

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

Н.П. Жукова

2019 г.

Регистрационный № 001-0419

АЛГОРИТМ УСКОРЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ПОЛИОВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм ускоренной детекции полиовирусов среди других цитопатогенных агентов и идентификации полиовирусов типов 1 и 3 с использованием полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР/РВ). Инструкция предназначена для врачей–вирусологов, врачей–эпидемиологов, врачей–лаборантов, иных врачей–специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих лабораторную диагностику инфекционных заболеваний и санитарно-эпидемиологический надзор.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Полиовирус относится к роду энтеровирусов и включает три типа (1, 2, 3). Ускоренная детекция полиовирусов и установление принадлежности к одному из трех типов вакцинного вируса основано на применении метода ОТ-ПЦР/РВ. С мая 2016 года (после исключения из состава живой вакцины полиовируса типа 2) во всем мире работа с вакцинным ПВ2 проводится в условиях, соответствующих таковым при работе с дикими ПВ. С учетом этого, ОТ-ПЦР/РВ используется только для идентификации вакцинных полиовирусов типов 1 и 3. Любой образец, содержащий полиовирусы, не соответствующие этим штаммам, расценивается как подозрительный на наличие дикого вируса или любого полиовируса типа 2, и подлежит незамедлительному секвенированию для установления происхождения.

Алгоритм ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов основан на одновременном проведении трех реакций, направленных на детекцию пан-энтеровирусов, пан-полиовирусов и вакцинных полиовирусов типов 1 и 3 с последующим комплексным анализом полученных результатов.

1 Показания к применению:

дифференциация полиовирусов среди других цитопатогенных агентов, выделенных в рамках надзора за полиомиелитом в соответствии с СанНиП «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения полиомиелита» (утверждены постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2015 № 137).

Противопоказания отсутствуют.

2 Перечень медицинских изделий, реактивов и приборов

2.1 Приборы:

1. ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
2. пипетки автоматические переменного объема: 2-20, 20-200, 200-1000 мкл;
3. термоциклер с оптическим модулем для проведения ПЦР в режиме реального времени;
4. холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (-20°C и ниже);
5. центрифуга-вортекс;
6. центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 12 тыс. об/мин).

2.2 Медицинские изделия:

1. наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free»;
2. одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки/8-луночные стрипы/96-луночные планшеты объемом 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free» (соответствующие прибору, для ПЦР/РВ);

3. хладоэлемент.

2.3 Реактивы:

1. вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз);
2. набор для выделения РНК;
3. набор для выполнения одностадийной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
4. олигонуклеотиды синтетические для амплификации фрагментов ДНК и зонды, меченные флюорофором.

Описание технологии выполнения алгоритма диагностики

Этап 1. Отбор образцов и выделение полиовируса в культуре клеток

Отбор образцов для выделения полиовируса проводится согласно СанНиП «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения полиомиелита» (утверждены постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2015 № 137).

Выделение полиовируса в культуре клеток проводится в соответствии с Инструкцией по применению «Ускоренное выявление и идентификация полиовирусов», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 17.10.2012 № 005-0611.

Этап 2. Выделение РНК из культуральной жидкости

Пробирки с наличием цитопатогенного агента предварительно замораживают и оттаивают для более полного разрушения вируссодержащих клеток. Для выделения РНК используют коммерческие наборы для выделения РНК, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь. В этап выделения в качестве положительного контроля включают референс-штамм вакцинного полиовируса типа 1, в

качестве отрицательного контроля – деионизованную воду. Выделенные образцы РНК до исследования хранят при температуре -20°C и ниже.

Этап 3. Одностадийная ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК пан-энтеровирусов, пан-полиовирусов, вакцинных полиовирусов типа 1 и типа 3

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов указаны в таблице 1. Все олигонуклеотиды синтезируют в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в деионизированной воде и затем готовят смесь праймеров/зонда в следующей концентрации: для детекции пан-энтеровирусов – 50 пмоль/мкл каждого; для детекции пан-полиовирусов – 50 пмоль/мкл каждого; для детекции вакцинных штаммов типа 1 и типа 3 – 10 пмоль/мкл каждого.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемых для детекции пан-энтеровирусов, пан-полиовирусов и вакцинных полиовирусов типов 1 и 3 в ОТ-ПЦР/РВ

Возбудитель	Название праймера	Последовательность нуклеотидов, 5' → 3'
Пан-энтеровирусы	PAN-EV-F	GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC
	PAN-EV-P	FAM- CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT- BHQ1
	PAN-EV-R	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA
Пан-полиовирусы	PANPV-F	TTGGAGTTCTTCACITAITCIMGITTYGAYATG
	PANPV-P	FAM- TGRTTNARIGCRTGICCRTTRTT- BHQ1
	PANPV-R	GGAGCTCCGGGTGGGAYRTACATATYTGRTAI AC
Полиовирус типа 1	S1 2S	AGG TCA GAT GCT TGA AAG C
	S1 fam	FAM-CGC CCC CAC CGT TTC ACG GA- BHQ1
	S1 1A	CCA CTG GCT TCA GTG TTT
Полиовирус типа 3	S3 2S	AGG GCG CCC TAA CTT T
	S3 hex	HEX-TCA CTC CCG AAG CAA CAG-BHQ2
	S3 1A	TTA GTA TCA GGT AAG CTA TC

В каждую реакцию включают в качестве положительного контроля референс-штамм вакцинного полиовируса типа 1, в качестве отрицательного контроля – деионизованную воду.

Для снижения риска контаминации и повышения чувствительности реакции исследование проводят в однораундовой ОТ-ПЦР/РВ с использованием коммерческих наборов, разрешенных для применения на территории Республики Беларусь, в соответствии с прилагаемой инструкцией (рекомендуется использовать набор для ОТ-ПЦР/РВ, содержащий ингибитор РНКаз).

Из компонентов набора для однораундовой ОТ-ПЦР и праймеров готовят параллельно три реакционные смеси, которые различаются только составом праймеров и зонда (таблица 2). Выделенную РНК добавляют в количестве 1 мкл. Реакцию проводят в объеме 20 мкл.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для детекции пан-энтеровирусов и пан-полиовирусов и идентификации полиовирусов типов 1 и 3

	Реакционная смесь 1 Детекция пан-энтеровирусов (мкл, на 1 реакцию)	Реакционная смесь 2 Детекция пан-полиовирусов (мкл, на 1 реакцию)	Реакционная смесь 3 Идентификация ПВ1 и ПВ3 (мкл, на 1 реакцию)
Вода деионизованная	7,6	7,6	7,6
Буфер 2х	10	10	10
Смесь ферментов (50х)	0,4	0,4	0,4
Смесь праймеров/зонда пан-энтеровирусы (50 пмоль/мкл каждого)	1	0	0
Смесь праймеров/зонда пан-полиовирусы (50 пмоль/мкл каждого)	0	1	0
Смесь праймеров/зонда ПВ1+ПВ3 (10 пмоль/мкл каждого)	0	0	1
РНК	1	1	1
Объем смеси	20	20	20

Все реакции проводят одновременно при одном режиме амплификации в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Режим амплификации для проведения однораундовой ОТ-ПЦР в реальном времени

Обратная транскрипция	50°C – 30 мин	
Активация ДНК-полимеразы	95°C – 2 мин	
Амплификация: 95°C – 15 с 50°C – 45 с 72°C – 5 с	42 цикла	

Детекция флуоресцентного сигнала для реакционных смесей 1 и 2 проводится по каналам для флуорофора FAM, для реакционной смеси 3 - FAM и HEX.

Контроль качества реакции

Реакция подлежит учету при следующих условиях:

- отрицательный контроль реакции - отрицательный (сигнал флюоресценции отсутствует по всем каналам);
- автоматически определенная пороговая линия располагается в пределах экспоненциальной фазы амплификации;
- в положительном контроле сигнал флюоресценции присутствует по каналу FAM (смесь 1 и 2) или каналам FAM и HEX (смесь 3); значение порогового цикла C_t положительных контролей реакций менее 35.

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

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, и значение порогового

цикла C_t ниже 40, отрицательным – в случае отсутствия кривой типичной формы, пересекающейся с пороговой линией (нет значения C_t) или значение порогового цикла C_t равно или выше 40.

Заключение о наличии/отсутствии и типе полиовируса делают в соответствии с алгоритмом ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов и на основании комплексного анализа результатов реакций по выявлению пан-энтеровирусов, пан-полиовирусов, полиовирусов типа 1 и 3 (рисунок, таблица 4).

