесей происходит только после запуска программы, что улучшает качество анализа в целом.

ПЦР проводят на амплификаторах с применением активного режима термоциклирования. Оптимальные температурно-временные параметры на приборе (типа «Терцик») следующие: денатурация 95 °С в течение 5 мин, затем 95 °С – 10 с , 62 °С – 10 с, 72 °С – 10 с – 2 цикла; 95 °С – 10 с, 60 °С – 10 с, 72 °С – 10 с – 2 цикла; 95 °С – 10 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 15 с – 38 циклов, заключительная элонгация 72 °С – 3 мин.

6.5. *Описание методики учёта результатов ПЦР методом электрофореза.* Продукты амплификации, полученные в ПЦР, анализируют методом горизонтального электрофореза в агарозном геле и 1 × ТБЕ (трисборатном) буфере. Готовят рабочий электрофорезный ТБЕ-буфер, состоящий из: трис-HCl – 0,9 М; Na_2-ЭДТА – 0,02 М; борной кислоты – 0,9 М; этидия бромида – 20 мкг/мл. В стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл помещают 1,8 г агарозы, добавляют 100 мл рабочего буфера и нагревают до полного растворения агарозы. Затем расплавленный гель охлаждают до 65—70 °С и заливают в подготовленную заранее форму камеры с гребёнкой (толщина геля около 0,6 см). Для анализа ПЦР-продукта используют 10—15 мкл пробы, которую вносят в лунки геля. Продолжительность электрофореза составляет 18—20 мин. После проведения электрофореза гель переносят на трансиллюминатор и фотографируют с помощью видеосистемы (типа «Gel Doc 2000»). Длина специфических амплифицированных фрагментов кДНК при использовании универсальных праймеров HantS/F–HantS/R (прилож. 4) составляет для вируса Пуумала 475 п. н., для вируса Тула – 466 п. н., для вирусов Добрава, Сеул, Хантаан – 463 п. н; при использовании универсальных праймеров Hant M/F–Hant M/R (прилож. 4) длина специфически амплифицированного фрагмента для всех вирусов комплекса ГЛПС составляет 327 п. н.

6.6. Подтверждающее тестирование образцов на ГЛПС и генотипирование хантавирусов осуществляется в Референс-центре на базе ГУ ИПиВЭ им. М. П. Чумакова РАМН (прилож. 1). Для этого необходимо собрать материал от грызунов и больных людей, как указано в п.п. 4.2—4.3. Собранный материал должен быть предварительно протестирован с помощью одной из сертифицированных тест-систем, перечисленных в прилож. 2. Протестированный материал, упакованный согласно п. 4.4, направляется в Референс-центр по указанному адресу (прилож. 1).

7. Генотипирование хантавирусов и интерпретация полученных результатов

Известно, что метод секвенирования считается «золотым стандартом» для типирования вирусов. Учитывая высокое разнообразие и недостаточную изученность спектра хантавирусов, циркулирующих на территории России, является целесообразным проведение секвенирования кДНК хантавирусов.

Пробы с высокой вирусной нагрузкой, полученные в результате ПЦР с обратной транскрипцией, могут быть секвенированы на базе лаборатории, оснащённой необходимым оборудованием. После визуального учёта на электрофорезе качества полученных ампликонов, остав-

шуюся часть пробы (15—20 мкл) подвергают очистке. Для этого амплификат переносят в пробирку объемом 1,5 мл, смешивают с равным объемом смеси фенол-хлороформ (1 : 1) и перемешивают до образования эмульсии. Для разделения водной и органической фаз образцы центрифугируют на настольной центрифуге в течение 15—30 с при 12 000 об./мин. Затем верхний (водный) слой переносят в новую пробирку, добавляют повторно равный объем смеси фенол-хлороформ (1 : 1), перемешивают и центрифугируют в том же режиме. После этого отбирают водную фазу, добавляют одну десятую объема 3 М натрия ацетата и тщательно перемешивают. Добавляют два объема охлажденного во льду 96 %-го этанола, перемешивают и охлаждают 10 мин при 0 °С. После центрифугирования (в режиме – 10 мин при 12 000 об./мин), удаляют надосадочную жидкость, полученный осадок промывают 70 %-м этанолом, подсушивают и растворяют в 50 мкл буфера (трис-HCl 0,01 М; Na_2-ЭДТА – 0,001 М). После очистки проб проводят их секвенирование, используя для этого капиллярный автоматический секвенатор (типа «ABI-3100 PRISM») и соответствующий ему набор реактивов. В качестве инициирующих олигонуклеотидов для секвенирования используют универсальные праймеры (прилож. 4), с помощью которых были получены амплифицированные в ПЦР фрагменты ДНК. Полученные последовательности нуклеотидов анализируют с помощью программы «MEGA». Нуклеотидные последовательности новых РНК-изолятов сравнивают с полными нуклеотидными последовательностями S- и (или) М-сегментов штаммов хантавирусов, зарегистрированных в международной базе данных «GenBank», или ранее выявленными изолятами, нуклеотидные последовательности которых лежат в области, ограниченной универсальными праймерами (прилож. 4). Для сравнения рекомендуется использовать РНК-изоляты (фрагменты М- и S-сегментов) хантавирусов Добрава, Пуумала и Тула, выявленные на территории России в 2003—2008 гг., имеющие следующие номера в «GenBank»: DQH64647-64671; DQH64673-64687; DQ061259, DQ061265-DQ061269, EU549802-549815, EU562892-563018, EU652421-EU652443.

