

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 № 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

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм диагностики парэховирусной инфекции (ПЭВИ) который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику парэховирусной инфекции.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-вирусологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарах и/или амбулаторных условиях.

1 ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Вирусная кишечная инфекция неуточненная (МКБ10 – A08.4); диарея и гастроэнтерит предположительно инфекционного происхождения (МКБ10 – A09); острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (МКБ10 – J06); вирусный менингит (МКБ10 – A87); вирусный энцефалит неуточненный (МКБ10 – A86); другие вирусные инфекции центральной нервной системы, не классифицированные в других рубриках (МКБ10 - A88); энтеровирусная инфекция неуточненная (МКБ10 - B34.1); экзантема внезапная (шестая болезнь) (МКБ10 - B08.2); вирусная инфекция, характеризующаяся поражением кожи и слизистых оболочек, неуточненная (МКБ10 - B09); бактериальный сепсис новорожденного неуточненный (МКБ10 - P36.9); лихорадка неясного происхождения (МКБ10 - R50); судороги новорожденного (МКБ10 - P90); судороги, не классифицированные в других рубриках (МКБ10 - R56); судороги при лихорадке (МКБ10 - R56.0); другие неуточненные судороги (МКБ10 - R56.8)

2 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ: отсутствуют.

3 ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, РЕАКТИВОВ

Медицинская техника:

– амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени;

- бокс лабораторный с УФ-лампой для проведения ПЦР-анализа;
- термостат твердотельный;
- микроцентрифуга (1000 - 14000 об/мин);
- миницентрифуга-вортекс;
- центрифуга настольная лабораторная (1000 - 5000 об/мин);
- холодильник (от +2°C до +8°C) с морозильной камерой (от -16°C до -20 °C);
- дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10 мкл, 2 - 20 мкл, 20 - 200 мкл, 100 - 1000 мкл).

Изделия медицинского назначения:

- пробирки пластиковые стерильные типа «Эппендорф» (1,5 мл);
- микропробирки для проведения ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,1 мл, 0,2 мл), стерильные, свободные от нуклеаз;
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных с фильтром, стерильные, свободные от нуклеаз;
- набор универсальных контрольных образцов для детекции РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР;
- набор реагентов для выделения РНК;
- набор реагентов для обратной транскрипции;
- набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции парэховирусов (последовательности представлены в Таблице 2);
- набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени, содержащий ДНК-полимеразу, 10x буфер для ПЦР, 10mM смесь дНТФ и 50mM MgCl₂;
- транспортная среда для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей;

- транспортная среда для стабилизации РНК.

Реактивы:

- вода деионизированная, стерильная, свободная от нуклеаз;
- 3% перекись водорода;

4 ТЕХНОЛОГИЯ РЕАЛИЗАЦИИ АЛГОРИТМА

Алгоритм, изложенный в настоящей инструкции, включает 5 этапов:

- получение проб и пробоподготовка;
- выделение РНК;
- реакция обратной транскрипции;
- полимеразная цепная реакция;
- молекулярное типирование нуклеотидных последовательностей парэховирусов.

Схематично алгоритм генодиагностики парэховирусной инфекции представлен на рисунке.

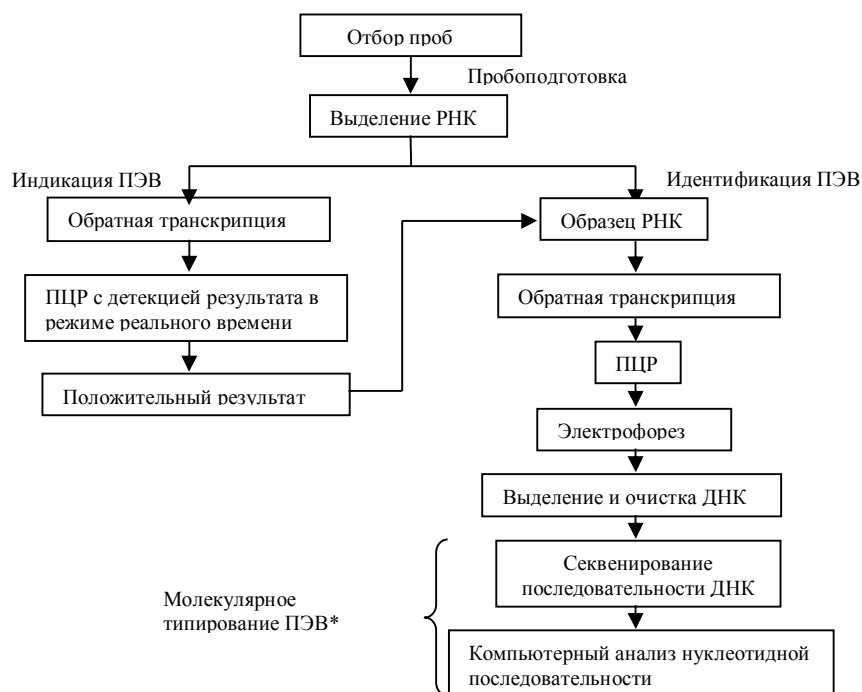


Рисунок 1 – Схема генодиагностики парэховирусной инфекции.