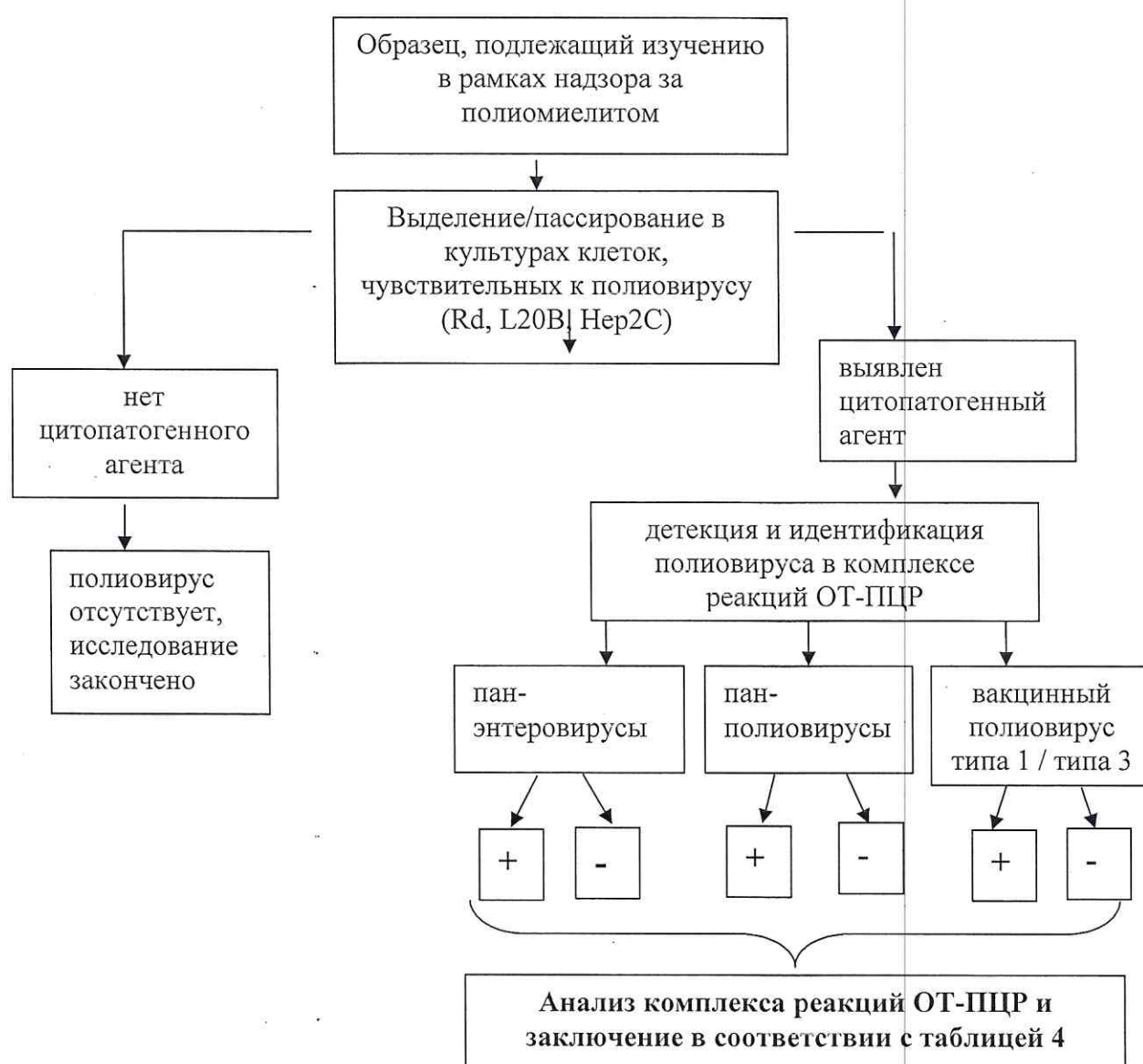


Рисунок – Алгоритм ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов

Таблица 4 – Интерпретация результатов детекции полиовирусов

	Результат идентификации			Окончательное заключение
	пан- энтеровирусов	пан- полиовирусов	вакцинных полиовирусов типа 1 и типа 3	
1	+	+	+	Идентифицирован вакцинный полиовирус типа 1 или 3
2	+	+	-	Идентифицирован полиовирус, тип не установлен. Вероятно наличие дикого вируса или типа 2 – подлежит секвенированию для установления происхождения
3	+	-	-	Идентифицирован неполиомиелитный энтеровирус.
4	-	+	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
5	-	-	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
6	-	+	-	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
7	+	-	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
8	-	-	-	Изолят не относится к энтеровирусам

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 добавлена
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Реагенты контаминированы; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации.