

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 —  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Н. П. Жукова  
20.06.2019  
Регистрационный № 004-0519

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПАРЭХОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т. В Амвросьева, канд. биол. наук Н. В. Поклонская, Ю. А. Шилова, канд. мед. наук, доц. Е. П. Кишкурно

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.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Медицинская техника:

- амплификатор для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени;
- бокс лабораторный с УФ-лампой для ПЦР-анализа;
- термостат твердотельный;
- микроцентрифуга (1000–14 000 об/мин);
- миницентрифуга-вортекс;
- центрифуга настольная лабораторная (1000–5 000 об/мин);
- холодильник (от 2 до 8 °С) с морозильной камерой (от -16 до -20 °С);
- дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1–10, 2–20, 20–200, 100–1000 мкл).

Изделия медицинского назначения:

- пробирки пластиковые стерильные типа «эппендорф» (1,5 мл);
- микропробирки для ПЦР, соответствующие типу используемого термоциклера (0,1 и 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, 10 mM смесь дНТФ и 50 mM MgCl<sub>2</sub>;
- 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.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Вирусная кишечная инфекция неуточненная (МКБ-10 – А08.4); диарея и гастроэнтерит предположительно инфекционного происхождения (МКБ-10 – А09); острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (МКБ-10 – J06); вирусный менингит (МКБ-10 – А87); вирусный энцефалит неуточненный (МКБ-10 – А86); другие вирусные инфекции центральной нервной системы, не классифицированные в других рубриках (МКБ-10 – А88); энтеровирусная инфекция неуточненная (МКБ-10 – В34.1); экзантема внезапная (шестая болезнь) (МКБ-10 – В08.2); вирусная инфекция, характеризующаяся поражением кожи и слизистых оболочек, неуточненная (МКБ-10 – В09); бактериальный сепсис новорожденного неуточненный (МКБ-10 – Р36.9); лихорадка неясного происхождения (МКБ-10 – R50); судороги новорожденного (МКБ-10 – Р90); судороги, не классифицированные в других рубриках (МКБ-10 – R56); судороги при лихорадке (МКБ-10 – R56.0); другие неуточненные судороги (МКБ-10 – R56.8).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

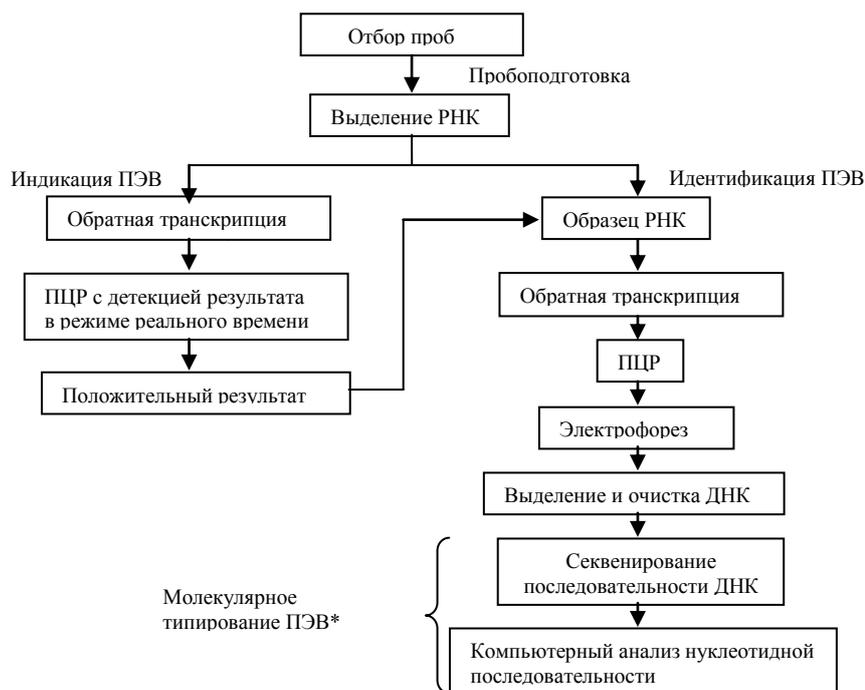
Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Алгоритм, изложенный в настоящей инструкции, включает 5 этапов:

- получение проб и пробоподготовка;
- выделение РНК;
- реакция ОТ;
- ПЦР;
- молекулярное типирование нуклеотидных последовательностей парэховирусов.

Схематично алгоритм генодиагностики парэховирусной инфекции представлен на рисунке (*выполняется на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии*).



**Рисунок — Схема генодиагностики парвовирусной инфекции**

Отбор проб и пробоподготовка

*Сроки взятия и виды биологического материала*

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

Виды исследуемого материала представлены в таблице 1.

