

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –  
Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

И.В. Гаевский  
« *И.В. Гаевский* » 2014 г.

Регистрационный № *022-1213*



**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Семейко Г.В., к.б.н. Е.Ю. Свирчевская, к.м.н. М.А. Ермолович,  
В.П. Шиманович, д.м.н. Е.О. Самойлович

Минск, 2013

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –  
Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

И.В. Гаевский

02.06.2014

Регистрационный № 022-1213

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Семейко Г.В., к.б.н. Е.Ю. Свирчевская, к.м.н. М.А. Ермолович,  
В.П. Шиманович, д.м.н. Е.О. Самойлович

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены серологический, вирусологический и молекулярно-генетический методы, применяемые для лабораторной диагностики эпидемического паротита.

**Инструкция** предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-педиатров, врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей – специалистов организаций здравоохранения.

## **1 Показания**

Необходимость дифференциации случаев эпидемического паротита у пациентов с острым проявлением одно- или двустороннего воспаления околоушных или других слюнных желез, развившимися без других видимых причин.

## **2 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники**

### ***Оборудование для лабораторной диагностики:***

- ламинарный бокс с бактерицидной лампой;
- термостат на 37°C;
- инвертированный микроскоп;
- холодильник на 2-8°C;
- морозильник на -20°C;
- вортекс;
- центрифуга низкоскоростная до 3 тыс. об/мин для флаконов 50 мл;
- центрифуга высокоскоростная для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об/мин;

- термоциклер для проведения ПЦР;
- весы лабораторные;
- микроволновая печь;
- источник питания для проведения электрофореза;
- камера для горизонтального гель-электрофореза;
- Трансиллюминатор;
- спектрофотометр для 96-луночных планшет;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл).

***Материалы для лабораторной диагностики:***

- наборы для сбора мазка со слизистой носоглотки для вирусологических исследований или стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке;
- одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2, 0,5, 1,5 мл;
- одноразовые пластиковые центрифужные пробирки объемом 50мл;
- культуральные флаконы с площадью культивирования 25см<sup>2</sup> с суточным монослоем культуры клеток;
- одноразовые наконечники с фильтром до 20, 200, 1000 мкл для автоматических дозаторов;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.

***Реагенты для лабораторной диагностики:***

- питательная среда поддерживающая (питательная среда Игла в модификации Дульбеко (ДМЕМ), содержащая 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,2% гентамицина);

- вирусная транспортная среда (раствор Хенкса, содержащий 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,2% гентамицина);
- набор для выявления специфических антител к вирусу паротита методом иммуноферментного анализа (ИФА);
- набор для выделения вирусной РНК;
- набор для выполнения полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в один раунд;
- реактивы для проведения ПЦР – фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед/мкл); 10×буфер для *Taq* полимеразы (100 мМ Трис-НСl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 500 мМ KCl); 10 мМ смесь дНТФ; 25 мМ раствор MgCl<sub>2</sub>;
- синтетические олигонуклеотиды (праймеры):  
 MuV-1f (5'-ТСААСАСААТАТСААГТА-3', 6119-6139),  
 MuV-1r (5'-ТТСТГТГТТГТАТТГТГА-3', 6556-6573),  
 MuVf (5'- АТГАТСТСАТСАГГТАС-3', 6143-6159),  
 MuVr (5'- ТССТААГТТТГТТСТГГ-3', 6539-6555);
- деионизированная вода;
- агароза;
- трис-ацетатный буфер (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА; рН 8,5);
- бромистый этидий;
- буфер для нанесения проб (0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленианола, 30% глицерола);
- молекулярно-весовой маркер ДНК с диапазоном длин от 100 до 600 пар нуклеотидов.

### **3 Подготовка клинических образцов для исследования**

#### **3.1 Клинический материал**

- сыворотка крови;
- мазки со слизистой носоглотки;

- моча.

Для серологического исследования (выявление специфических IgM и IgG антител) может быть использована кровь, забранная как из вены, так и из пальца. IgM-антитела обнаруживаются в сыворотке крови с 4 по 28 день заболевания. Выявление IgG-антител может быть использовано для диагностики в том случае, когда во втором из двух последовательно собранных образцов сыворотки выявляются специфические IgG, а в первом образце они отсутствовали, т.е. регистрируется сероконверсия к данной инфекции, либо отмечается четырехкратное нарастание уровня IgG в парных сыворотках. Первая сыворотка крови для исследования на IgG собирается как можно раньше с момента появления клинических проявлений заболевания, но не позднее 7 дней, вторая – через 10–20 дней.

Кровь забирают в объеме 0,5-5 мл из вены в вакутайнер или из пальца в стерильную центрифужную пробирку. После образования сгустка кровь центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин для отделения сыворотки. Сыворотку переносят в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке указывают имя или идентификационный номер пациента, дату забора и тип образца.