Использование для амплификации и секвенирования хантавирусов рекомендуемых универсальных праймеров имеет ряд преимуществ:

- позволяет пополнить уже имеющуюся информационную базу данных, включающую более 200 РНК-изолятов хантавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации;
- значительно упрощает и ускоряет процедуру секвенирования (за счёт возможности использования коротких фрагментов генома для сравнения);
- позволяет интерпретировать полученные результаты, т. е. определять географическую принадлежность новых РНК-изолятов, оценивать

степень гетерогенности существующих в природе популяций, выявлять уровень сходства и различий «новых» от ранее выявленных штаммов.

Информация, полученная в результате генотипирования хантавирусов, является эпидемиологически значимой, может представлять особую важность при определении эпидемического потенциала природных очагов ГЛПС и оценки уровня опасности «новых» штаммов для человека.

Унификация методических подходов для проведения молекулярно-генетических исследований предоставляет возможность создания единой информационной базы данных, позволяющей анализировать, интерпретировать и сопоставлять новую информацию с ранее полученными результатами.

Список сокращений

ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
ДОБ – вирус Добрава
ПУУ – вирус Пуумала
ИФА – иммуноферментный анализ
МФА – метод иммунофлуоресценции
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
кДНК – комплементарная ДНК
ООИ – особо опасные инфекции
н. п. – нуклеотидная последовательность
п. н. – пара нуклеотидов

Приложение 1

Координаты Референс-центра, осуществляющего дополнительное подтверждающее тестирование и генотипирование вирусов комплекса ГЛПС

1 Референс-центр по мониторингу за полиомиелитом, ГЛПС, клещевым вирусным энцефалитом на базе ГУ ИПиВЭ им. М. П. Чумакова РАМН.

142782, Московская обл., Ленинский р-н, пос. Институт полиомиелита. Тел.: (495) 439-90-94. Факс: (495) 439-93-21. e-mail: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

Приложение 2

Перечень сертифицированных диагностических тест-систем, используемых для подтверждения диагноза ГЛПС у больных людей и проведения скрининговых исследований на наличие хантавирусного антигена у носителей хантавирусной инфекции

• «Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА» – для выявления специфичных антител в сыворотках крови больных людей (производства ГУ ИПиВЭ им. М. П. Чумакова РАМН).

• «Иммуноферментная тест-система (Хантагност)» – для выявления хантавирусного антигена (производства ГУ ИПиВЭ им. М. П. Чумакова РАМН).

Приложение 3

Перечень наборов реактивов, рекомендуемых для проведения молекулярно-генетических исследований биологического материала на ГЛПС

Для проведения молекулярно-генетических исследований биологического материала на ГЛПС возможно использование любых сертифицированных наборов реактивов, предназначенных для выделения РНК, постановки ПЦР, обратной транскрипции и электрофореза.

Пример комплектации сертифицированных наборов реагентов (производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора»), необходимых для проведения ПЦР-исследований на хантавирусы:

• «РИБО-сорб» – комплект реагентов, предназначенный для выделения РНК/ДНК из клинического материала методом аффинной сорбции на частицах силикагеля;

• «РИБО-золь-В» – для выделения РНК из клинического материала (лейкоцитов крови, суспензий клеток, гомогенизированных биоптатов) методом гуанидин-фенол-хлороформовой экстракции;

• «Реверта» – комплект реагентов, предназначенный для получения кДНК на матрице РНК;

• «ЭФ-200» – комплект реагентов, предназначенный для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

Тест-система «АмплиСенс®Хантавир» (производства ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора»), предназначенная для выявления РНК хантавирусов комплекса ГЛПС в полевом и в клиническом материале методом ПЦР, также как и другие ПЦР тест-системы, доступные для потребителя, но не имеющие сертификата и государственной регистрации, могут быть использованы только для научных целей.

Приложение 4

Наборы олигонуклеотидных праймеров, рекомендуемые в молекулярно-генетических исследованиях по определению генотипов хантавирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации

Наименование	Нуклеотидная последовательность 5'—3'	Позиция генома	Штамм, сегмент
Универсальные праймеры для детекции вирусов комплекса ГЛПС			
Hant M/F	ATC(T/A)ATAGAIGGTGCATGGIGTTCTG	2971-2996	Dobrava, SK/Aa AY961616, M-сегмент
Hant M/R	CCACATTIAGGTGCICCATCATC	3297-3275	
Hant S/F	TT(C/T)AA(G/A)GATGACA(C/G)CTCATT TGAGGAT	475-501	Puumala, CG17/Baskiria -2001 AF442613, S-сегмент
Hant S/R	C(T/A)GGTGC(A/C)CA(A/G)GCAAA(T/G) ACCCA	949-928	

gost.e-ecolog.ru