

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь



Н.П. Жукова

« 20 » июля 2019 г.

Регистрационный № 004-0519

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПАРЭХОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии», государственное учреждение образования «Белорусская
медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В.; к.б.н. Поклонская Н.В.;
Шилова Ю.А., к.м.н., доцент Кишкурно Е.П.

Минск, 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н.П. Жукова

20.06.2019

Регистрационный № 005-0519

МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОСТАДИЙНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

канд. биол. наук Семейко Г.В., канд. мед. наук Полякова Н.В., канд. мед. наук
Ермолович М.А., канд. биол. наук Свирчевская Е.Ю., д-р мед. наук, профессор
Самойлович Е.О.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР/РВ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и/или медицинскую профилактику инфекционных заболеваний вирусной этиологии.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях и/или условиях отделения дневного пребывания, а также организаций, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Классификация ротавирусов проводится по двум генам: VP7, кодирующему поверхностный белок гликопротеин (определяет G-тип) и VP4, кодирующему протеазазависимый протеин (определяет P-тип). В настоящее время в Европе наиболее широко распространены 6 генотипов ротавирусов: G1P[8], G4P[8], G2P[4], G9P[8], G3P[8] и G12P[8], на их долю приходится около 90% выявленных штаммов. Однако регулярно появляются данные о находках новых, эпидемически значимых вариантов ротавирусов и большом числе нетипируемых штаммов.

Метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР/РВ позволяет выявлять 8 G-генотипов (G1-4, 8, 9, 10, 12) и 5 P-генотипов (P[4], [6], [8], [9], [10]) ротавирусов за короткий промежуток времени (3 часа вместо 8), проводя всю реакцию в одну стадию.

Показания к применению:

Генотипирование ротавирусов от пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом А08.0 – ротавирусный энтерит

Противопоказания отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ И РЕАКТИВОВ

Автоматические пипетки переменного объема: 2-20, 20-200, 200-1000 мкл

Вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз)

Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой

Набор для выделения РНК из образцов

Набор для ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР)

Наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free»

Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки объемом 1,5 мл;

Олигонуклеотиды для амплификации фрагментов ДНК и зонды

ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free»)

Термоциклер с оптическим модулем для проведения ПЦР в реальном времени

Фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2)

Холодильник-морозильник (минус 18-20°C, +4-8°C)

Центрифуга-вортекс

Центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 12 тыс. об/мин)

1. Описание технологии выполнения генотипирования

1.1 Приготовление 10% суспензии образца стула

В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,9 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора, вносят 0,1 г (или 0,1 мл) пробы

стула. Пробирку встряхивают на вортексе в течение 1-2 мин, затем центрифугируют в течение 5 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для дальнейшего исследования. Длительное хранение пробы проводится при -20°C .

1.2 Выделение РНК

Выделение РНК из 10% суспензии выполняют с использованием представленных в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь» наборов, предназначенных для выделения РНК из биологического материала, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

1.3 Одностадийная ОТ-ПЦР в реальном времени для генотипирования ротавируса

Генотипирование ротавирусов проводится с помощью одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР/РВ. При выполнении генотипирования каждый исследуемый образец тестируется параллельно в 3 реакциях с использованием 3 панелей праймеров и зондов (табл. 1-3). Первая и вторая панель содержат праймеры для детекции 8 G-генотипов (по 4 генотипа в панели), также каждая из них включает праймеры для детекции NSP3 гена, который выполняет роль внутреннего контроля и позволяет идентифицировать наличие РНК ротавируса в пробе, если G-генотип не соответствует ни одному из вышеперечисленных. Третья панель содержит праймеры для определения 5 P-генотипов. Таким образом каждому генотипу в панели соответствует свой флуорофор.

Реакцию проводят в однораундовой ОТ-ПЦР с использованием наборов, представленных в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь», в соответствии с прилагаемой инструкцией (рекомендуется использовать набор для ОТ-ПЦР в реальном времени).