**Таблица 1. — Виды биологического материала для лабораторного исследования**

Код МКБ10	Вид биологического материала для исследований				
	Фекалии	Мазок из ротоглотки	Сыворотка крови	Спинно-мозговая жидкость (СМЖ)	Патолого-анатомический материал
Вирусная кишечная инфекция неуточненная (МКБ-10 – A08.4) Диарея и гастроэнтерит предположительно инфекционного происхождения (МКБ-10 – A09)	+	-	-	-	-
Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации (МКБ-10 – J06)	-	+	+	-	+

Продолжение таблицы 1

Энтеровирусная инфекция неуточненная (МКБ-10 – В34.1); Экзантема внезапная (шестая болезнь) (МКБ-10 – В08.2) Вирусная инфекция, характеризующаяся поражением кожи и слизистых оболочек, неуточненная (МКБ-10 – В09)	-	+	+	-	+
Лихорадка неясного происхождения (МКБ-10 – R50); Судороги новорожденного (МКБ-10 – Р90); Судороги, не классифицированные в других рубриках (МКБ-10 – R56);	-	-	+	-	+
Судороги при лихорадке (МКБ-10 – R56.0); Другие неуточненные судороги (МКБ-10 – R56.8)					
Вирусный менингит (МКБ-10 – А87); Вирусный энцефалит неуточненный (МКБ-10 – А86); Другие вирусные инфекции центральной нервной системы, не классифицированные в других рубриках (МКБ-10 – А88)	-	-	+	+	+
Бактериальный сепсис новорожденного неуточненный (МКБ-10 – Р36.9)	-	-	+	-	+

У пациентов с вирусным менингитом (МКБ-10 – А87), вирусным энцефалитом неуточненным (МКБ-10 – А86), другими вирусными инфекциями центральной нервной системы, не классифицированными в других рубриках (МКБ-10 – А88), судорогами новорожденного (МКБ-10 – Р90), а также детей до 3 мес. с лихорадкой неясного происхождения (МКБ-10 – R50), судорогами, не классифицированными в других рубриках (МКБ-10 – R56); судорогами при

лихорадке (МКБ-10 – R56.0), другими неуточненными судорогами (МКБ-10 – R56.8) обязательным материалом для исследования является сыворотка крови.

#### *Пробоподготовка*

Образцы СМЖ не требуют предварительной пробоподготовки.

Образцы цельной крови инкубируют в течение 30 мин при температуре 37 °С, центрифугируют при 1 500 об/мин в течение 10 мин, 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 3 000 об/мин в течение 10 мин и используют для выделения РНК.

Мазки из ротоглотки берут сухим зондом вращательными движениями с поверхности миндалин, небных 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 нужно отломить или отрезать с расчетом, 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 7 000 об/мин в течение 5 мин, супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку. Перед исследованием отбирают 0,1 мл супернатанта и смешивают с 0,1 мл физиологического раствора. Эту пробу используют для выделения РНК.

#### *Выделение РНК*

Осуществляют с помощью коммерческих наборов, предназначенных для выделения из данного вида биологического материала в соответствии с инструкцией производителя. До начала процедуры 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.

#### *Реакция обратной транскрипции*

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

#### *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.

### 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	CCCAGATCAGATCCATAGT	-	-	Обратный

### 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 <sub>2</sub> (входит в состав набора реагентов для ПЦР в режиме реального времени)	2 мкл	2 мкл x (N+1)
10 mM 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 °С	5 мин	1
Денатурация	95 °С	15 с	45
Отжиг <i>Детекция флюоресцентного сигнала</i>	58 °С	45 с	

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

#### *Анализ и интерпретация результатов*

Анализ результатов выполняют с помощью программного обеспечения используемого прибора для ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флюоресцентного сигнала по каналу для флюорофора 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 флюоресценции 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 флюорофора FAM определено значение порогового цикла  $Ct \leq 40$  — для приборов планшетного типа,  $Ct \leq 38$  — для приборов роторного типа; по каналу для флюорофора 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 флюорофора FAM определено значение порогового цикла  $Ct \leq 40$  — для приборов планшетного типа,  $Ct \leq 38$  — для приборов роторного типа, по каналу для флюорофора 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 флюорофора FAM значение порогового цикла не определено, или  $Ct > 40$  для приборов планшетного типа  $ct > 38$  — для приборов роторного типа.

## 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 реакции обратной транскрипции.

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

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.

### ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Вид ошибки	Описание ошибки	Путь устранения
Присутствие ингибиторов в пробе	Отсутствие положительного результата по каналу FAM (анализ и интерпретация результатов)	1. Убедиться в наличии маркировки «DNAse, RNAse free» 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