*Примечание – Выполняется на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

5 ОТБОР ПРОБ И ПРОБОПОДГОТОВКА

5.1 Сроки взятия и виды биологического материала

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

Виды исследуемого материала представлены в таблице 1.

Таблица 1 Виды биологического материала для лабораторного исследования

Код МКБ 10	Вид биологического материала для исследований				
	Фекалии	Мазок из ротоглотки	Сыворотка крови	СМЖ	Патолого-анатомический материал
Вирусная кишечная инфекция неуточненная (МКБ10 – A08.4) Диарея и гастроэнтерит предположительно инфекционного происхождения (МКБ10 – A09)	+	-	-	-	-
Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (МКБ10 – J06)	-	+	+	-	+
Энтеровирусная инфекция неуточненная (МКБ10 – B34.1; Экзантема внезапная (шестая болезнь) (МКБ10 – B08.2) Вирусная инфекция, характеризующаяся поражением кожи и слизистых оболочек, неуточненная (МКБ10 – B09)	-	+	+	-	+
Лихорадка неясного происхождения (МКБ10 – R50); Судороги новорожденного (МКБ10 – P90); Судороги, не классифицированные в других рубриках (МКБ10 – R56); Судороги при лихорадке (МКБ10 – R56.0); Другие	-	-	+	-	+

неуточненные судороги (МКБ10 – R56.8)					
Вирусный менингит (МКБ10 – A87); Вирусный энцефалит неуточненный (МКБ10 – A86); Другие вирусные инфекции центральной нервной системы, не классифицированные в других рубриках (МКБ10 – A88)	-	-	+	+	+
Бактериальный сепсис новорожденного неуточненный (МКБ10 – P36.9)	-	-	+	-	+

У пациентов с вирусным менингитом (МКБ10 – A87), вирусным энцефалитом неуточненным (МКБ10 – A86), другими вирусными инфекциями центральной нервной системы, не классифицированными в других рубриках (МКБ10 – A88), судорогами новорожденного (МКБ10 – P90), а также у детей до 3 месяцев с лихорадкой неясного происхождения (МКБ10 – R50), судорогами, не классифицированными в других рубриках (МКБ10 – R56); судорогами при лихорадке (МКБ10 – R56.0), другими неуточненными судорогами (МКБ10 – R56.8) обязательным материалом для исследования является сыворотка крови.

5.2 Пробоподготовка

Образцы СМЖ не требуют предварительной пробоподготовки.

Образцы цельной крови инкубируют в течение 30 мин при температуре 37⁰С, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут, после чего сыворотку отбирают в стерильную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл

Свежий или фиксированный в транспортной среде для стабилизации РНК образец патолого-анатомического материала извлекают в стерильную чашку Петри и с помощью стерильных ножниц/скальпеля и пинцета отделяют фрагмент 5x5x2 мм (около 100 мг). Помещают его в

пробирку, содержащую 1,0 мл физиологического раствора, и гомогенизируют с помощью механического гомогенизатора. Полученную 10% суспензию осветляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин и используют для выделения РНК.

Мазки из ротоглотки берут сухим зондом вращательными движениями с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой. После взятия материала тампон помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей (или физиологического раствора). Конец зонда отломить или отрезать, с расчётом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки.

Образцы фекалий для исследования используют в виде 10% суспензии. Для приготовления суспензии в пробирку объемом 1,5 мл вносят 0,9 мл физиологического раствора и 0,1 г (0,1 мл) фекалий (пипеткой со стерильным наконечником, или стерильным шпателем) и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 7000 об/мин в течение 5 мин, супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку. Перед проведением исследования отбирают 0,1 мл супернатанта и смешивают с 0,1 мл физиологического раствора. Эту пробу используют для выделения РНК.

6 ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

Выделение РНК осуществляют с помощью коммерческих наборов, предназначенных для выделения из данного вида биологического материала в соответствии с инструкцией производителя. До начала процедуры выделения к исследуемому образцу добавляют внутренний контрольный образец (ВКО), входящий в состав набора универсальных

контрольных образцов для детекции РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР, из расчета 1 часть ВКО к 9 частям исследуемого образца.

7 РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием коммерческих наборов в соответствии с прилагаемой инструкцией.

8 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Постановку ПЦР в режиме реального времени проводят с использованием набора олигонуклеотидных праймеров и зондов, набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени и набора универсальных контрольных образцов для детекции РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР.

