

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –

Главный государственный

санитарный врач Республики Беларусь

А. А. Тарасенко

«19» 12 2023 г

Регистрационный № 005-0623



МЕТОД МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ КИШЕЧНОЙ
ИНФЕКЦИИ НЕУТОЧНЕННОЙ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ: к.б.н. Н.В. Поклонская, д-р мед. наук, проф.
Т.В. Амвросьева, Ю.А. Шилова.

Минск 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АиВ	-	аичи вирус человека
АсВ	-	астровирус человека
БоВ	-	бокавирус человека
ВКО	-	внутренний контрольный образец
К+	-	положительный контроль этапа ПЦР
К-	-	отрицательный контроль этапа ПЦР
ОКО	-	отрицательный контрольный образец
ОТ-ПЦР	-	полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции
ПБРВ	-	пикобирнавирус
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
ПЭВ	-	парэховирус
СпВ	-	саповирус

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод мультиплексной ПЦР для диагностики острых кишечных инфекций (ОКИ), вызванных астровирусами, саповирусами, парэховирусами, аичи вирусами, бокавирусами, пикобирнавирусами, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику ОКИ. Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-вирусологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь детям и взрослым в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделения дневного пребывания.

1 ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Симптомы острого гастроэнтерита, отрицательный результат лабораторного исследования кала в отношении рота-, норо-, адено-, энтеровирусной инфекции, проведенный методом ПЦР, ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

2 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

отсутствуют.

3 ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ

3.1 Изделия медицинской техники

Амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени;

бокс лабораторный с УФ-лампой для проведения ПЦР-анализа;

термостат твердотельный;

микроцентрифуга (60 - 14000 g);

миницентрифуга-вортекс;

центрифуга настольная лабораторная (60 - 2000 g);

холодильник (+2... +8 °C) с морозильной камерой (минус 16...минус 20 °C);

дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10 мкл, 2 - 20 мкл, 20 - 200 мкл, 100 - 1000 мкл).

3.2 Изделия медицинского назначения

Наборы реагентов для выделения РНК/ДНК из биологического материала/объектов окружающей среды и пищи;

ОКО (ТрисEDTA-буфер, pH 8,0);

олигонуклеотиды специфические немодифицированные;

олигонуклеотиды специфические модифицированные;

набор для ОТ-ПЦР в одной пробирке;

К+ПЦР (pJET1.2AS, pJET1.2Sapo, pJETparechoAN, pJET1.2PBiR, pJET1.2BoV, pJET1.2AiV, pJET1.2PBiR);

экзогенный ВКО (армированная РНК фага MS2 с концентрацией не менее 10^4 ГЭ/мл);

стерильная вода для молекулярной биологии;

пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» (1,5 мл)

сертифицированные на отсутствие РНК-аз, ДНК-аз, пирогенов;

микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу используемого амплификатора (0,1 мл, 0,2 мл), сертифицированные на отсутствие РНК-аз, ДНК-аз, пирогенов;

стерильные пластиковые наконечники с аэрозольным фильтром, совместимые с имеющимися пипеточными дозаторами;

перчатки защитные одноразовые.

3.3 Последовательности праймеров, используемых для мультиплексной ПЦР

Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для детекции АиВ, АсВ, БоВ, ПБРВ, ПЭВ, СпВ.