Таблица 1 – Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 1)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G1-F	ACW TAC CAA TAA CAG GAT CAA TGG A	G1
G1-R	AAT GAI TCR TTC CAK TCA CCA TCA	
G1-P	FAM-TCC AAC WGA AGC AAG TAC TCA AA- BHQ1	
G2-F	GCA TCI GAR TTA GCA GRT CTT A	G2
G2-R	TAC CGT GCA GTC IGT TCC CAT	
G2-P	HEX-CCA TAG GAT TGC ACA GCC A-BHQ1	
G12-F	TGG TTA TGT AAT CCA TGG ACG	G12
G12-R	AAT GTT GYG GAC GTC GGT TGT	
G12-P	Cy3.5-CCC ATT GAT ATC CAT TTA TT-BHQ2	
G8-F	CCA GTT GGC CAY CCT TTT GT	G8
G8-R1	TTG TCA CAC CAT TTG TRA ATT C	
G8-R2	TTG TCA CAC CAT TCG TAA ACT C	
G8-P	Cy5.5-TTC CAY GAA CTA TCW GCT AT- BHQ2	
NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 2 – Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 2)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G3-F	ACG AAC TCA ACR CGA GAG G	G3
G3-R	GTT GCT GCT TCA GTT GGG TAA TA	
G3-P	FAM-TTC CTR ACT TCG ACT TTA TGT TT- BHQ1	
G4-F	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	G4
G4-R	ATC AGA AGC TCC AAC TCA AA	
G4-P	HEX-ATA AAC TGA ACC TGT CGG CC-BHQ1	
G9-F1	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAY AAA TAC	G9
G9-F2	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAC GAG TAC	
G9-R	TGY AGT AGT TGG ATC YGC TGT A	
G9-P	Cy3.5-TCT AAC ACA TCT GAG CCA CC-BHQ2	
G10-F	GAC GAA GCA AAY AAA TGG ATA GC	G10
G10-R	TGA CAT CCT ATY CCT AGY GTT T	
G10-P	Cy5.5-CAT GAT TGT CCC ATY GCT- BHQ2	
NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 3 – Праймеры и зонды для определения Р-генотипа ротавируса (панель 3)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
P[8]-F	TGG RTT RAC NTG CGG TTC AA	P[8]
P[8]-R	GAC GGT CCT TAT CAG CCT ACT AC	
P[8]-P	FAM-AAT AGT GAC TTT TGG ACT GCA G-BHQ1	
P[4]-F	TCC GCA GTA YTY GAA CTA TCA G	P[4]
P[4]-R	GAC GGA CTY TAA CCT CTA AYA ATA G	
P[4]-P	HEX-TTC ATG GTG AAA CAC CAA CAG-BHQ1	
P[6]-F	TTA ATC CCG GAC CRT TTG C	P[6]
P[6]-R	ACA ACT TGT TGA TTA GTT GGA TTC	
P[6]-P	Cy5-TCA CTT CCC CAT GAC TCC AA-BHQ2	
P[9]-F	TGA GAC MTG YAA TTG GAC ATT TTG	P[9]
P[9]-R	GAA GGR AAA GTT GCT GAA GGT A	
P[9]-P	Cy3.5-AAG RCA ATA CGT ATT AGA TGG-BHQ2	
P[10]-F	CTG ACC ACC GTG CTT CAT TA	P[10]
P[10]-R	TGA AAA CCA CRT CAT CAG GAA	
P[10]-P	Cy5.5-TAT CAG AGC CAA AAC TCT ATG G-BHQ2	

При восстановлении олигонуклеотидов из лиофилизированного состояния, каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в деионизированной воде для достижения концентрации 100 мкМ/мкл для праймеров и 10 мкМ/мкл для зондов. Отдельно готовят смеси праймеров (табл. 4) и реакционные смеси, содержащие ферменты и зонды (табл. 5).

Таблица 4 – Состав смеси праймеров для панелей 1-3

Панель 1		Панель 2		Панель 3	
Название (конц. 100 мкМ)	Объем, мкл	Название (конц. 100 мкМ)	Объем, мкл	Название (конц. 100 мкМ)	Объем, мкл
G1-F	0,15	G3-F	0,15	P[4]-F	0,15
G1-R	0,15	G3-R	0,15	P[4]-R	0,15
G2-F	0,15	G4-F	0,15	P[6]-F	0,15
G2-R	0,15	G4-R	0,15	P[6]-R	0,15
G12-F	0,15	G9-F1	0,15	P[8]-F	0,15
G12-R	0,15	G9-F2	0,15	P[8]-R	0,15
G8-F	0,15	G9-R	0,15	P[9]-F	0,15
G8-R1	0,15	G10-F	0,15	P[9]-R	0,15
G8-R2	0,15	G10-R	0,15	P[10]-F	0,15
NSP3-F	0,15	NSP3-F	0,15	P[10]-R	0,15
NSP3-R	0,15	NSP3-R	0,15	вода	6,0
вода	5,85	вода	5,85	Всего:	7,5
Всего:	7,5	Всего:	7,5		