8.1 Олигонуклеотидные праймеры

Нуклеотидные последовательности праймеров для детекции парэховирусов с помощью ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции, локализованные в 5' нетранслируемом регионе генома ПЭВ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры для детекции парэховирусов

Название	Последовательность, 5'→3'	Модификация 5'	Модификация 3'	Ориентация
PE505	AGTTGTAAGGCCACGAAG	-	-	Прямой
PE529p	CCAGAAGGTACCCGTAGGTAACA AGHGA	ROX	BHQ-2	Зонд (прямой)
PE577	CCCCAGATCAGATCCATAGT	-	-	Обратный

8.2 Постановка ПЦР

В рабочей зоне для приготовления ПЦР-смесей готовят ПЦР-смесь, состав которой изложен в Таблице 3:

Таблица 3 – Состав реакционных смесей для постановки ПЦР

Наименование реагента	Количество на одну пробирку	Количество на N пробирок
10x ПЦР буфер (входит в состав набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени)	2,5 мкл	2,5 мкл x ($N+1$)
50 mM $MgCl_2$ (входит в состав набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени)	2 мкл	2 мкл x ($N+1$)
10mM дНТФ (входит в состав набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени)	0,5 мкл	0,5 мкл x ($N+1$)
10 mM праймер PE505	1 мкл	1 мкл x ($N+1$)
10 mM праймер PE577	1 мкл	1 мкл x ($N+1$)
5 mM зонд PE529p	1 мкл	1 мкл x ($N+1$)
Смесь олигонуклеотидов для детекции ВКО (входит в состав набора универсальных контрольных образцов для детекции РНК-содержащих вирусов методом ОТ-ПЦР)	1 мкл	1 мкл x ($N+1$)
ДНК-полимераза (входит в состав набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени)	0,5 мкл	0,5 мкл x ($N+1$)
Вода деионизированная	5 мкл	5 мкл x ($N+1$)

После приготовления раскапывают ПЦР-смесь по 15 мкл на N пробирок с учетом положительного и отрицательного контрольных образцов. На следующем этапе маркируют пробирки, после чего вносят по 10 мкл проб кДНК после обратной транскрипции в пробирки с ПЦР-смесью. Программируют термоциклер в соответствии с режимом амплификации, указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Режим амплификации

Шаг цикла	Температура	Время	Количество циклов
Преденатурация	95 ⁰ С	5 минут	1
Денатурация	95 ⁰ С	15 сек	45
Отжиг	58 ⁰ С	45 сек	
Детекция флюоресцентного сигнала			

Устанавливают пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Запускают выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется: для ВКО – по каналу для флуорофора FAM, для кДНК ПЭВ – по каналу для флуорофора ROX.

8.3 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (ВКО) и ROX (кДНК ПЭВ).

Для проведения анализа на приборе (RotorGene, или аналогичный) должны быть установлены следующие настройки:

- «Dynamic tube»/ «Динамический фон» – включить
- «Slope correct»/ «Коррекция уклона» – включить
- «Outlier Removal» / «Устранение выбросов»– значение NTC threshold/Порог фона – 10%
- «CT Calculation» / «Вычисление СТ» – значение Threshold/ Порог = 0,05

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы кДНК ПЭВ. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- кДНК ПЭВ обнаружена, если для данной пробы в таблице

результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа, $Ct \leq 38$ – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла $Ct \leq 35$ для приборов планшетного и роторного типов.

- кДНК ПЭВ не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 40$ для приборов планшетного типа, $Ct \leq 38$ – для приборов роторного типа, по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла не определено, или $Ct > 35$ для приборов планшетного и роторного типов.

- Результат реакции не валиден, если в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла не определено, или $Ct > 40$ для приборов планшетного типа, $Ct > 38$ – для приборов роторного типа.

9 МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПАРЭХОВИРУСОВ

Объектами для молекулярного типирования являются образцы биологического материала пациентов, для которых получен положительный результат в отношении РНК парэховируса, выделенная из этих образцов РНК и/или кДНК полученная в результате проведения реакции обратной транскрипции.

Транспортирование образцов осуществляют в термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосе со льдом при температуре 2 - 8°C.

В сопроводительных документах для клинических образцов указывают ФИО пациента, возраст, клинический диагноз, дату

заболевания, вид клинического материала, дату его получения, вид пробоподготовки.

Молекулярное типирование включает 2 этапа:

- секвенирование ДНК, в ходе которого получают фрагмент нуклеотидной последовательности ПЭВ, локализованный в гене, кодирующем основной капсидный белок ПЭВ;
- компьютерный анализ нуклеотидной последовательности, который позволяет сравнить исследуемую нуклеотидную последовательность с последовательностями ПЭВ, выделенных в других странах из базы данных GenBank.

Молекулярное типирование осуществляют в референс-лаборатории по диагностике кишечных вирусных инфекций и санитарной вирусологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Оно направлено на установление генотипа парэховируса, обнаруженного в клиническом материале пациента.

10 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. 7.3	1. Убедиться в наличии маркировки «DNase, RNasefree» на используемых пробирках и наконечниках для дозаторов 2. Убедиться в отсутствии следов дезинфицирующих средств на рабочих поверхностях, штативах и оборудовании, расположенных в 1 и 2 зонах. 3. Использовать альтернативный набор для выделения РНК/ДНК. 4. Развести исследуемый образец клинического материала в 2 - 5 раз и повторить процедуру выделения РНК.

Перекрестная контаминация	Присутствие положительного результата по каналу ROX в отрицательном контрольном образце.	1. Строго соблюдать пространственное разделение рабочих зон, использовать отдельные наборы посуды, пипеток и отдельные комплекты спецодежды для каждой из рабочих зон. 2. Соблюдать строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.
------------------------------	--	--