№ п/п	Возбудитель	Последовательность праймеров, 5'→3'	Условное обозначение
1.	АиВ	GTCTCCACHGACACYAAYTGGAC	AiV-AB-F
2.		GTTGTACATRGACAGCCCAGG	AiV-AB-R
3.		ROX-TTYTCCTTYGTGCGTGC-BHQ2	AiV-AB-TP Pr
4.	АсВ	TCTYATAGACCGYATTATTGG	AsVs F
5.		TCAAATTCTACATCATCACCAA	AsVas R
6.		ROX-CCCCADCCATCATCATCTTCATCA-BHQ2	ASTV probe Pr
7.	БоВ	TCAAAYGGTGCTGAYRYWAC	BVrt F
8.		TGYTCDCCATCACAAAADATG	BVrt R
9.		FAM-AACAAYGACCTHACAGCWGG-BHQ1	BVrt Pr
10.	ПБРВ	GGGTGGTGTGGATGTTTC	PBiRNA1 F
11.		TTAAARTGYTGGTTCGAACTT	PBiRNA1 R
12.		ROX-TCCATGCTAACCCAMGCWGG-BHQ2	PBiRNA1 Pr
13.	ПЭВ	AGTTGTAAGGCCCACGAAG	PE505 F
14.		CCCCAGATCAGATCCATAGT	PE577 R
15.		Cy5-CCAGAAGGTACCCGTAGGTAACAAGHGA-BHQ2	PE529p Pr
16.	СпВ	ACCAGGCTCTCGCCACCTA	SLVfA F
17.		GCCCTCCATYTCAAACACTAWTTT	SLVr R
18.		FAM-CTGTACCACCTATGAACCA-BHQ1	SLVz Pr

4 ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, включает 5 этапов:

- получение проб и пробоподготовка;
- приготовление пулов;
- выделение РНК/ДНК;
- ОТ-ПЦР;
- учет и интерпретация результатов

4.1 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При проведении экстракции РНК/ДНК должны соблюдаться правила работы с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами 1-2 групп риска в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению

их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2. Утилизация отходов, образующихся в процессе работы должна осуществляться в соответствии с санитарными нормами и правилами «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

4.2 ПОЛУЧЕНИЕ ПРОБ И ПРОБОПОДГОТОВКА

Взятие биологического материала осуществляется в течение 1 - 4, но не позднее 7 суток с момента появления симптомов острого гастроэнтерита.

Пробоподготовка и хранение биологического материала, а также образцов из эпидемически значимых объектов окружающей среды осуществляется в соответствии с требованиями, указанными в таблице 2.

Таблица 2 – Виды материала, его пробоподготовка и условия хранения

Вид материала	Пробоподготовка	Условия хранения
1	2	3
Фекалии	В пробирку объемом 1,5 мл вносится 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида) и 0,1 г (0,1 мл) фекалий (пипеткой со стерильным наконечником, или стерильным шпателем) и тщательно ресуспендируется на вортексе до образования гомогенной суспензии.	+2...+8 °С – до 1 суток, минус 16... минус 20 °С – до 1 года
Копрофилтрат 10%	Не требуется	

1	2	3
Смывы с поверхностей объектов среды обитания человека ¹ Вода питьевая (в системе централизованного и децентрализованного водоснабжения), вода водоисточников, открытых водоемов, плавательных бассейнов ¹	Для смывов - в соответствии с инструкцией по применению «Методы отбора и концентрирования проб из объектов среды обитания человека для проведения санитарно-вирусологических исследований» (25.03.2014 № 016-1213). Для проб воды - в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (12.04.2005 № 134-1204, разделы 5.3.1, 6.6, 6.7) и инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (02.12.2010 № 112-1210, раздел 4.3.1)	
Пищевая продукция ¹	В соответствии с инструкцией по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателям» (11.08.2009 № 016-1208)	

¹ исследования проводятся в случае необходимости установления фактора передачи групповой заболеваемости ОКИ

4.3 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПУЛОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЗНАЧИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА ПРОБ (20 И БОЛЕЕ)

Если необходимо провести исследование большого количества проб (более 20) целесообразно осуществлять их пулирование (смешивание нескольких разных проб в одной пробирке) по 5 образцов. Схема составления пулов представлена в таблице 3. Для формирования пула смешивают в 1 пробирке по 20 мкл каждого из 5 образцов, затем из 100 мкл получившегося пула выделяют РНК/ДНК, которые используют для постановки ОТ-ПЦР. При получении положительного результата для конкретного пула в отношении определенного возбудителя, необходимо произвести детекцию данного возбудителя в каждой из проб, входящих в пул, по отдельности.