Таблица 5 – Реакционные смеси, содержащие зонды, для панелей 1-3

Панель 1		Панель 2		Панель 3	
Название компонента	Объем, мкл	Название компонента	Объем, мкл	Название компонента	Объем, мкл
G1-P (10 мкМ)	0,5	G3-P (10 мкМ)	0,5	P[8]-P (10 мкМ)	0,5
G2-P (10 мкМ)	0,5	G4-P (10 мкМ)	0,5	P[4]-P (10 мкМ)	0,5
G12-P (10 мкМ)	0,5	G9-P (10 мкМ)	0,5	P[6]-P (10 мкМ)	0,5
G8-P (10 мкМ)	0,5	G10-P (10 мкМ)	0,5	P[9]-P (10 мкМ)	0,5
NSP3-P (10 мкМ)	0,5	NSP3-P (10 мкМ)	0,5	P[10]-P (10 мкМ)	0,5
2X буфер*	12,5	2X буфер*	12,5	2X буфер*	12,5
Ферменты*	0,5	Ферменты*	0,5	Ферменты*	0,5
Всего:	15,5	Всего:	15,5	Всего:	15,5

Примечание: * - компоненты коммерческого набора для одностадийной ОТ-ПЦР

В пробирки вносят по 7,5 мкл соответствующей смеси праймеров и добавляют по 2 мкл выделенной РНК. Смесь инкубируют 5 мин при 95°C, затем быстро охлаждают на льду. Далее в каждую пробирку вносят по 15,5 мкл реакционной смеси, содержащей соответствующие зонды, и инкубируют в следующих условиях: обратная транскрипция 20 мин при 50°C, активация ДНК-полимеразы 2 мин при 95°C и 45 циклов амплификации (15 с при 95°C и 1 мин при 60°C). Считывание флуоресценции рекомендуется установить с 6 цикла.

Контроль качества реакции

Реакция подлежит учету при следующих условиях:

- отрицательный контроль реакции - отрицательный (сигнал флуоресценции отсутствует по всем каналам);
- автоматически определенная пороговая линия располагается в пределах экспоненциальной фазы амплификации;
- в положительном контроле сигнал флуоресценции присутствует по каналам, в соответствии с генотипом вируса; значение порогового цикла C_t положительного контроля не выше 35.

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

1.4 Анализ и интерпретация результатов

Результат амплификации по каналу 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. Если изложенные критерии соблюдены, рекомендуется заполнить таблицу 6 для установления генотипа вируса и интерпретации результатов (табл. 7).

Таблица 6 – Учет результатов генотипирования ротавируса

Номер пробы:			Генотип:					
Панель 1			Панель 2			Панель 3		
Генотип	Флуорофор	Ct	Генотип	Флуорофор	Ct	Генотип	Флуорофор	Ct
G1	FAM		G3	FAM		P[8]	FAM	
G2	HEX		G4	HEX		P[4]	HEX	
G12	Cy3.5		G9	Cy3.5		P[6]	Cy3.5	
G8	Cy5.5		G10	Cy5.5		P[9]	Cy5.5	
NSP3	Cy5		NSP3	Cy5		P[10]	Cy5	

Таблица 7 – Интерпретация результатов

	Результат детекции			Заключение
	NSP3	G	P	
1	+	+	+	Установлен генотип по двум генам
2	+	+	-	P-генотип не установлен. Вероятно, он является редко встречающимся и не может быть определен данными праймерами – необходимо секвенирование
3	+	-	+	G-генотип не установлен. Вероятно, он является редко встречающимся и не может быть определен данными праймерами - необходимо секвенирование
4	+	-	-	Ротавирус нетипируемый по двум генам, либо если значение Ct для NSP3 выше 40, ротавирусная РНК присутствует в очень низкой концентрации.
5	-	+	+	Нелогичный результат, исследовать повторно
6	-	+	-	Нелогичный результат, исследовать повторно
7	-	-	+	Нелогичный результат, исследовать повторно
8	-	-	-	РНК ротавируса не обнаружена

Наличие положительного результата более чем для одного G или P генотипа свидетельствует о присутствии смеси вирусов нескольких генотипов в одной пробе.

**Перечень возможных ошибок при постановке ПЦР
в режиме реального времени**

Все пробы в ПЦР отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности.
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировала или не была внесена.
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Реагенты контаминированы; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации.