

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

А.А.Тарасенко

« 19 » 12 2023 г.

Регистрационный № 001-0423



**МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ПАРОТИТА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТ-ПЦР
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук М.А. Ермолович, канд. биол. наук Г.В. Семейко,
А.О. Михаленко, д-р. мед. наук, профессор Е.О. Самойлович

Минск, 2023

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный
санитарный врач

Республики Беларусь

_____ А.А.Тарасенко

19.12.2023

Регистрационный № 001-0423

**МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА ПАРОТИТА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТ-ПЦР
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук М.А. Ермолович, канд. биол. наук Г.В. Семейко,
А.О. Михаленко, д-р. мед. наук, профессор Е.О. Самойлович

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод обнаружения РНК вируса паротита с использованием полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени, направленный на выявление генетического материала вируса паротита в биологических образцах.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, врачей-эпидемиологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, а также в учреждениях, осуществляющих государственный санитарный надзор.

1 Показания к применению:

Лабораторная верификация диагноза эпидемический паротит (МКБ10: B26) у пациентов с клиническими проявлениями, совместимыми с этим заболеванием.

Противопоказания отсутствуют.

2 Перечень изделий медицинского назначения, реактивов, расходных материалов

2.1 Изделия медицинской техники:

ламинарное укрытие с бактерицидной лампой;

дозаторы автоматические переменного объема: 2-20, 20-200, 200-1000 мкл;

термоциклер с оптическим модулем для проведения ПЦР в режиме реального времени;

компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа;

холодильник-морозильник ($-18...-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$);
центрифуга-вортекс;
центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 14 тыс. об/мин).

2.2 Медицинские изделия:

набор для сбора носоглоточных мазков для вирусологических исследований (стерильный зонд-тампон в пробирке);

одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free», объемом до 10, 100, 200, 1000 мкл;

одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки / стрипы / планшеты объемом 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free»);

стерильная емкость с крышкой для сбора мочи;

штативы для микропробирок и автоматических пипеток.

2.3 Реактивы:

вирусная транспортная среда (раствор Хенкса, содержащий 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,2% гентамицина);

вода деионизированная, свободная от РНКаз/ДНКаз;

набор для выделения РНК из образцов, содержащих низкое количество нуклеиновых кислот;

реакционная смесь для ОТ-ПЦР;

праймеры для амплификации фрагментов ДНК и зонды.

3 Биологические образцы

Сбор биологических образцов (мазок со слизистой оболочки носоглотки, моча) и их обработка для детекции РНК вируса паротита методом ОТ-ПЦР проводятся согласно инструкции по применению

«Методы лабораторной диагностики эпидемического паротита», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 02.06.2014 №022-1213.

Информация по биологической безопасности: клинические образцы потенциально могут содержать широкое разнообразие возбудителей инфекционных заболеваний, поэтому все манипуляции необходимо проводить с соблюдением правил работы с инфицированным материалом и использованием средств индивидуальной защиты согласно СанПиН «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2.

4 Выделение РНК

Вирус паротита является РНК-содержащим. Для выделения РНК из биологических образцов используют представленные в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь» наборы, предназначенные для выделения РНК из биологического материала, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы РНК в течение месяца хранят при -20°C , более длительное хранение осуществляется при -80°C .

5 Одностадийная ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления вируса паротита

Выявление РНК вируса паротита проводят методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Каждый образец тестируется параллельно в двух реакциях: со специфическими праймерами к вирусу паротита и с

праймерами к рибонуклеазе Р (РНКаза Р), которая присутствует во всех клетках человека и используется в качестве внутреннего эндогенного контроля для оценки качества сбора биологического материала и эффективности выделения РНК.

Для снижения риска контаминации и повышения чувствительности реакцию проводят с использованием наборов для одностадийной ОТ-ПЦР, представленных в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь», в соответствии с прилагаемой инструкцией. Реакцию проводят в объеме 25 мкл. Дополнительно к реакционной смеси для ОТ-ПЦР добавляют специфические праймеры и зонды, последовательности которых и количество, необходимое для проведения одной реакции, указаны в таблице 1. Детектируемый фрагмент РНК вируса паротита соответствует участку гена N длиной 107 н.о.

Таблица 1 – Праймеры и зонды для одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления вируса паротита

Выявляемая мишень	Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Кол-во для 1 реакции, пмоль
Вирус паротита	MuV494-f	AATGCACGCGCCAATCTTAC	7,5
	MuV542-p	FAM-CTTGCAGATGACC TCCCTCCAACCAT-BHQ1	6,25
	MuV600-r	ATCACATGGCTGHCCTTCAA	7,5
РНКаза Р человека	hRNaseP-f	AGATTTGGACCTGCGAGCG	7,5
	hRNaseP-p	FAM-TTCTGACCTGAAGGCT- CTGCGCG-BHQ1	2,5
	hRNaseP-r	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	7,5

Все олигонуклеотиды (праймеры и зонды) синтезируются специализированными организациями под заказ. Каждый олигонуклеотид разводят в деионизированной воде для получения рабочей концентрации

10 мкМ/мкл. Для расчета объема воды, необходимого для разведения каждого из олигонуклеотидов до требуемой концентрации, применяют формулу: $V [H_2O] = n \text{ нмоль [праймера/зонда]} * 1000 / C \text{ мкМ [раствора]}$. Например: если количество (n) высушенного праймера/зонда в пробирке равно 27,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C], равной 10 мкМ, необходимо добавить H₂O в объеме (V) 2750 мкл.

Полученные растворы могут храниться длительное время при минус 20 °С, однако следует избегать их многократного размораживания и замораживания.

Готовят реакционную смесь, содержащую ферменты, праймеры и зонд, согласно таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2 – Компоненты реакционной смеси для детекции РНК вируса паротита методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Вода деионизированная	15,875	
Реакционная смесь с ферментами*	5	1x
Прямой праймер MuV494-f (10 мкМ)	0,75	300 nM
Обратный праймер MuV600-r (10 мкМ)	0,75	300 nM
Зонд MuV542-p (10 мкМ)	0,625	250 nM
РНК	2	
Всего:	25	

Примечание: * коммерческая реакционная смесь для одностадийной ОТ-ПЦР с ферментами. Объем на 1 реакцию определен из расчета 5-кратной концентрации смеси.

Таблица 3 – Компоненты реакционной смеси для детекции РНКазы Р человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Компонент	Объем на 1 реакцию, мкл	Конечная концентрация
Вода деионизированная	16,25	
Реакционная смесь с ферментами*	5	1x
Прямой праймер hRNaseP -f (10 мкМ)	0,75	300 nM
Обратный праймер hRNaseP -r (10 мкМ)	0,75	300 nM
Зонд hRNaseP -p (10 мкМ)	0,25	100 nM

ДНК	2	
Всего:	25	

Примечание: * коммерческая реакционная смесь для одностадийной ОТ-ПЦР с ферментами. Объем на 1 реакцию определен из расчета 5-кратной концентрации смеси.

Объем компонентов смеси рассчитывают исходя из количества исследуемых образцов (n) плюс три образца (n+3). В каждую реакцию включают положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец.

Берут соответствующее количество ПЦР-пробирок/стрипов /планшет объемом 0,2 мл. В каждую пробирку (или лунку планшета) для проведения реакции вносят по 23 мкл реакционной смеси и по 2 мкл исследуемого или контрольного образца. Положительный контроль добавляют в последнюю очередь. В качестве положительного контроля используют РНК вируса паротита и ДНК человека. В качестве отрицательного контроля используют H₂O.

Приготовление реакционных смесей, раскапывание их в пробирки или лунки планшета и добавление образцов проводится на льду. Перед постановкой в амплификатор следует осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием (1-3 с) или встряхиванием планшета.

Режим амплификации представлен в таблице 4. Считывание флуоресценции устанавливают после каждого этапа элонгации.

Таблица 4 – Режим амплификации для проведения однораундовой диагностической ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Обратная транскрипция	48°C – 30 мин
Активация ДНК-полимеразы	95°C – 2 мин
Амплификация: 95°C – 10 с 60°C – 30 с	40 циклов

Детекция флуоресцентного сигнала и для вируса паротита, и для внутреннего контроля проводится по каналу для флуорофоров FAM/Green.

Установить планшет или пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

6 Контроль качества реакции

Реакция подлежит учету при следующих условиях:

- отрицательный контроль обеих реакций, с праймерами к вирусу паротита и с праймерами к РНКазе Р человека – отрицательный (сигнал флуоресценции отсутствует по всем каналам);
- автоматически определенная пороговая линия располагается в пределах экспоненциальной фазы амплификации;
- значение порогового цикла C_t положительных контролей реакции не менее 35.

В случае несоответствия полученных результатов любому из указанных критериев реакцию необходимо повторить.

7 Интерпретация результатов реакции

Если критерии соответствия соблюдены, результаты исследования образцов интерпретируют согласно указанным в таблице 5 значениям.

Таблица 5 – Интерпретация результатов диагностической ОТ-ПЦР

Значение порогового цикла C_t		Результат исследования
вирус паротита	внутренний контроль (РНКазы Р)	

< 40	< 40	положительный
нет значений	< 40	отрицательный
< 40	нет значений	положительный
нет значений	нет значений	неопределенный

Результат амплификации считается положительным, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции на любом цикле.

Неопределенный результат может свидетельствовать о проблемах с качеством сбора биологического материала, выделением РНК и/или наличием ингибиторов ПЦР в образце. В таком случае рекомендуется провести выделение РНК повторно, по возможности с использованием другого метода.

8 Перечень возможных ошибок и пути их устранения

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
1	2	3
В положительном контроле значение порогового цикла C_T отсутствует или превышает граничное значение, но реакция положительна с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировала или не была добавлена	Повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов с использованием нового положительного контроля
Кривая флуоресценции в клинических образцах пересекает пороговое значение, но не имеет типичной S-образной формы	Наличие примесей в клинических образцах	Более тщательная очистка при выделении ДНК из клинических образцов
В пробе отрицательного контроля зафиксировано	Загрязнение отрицательного контроля	Повторить исследование для всех положительных

значение порогового цикла C_T		образцов с использованием нового отрицательного контроля; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации
Все пробы в ПЦР отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком	Повторить исследование для всех образцов с использованием свежих реагентов и (или) новых наборов праймеров и зондов, соблюдать
1	2	3
	годности	правила их транспортировки и хранения, проверить соблюдение протокола приготовления смеси и режима амплификации