Таблица 3 – Схема составления пулов

Номер пула	Номера проб
1	2

1	2				
П1	1	2	3	4	5
П2	6	7	8	9	10
П3	11	12	13	14	15
П4	16	17	18	19	20
П5	21	22	23	24	25

При необходимости хранения в течение более длительного времени образцы и/или пулы замораживают и хранят в морозильнике при температуре минус 16...минус 24 °С, не рекомендуется повторное замораживание-оттаивание.

4.4 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК

Вид используемого набора для выделения РНК/ДНК определяется типом исследуемого образца. В инструкции к набору должна быть отражена возможность его использования при исследовании того типа материала, к которому принадлежат исследуемые образцы. При выделении отдельную пробирку отводят для отрицательного контроля выделения, в нее вносят 10 мкл экзогенного ВКО (армированная РНК фага MS2) и ОКО в количестве, согласно инструкции по применению набора. В остальные пробирки вносят по 10 мкл экзогенного ВКО и исследуемые пробы в количестве согласно инструкции по применению набора.

4.3 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ С РЕАКЦИЕЙ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Для проведения исследований на весь спектр возбудителей подготавливаются ОТ-ПЦР-смеси с праймерами и зондами со следующей комбинацией маркеров детекции возбудителей: ВКО (FAM)+ПБРВ (ROX) (таблица 4), БоВ (FAM) + АиВ (ROX) (таблица 5), СпВ (FAM) + АсВ (ROX) + ПЭВ (Cy5) (таблица 6).

Таблица 4 – Состав и концентрация компонентов реакционной смеси для детекции ВКО и ПБРВ

Наименование компонента	Обозначение	Конечная концентрация
Праймер для ВКО (Прямой)	M2S3F	0,4 пмоль/мкл
Праймер для ВКО (Обратный)	M2S3R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд ВКО, FAM	M2S3Pr	0,2 пмоль/мкл
Специфический праймер ПБРВ (Прямой)	PBiRNA1 F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер ПБРВ(Обратный)	PBiRNA1 R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, ПБРВ ROX	PBiRNA1 Pr	0,4 пмоль/мкл
Набор для ОТ-ПЦР в одной пробирке	Mix	1x
Хлорид магния	MgCl ₂	2 mM
Вода деионизированная	H ₂ O	Довести до 15 мкл на реакцию

Таблица 5 – Состав и концентрация компонентов реакционной смеси для детекции БоВ и АиВ в мультиплексном формате

Наименование компонента	Обозначение	Конечная концентрация
Специфический праймер БоВ (Прямой)	BVrt F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер БоВ (Обратный)	BVrt R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд БоВ, FAM	BVrt Pr	0,2 пмоль/мкл
Специфический праймер АиВ (Прямой)	AiV-AB-F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер АиВ (Обратный)	AiV-AB-R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, АиВ ROX	AiV-AB-TP Pr	0,2 пмоль/мкл
Набор для ОТ-ПЦР в одной пробирке	Mix	1x
Хлорид магния	MgCl ₂	4 mM
Вода деионизированная	H ₂ O	Довести до 15 мкл на реакцию

Таблица 6 – Состав и концентрация компонентов реакционной смеси для детекции СпВ, АсВ, ПЭВ в мультиплексном формате

Наименование компонента	Обозначение	Конечная концентрация
Специфический праймер СпВ (Прямой)	SLVfa F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер СпВ (Обратный)	SLVr R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, СпВ FAM	SLVz Pr	0,2 пмоль/мкл
Специфический праймер АсВ (Прямой)	AsVs F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер АсВ (Обратный)	AsVas R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, АсВ ROX	ASTV probe Pr	0,2 пмоль/мкл
Специфический праймер ПЭВ (Прямой)	PE505 F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер ПЭВ (Обратный)	PE577 R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, ПЭВ Cy5	PE529p Pr	0,2 пмоль/мкл
Набор для ОТ-ПЦР в одной пробирке	Mix	1x
Хлорид магния	MgCl ₂	4 mM
Вода деионизированная	H ₂ O	Довести до 15 мкл на реакцию

При необходимости проведения исследования в отношении 1 возбудителя (в моноплексном формате), готовится реакционная смесь,

включающую праймеры и зонд с меткой FAM для ВКО и диагностические праймеры для возбудителя с меткой ROX, реагенты для проведения ОТ-ПЦР (таблица 7).

Таблица 7 – Состав и концентрация компонентов реакционной смеси для детекции возбудителя (АиВ/АсВ/БоВ/ПБРВ/ПЭВ/СпВ) в моноплексном формате

Наименование компонента	Обозначение	Конечная концентрация
Праймер для ВКО (Прямой)	M2S3F	0,4 пмоль/мкл
Праймер для ВКО (Обратный)	M2S3R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд ВКО, FAM	M2S3Pr	0,2 пмоль/мкл
Специфический праймер (Прямой)	F	0,4 пмоль/мкл
Специфический праймер (Обратный)	R	0,4 пмоль/мкл
Специфический зонд, ROX	Pr	0,2 пмоль/мкл*
Набор для ОТ-ПЦР в одной пробирке	Mix	1x
Хлорид магния	MgCl ₂	4 мМ*
Вода деионизированная	H ₂ O	Довести до 15 мкл на реакцию

*для ПБРВ конечная концентрация зонда – 0,4 пмоль/мкл, MgCl₂ – 2 мМ

Общее количество реакций N рассчитывается отдельно для каждой ОТ-ПЦР смеси:

$N = \text{кол-во образцов биологического материала} + 1\text{«ОКВ»} + 1\text{«К-»} + 1 \times \text{«К+»} + 1$, где ОКВ – отрицательный контроль выделения, К- – отрицательный контроль ОТ-ПЦР, X – количество детектируемых возбудителей в ОТ-ПЦР смеси/ВКО, К+ – положительный контроль ОТ-ПЦР

Режим ОТ-ПЦР для мультиплексной детекции СпВ + АиВ, БоВ+АсВ+ ПЭВ, а также для моноплексной детекции АиВ/АсВ/БоВ/ПЭВ/СпВ представлен в таблице 8, режим ОТ-ПЦР для детекции ПБРВ и ВКО – в таблице 9.

Таблица 8 – Режим ОТ-ПЦР для детекции РНК/ДНК
АиВ/АсВ/БоВ/ПЭВ/СпВ

Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	52°C*	15 мин	-	1
2	95°C	5 мин	-	1
3	95°C	10 сек	-	45
	55°C	30 сек (детекция флуоресцентного сигнала)	FAM, ROX, Cy5	
	67°C*	15 сек	-	

* в зависимости от условий, указанных в инструкции к «набору для ОТ-ПЦР»

Таблица 9 – Режим ОТ-ПЦР для детекции РНК ПБРВ

Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	52°C*	15 мин	-	1
2	95°C	5 мин	-	1
3	95°C	10 сек	-	45
	52°C	30 сек (детекция флуоресцентного сигнала)	FAM, ROX	
	67°C*	15 сек	-	

* в зависимости от условий, указанных в инструкции «набору для ОТ-ПЦР»

В программу термоциклера вносятся идентификационные номера исследуемых образцов, ОКВ, К-, а также положительных контролей – К+, для каждой из смесей реакций АсВ, СпВ, ПЭВ, АиВ, БоВ и ПБРВ – pJET1.2AS, pJET1.2Sapo, pJETparechoAN, pJET1.2AiV, pJET1.2BoV, pJET1.2PBiR, соответственно.

4.4 УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

После окончания ОТ-ПЦР проводится анализ и учет полученных результатов в соответствии с настройками используемого термоциклера. Пороговое значение составляет

о следующими настройками:

- активируется нажатием в меню кнопки Analysis/Анализ, выбрать режим анализа Quantitation/Количественный;
- отменяется автоматический выбор уровня пороговой линии Threshold/Порог;

- в меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должны быть активироваться кнопки Dynamic tube/Динамич.фон, Slope Correct/Коррект.уклона;
- в меню «Outlier Removal» / «Устранение выбросов» устанавливается значение 10%;
- в меню CT Calculation/Вычисление СТ (в правой части окна) выставляется уровень пороговой линии Threshold/Порог в значении 0,05.

Каналы, по которым регистрируют накопление продукта амплификации, для детекции РНК/ДНК различных возбудителей и ВКО приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Учет результатов по каналам FAM, ROX, Cy5 в зависимости от используемой смеси ОТ-ПЦР

Тип смеси ОТ-ПЦР	Детекция по каналу FAM	Детекция по каналу ROX	Детекция по каналу Cy5
ВКО+АиВ	ВКО	АиВ	-
ВКО+АсВ	ВКО	АсВ	-
ВКО+БоВ	ВКО	БоВ	-
ВКО+СпВ	ВКО	СпВ	-
ВКО+ПБРВ	ВКО	ПБРВ	-
ВКО+ПЭВ	ВКО	ПЭВ	-
БоВ +АиВ	БоВ	АиВ	-
СпВ+АсВ+ПЭВ	СпВ	АсВ	ПЭВ

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая флуоресценции имеет типичный для ОТ-ПЦР в «реальном времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции. Результат

амплификации по каналу считается отрицательным в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct).

РНК/ДНК возбудителей обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу для флуорофора (таблица 10) определяется значение порогового цикла (Ct) - для объектов окружающей среды и пищевой продукции, если значение порогового цикла (Ct) не превышает 38 - для образцов биологического материала.

Результаты реакции считаются достоверными, если для ВКО в пробе и в ОКВ сигнал флуоресценции присутствует по каналу FAM и значение его Ct укладывается в границы $\geq 20 \dots \leq 35$, для К+ ОТ-ПЦР сигнал флуоресценции присутствует по соответствующему каналу (таблица 10) и значение Ct укладывается в ≤ 35 , а для ОКВ и ОКО сигнал флуоресценции по соответствующему возбудителю каналу отсутствует.

5 ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Вид ошибки	Описание ошибки	Путь устранения
Присутствие ингибиторов в пробе	Отсутствие положительного результата по каналу FAM, как указано в п. 7.5	Убедиться в наличии маркировки «DNase, RNase free» на используемых пробирках и наконечниках для дозаторов Убедиться в отсутствии следов дезинфицирующих средств на рабочих поверхностях, штативах и оборудовании. Использовать альтернативный набор для выделения РНК/ДНК. Развести исследуемый образец клинического материала в 2 - 5 раз и повторить процедуру выделения РНК/ДНК.
Перекрестная контаминация	Присутствие положительного результата по каналу ROX в отрицательном контрольном образце.	Строго соблюдать пространственное разделение рабочих зон, использовать отдельные наборы посуды, пипеток и отдельные комплекты спецодежды для каждой из рабочих зон. Соблюдать строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения, в котором
внедрена инструкция

" _____ " _____ 20__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения

2. Кем предложено (наименование учреждения разработчика, автор)

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения
Республики

Беларусь

3. Источник информации

4. Где и когда начато внедрение

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений

6. Результаты применения метода за период с

по

Эффективность внедрения:

7. Замечания, предложения

Дата _____

Ответственные за внедрение _____

должность, Ф.И.О., кафедра

подпись

Акт внедрения направляется организации – разработчику (п.2), п.п. 4-8 заполняются организацией, внедрившей разработку.