Желательно доставить сыворотку в тот же день, не замораживая, в лабораторию, выполняющую исследования на эпидпаротит. Если доставка в тот же день не представляется возможной, до проведения исследования сыворотка может храниться и транспортироваться при +2-8°C в течение 7 дней с момента забора. Более длительное хранение проводится при -20°C.

Следует не допускать повторных циклов замораживания-оттаивания сыворотки крови, т.к. это оказывает разрушающее действие на

специфические антитела и приводит к искажению результатов исследования.

Для вирусологического исследования используются мазки со слизистой носоглотки и моча. Вирусная РНК может выявляться в этих биологических жидкостях за 5-7 дней до и в течение 5-6 дней после появления симптомов заболевания.

Мазок со слизистой носоглотки может быть получен с использованием коммерческих наборов для сбора образцов для вирусологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя набора. ***Не использовать гельсодержащие наборы для сбора образцов для бактериологических исследований!*** При отсутствии коммерческих наборов используйте стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Для забора образца тампон помещают между щекой и десной и удерживают до полного намокания, при этом аккуратными движениями протирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Тампон вносят в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды, обламывают палочку и плотно укупоривают пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре +2-8°C в течение 48 часов после сбора.

Если доставка образца в лабораторию будет произведена в течение 2 часов после сбора, допустимо поместить тампон с образцом в сухую стерильную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. В лаборатории в пробирку добавляют 2 мл вирусной транспортной среды, тщательно перемешивают на вортексе и оставляют на 1 час при +2-4°C для элюирования вируса. Затем тампон извлекают из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Смыв

центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Образцы мочи предпочтительно собирать утром, поскольку первая утренняя порция мочи содержит большее количество эпителиальных клеток. Мочу в объеме 10-50 мл собирают в стерильный промаркированный флакон, плотно укупоривают и в день сбора образца отправляют с соблюдением холодовой цепи в лабораторию, проводящую исследования на паротит. Если доставка в тот же день не представляется возможной, образец хранят в течение суток при температуре +4°C. Образец нельзя замораживать. В лаборатории образец центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Следует не допускать повторного замораживания-оттаивания образцов или длительного хранения при -20°C, так как это оказывает повреждающее действие на вирус.

### **3.2 Выявление специфических антител к вирусу паротита методом ИФА**

ИФА тест-системы для диагностики паротита основаны на принципе твердофазного непрямого ИФА.

Принцип непрямого ИФА состоит в том, что антитела к вирусу паротита, содержащиеся в исследуемом образце, комплементарно связываются с антигенами вируса паротита, сорбированными на носителе. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляется с помощью антител против иммуноглобулинов человека, конъюгированных с ферментом пероксидазой. Добавленный в реакцию краситель (субстрат) окисляется, приобретая окрашивание, степень которого зависит от количества специфических антител в исследуемом образце и может быть

измерено фотометрически. В образцах, не содержащих специфических антител, окрашивание развиваться не будет. При использовании непрямого варианта ИФА для выявления IgM антител требуется удаление из сыворотки крови IgG антител, которые могут взаимодействовать с ревматоидным фактором в случае присутствия его в образце и давать ложноположительный результат исследования. С этой целью исследуемая сыворотка крови предварительно соединяется с абсорбентом ревматоидного фактора.

Исследование сыворотки крови в ИФА проводят строго в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

### **3.3 Выделение вируса паротита в культуре клеток**

Из культуральных флаконов с площадью культивирования 25см<sup>2</sup> со свежесформированным суточным монослоем культуры клеток Vero (перевиваемая культура клеток почек зеленых африканских мартышек) удаляют ростовую среду и вносят 0,5 мл пробы и 1 мл поддерживающей среды. Пробу инкубируют в течение 1 часа при 37<sup>0</sup>С. Затем во флакон дополнительно вносят 4 мл поддерживающей среды и инкубируют в течение 7 суток при 37<sup>0</sup>С. Флаконы ежедневно просматривают с использованием инвертированного микроскопа для выявления цитопатического эффекта (ЦПЭ). В случае развития дегенерации клеток или в случае ее отсутствия через 7 дней инкубации клеточную суспензию замораживают при -20<sup>0</sup>С и в дальнейшем используют для исследования в ПЦР.

### **3.4 Выделение вирусной РНК**

РНК из клинического образца или культуральной жидкости выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора

для выделения РНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы РНК хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Гнездовая ОТ-ПЦР

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в деионизированной воде. Для удобства готовят растворы праймеров и проб с конечной концентрацией равной 20 мкМ. Разведения готовят по формуле:  $V [\text{H}_2\text{O}] = n [\text{праймера /пробы}] / C [\text{раствора}]$ .

Пример: если количество (n) высушенного праймера/пробы в пробирке равно 12,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C] равной 20 мкМ необходимо добавить  $\text{H}_2\text{O}$  в объеме (V) 625 мкл.

Для постановки реакции готовят смесь праймеров и смесь из компонентов набора для однораундовой ОТ-ПЦР, содержащую ферменты, в соответствии с протоколом, представленным в таблице 1.

В каждую пробирку вносят по 2 мкл смеси праймеров и 4 мкл РНК соответствующей пробы, выдерживают 4 мин при температуре  $97^{\circ}\text{C}$  для денатурации вирусной РНК. Затем пробирки помещают на лед и добавляют в них по 19 мкл реакционной смеси, содержащей ферменты, и проводят реакцию в следующих условиях: обратную транскрипцию в течение 30 мин при  $42^{\circ}\text{C}$ , 15 минут при  $95^{\circ}\text{C}$  для денатурации смеси обратных транскриптаз и активации полимеразы и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включает следующие стадии: денатурация при  $94^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд, отжиг праймеров при  $50^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд, элонгация при  $72^{\circ}\text{C}$  – 45 секунд. В последнем цикле элонгацию проводят 7 мин.

Состав реакционной смеси для второго раунда ПЦР (гнездовой) представлен в табл. 2.

Таблица 1 – Компоненты смесей для проведения ОТ-ПЦР

*Приготовление смеси праймеров*

Реагенты	Концентрация	Объем на одну реакцию (мкл)	Объем на N реакций (мкл)*
MuV-1f	20 мкМ	1	N+1
MuV-1r	20 мкМ	1	N+1

*Приготовление смеси с ферментом*

Реагенты	Концентрация	Объем на одну реакцию (мкл)	Объем на N реакций (мкл)*
H <sub>2</sub> O деионизированная		16	16·(N+1)
ПЦР буфер	5x	5	5·(N+1)
дНТФ	10 мМ	1	N+1
Смесь ферментов	5 ед/мкл	1	N+1

\* - N – это число исследуемых образцов, положительный и отрицательный контроли

Таблица 2 – Компоненты смеси для проведения второго раунда ПЦР

Реагенты	Концентрация	Объем на одну реакцию (мкл)	Объем на N реакций (мкл)
H <sub>2</sub> O деионизированная		13,75	13,75·(N+1)
ПЦР буфер	10x	2,5	2,5·(N+1)
дНТФ	10 мМ	0,5	0,5·(N+1)
MgCl <sub>2</sub>	25 мМ	1	N+1
MuVf	20 мкМ	1	N+1
MuVr	20 мкМ	1	N+1
Тақ-полимераза	5 ед/мкл	0,25	0,25·(N+1)
Вся смесь		20	

Приготовленную смесь для второго раунда ПЦР разливают в лунки по 20 мкл, а затем добавляют по 5 мкл кДНК, полученной в ходе ОТ-ПЦР, в разведении 5x. Реакцию проводят в следующих условиях: после начальной денатурации кДНК (1,5 минут при 94<sup>0</sup>С) проводят 30 циклов амплификации: денатурация при 94<sup>0</sup>С – 30 секунд, отжиг праймеров при

55°C – 30 секунд, элонгацию при 72°C – 1 мин. В последнем цикле элонгацию проводят 5 мин.

Контроль наличия продуктов амплификации выполняют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 110 мА в течение 30 минут. Учет флюоресценции бромистого этидия, связанного с ДНК-фрагментами, выполняют в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Результаты интерпретируют путем сравнения наличия и размеров продуктов ПЦР в исследуемых пробах и образцах положительного контроля, а также соответствия размера синтезируемого фрагмента маркеру молекулярной массы. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 412 пар нуклеотидов, и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно проведенной реакции.

#### **4 Анализ и интерпретация результатов**

***Критерии лабораторного подтверждения диагноза эпидпаротит:***

- выявление IgM антител к вирусу паротита в сыворотке крови;
- выявление нарастания концентрации IgG антител в парных сыворотках крови;
- определение РНК вируса паротита в клинических образцах (носоглоточный смыв или моча) методом ПЦР;
- изоляция вируса паротита в культуре клеток Vero из клинических образцов с последующей идентификацией методом ПЦР.

Положительный результат, полученный, по крайней мере, одним из методов исследования, является лабораторным подтверждением диагноза эпидемический паротит.

## 5 Возможные проблемы при проведении лабораторной диагностики эпидемического паротита и их устранение

Осложнения	Возможные причины и их устранение
Значения оптической плотности (ОП) контрольных образцов не соответствуют области применения, указанной в сертификате контроля качества данной партии	Тест считается недействительным и его надо повторить, учитывая все требования к проведению теста.
Реакционная смесь во всех лунках имеет специфическое окрашивание	При хранении появилось окрашивание субстрата. Такой субстрат использовать нельзя.
Помутнение среды и изменение ее цвета на желтый во флаконах с культурой клеток Vero	Контаминация под воздействием бактерий. Исследуемую пробу обрабатывают антибиотиком. Выделение вируса повторяют.
Все пробы в ПЦР отрицательны, включая положительный контроль	Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; не пригоден реагент (реагенты)
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировали или не были добавлены
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК