

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –  
Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

И.В. Гаевский  
« 02 » \_\_\_\_\_ 2014 г.

Регистрационный № 022-1213

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.б.н. Семейко Г.В., к.б.н. Е.Ю. Свирчевская, к.м.н. М.А. Ермолович,  
В.П. Шиманович, д.м.н. Е.О. Самойлович

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра —  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ И.В. Гаевский  
02.06.2014  
Регистрационный № 022-1213

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр  
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Г.В. Семейко, канд. биол. наук Е.Ю. Свирчевская, канд.  
мед. наук М.А. Ермолович, В.П. Шиманович, д-р мед. наук Е.О. Самойлович

Минск 2013

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены серологический, вирусологический и молекулярно-генетический методы лабораторной диагностики эпидемического паротита.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-педиатров, врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения.

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

### **Оборудование:**

- ламинарный бокс с бактерицидной лампой;
- термостат на 37°C;
- инвертированный микроскоп;
- холодильник на 2–8°C;
- морозильник на -20°C;
- вортекс;
- центрифуга низкоскоростная до 3000 об./мин для флаконов 50 мл;
- центрифуга высокоскоростная для пробирок типа «эппендорф» до 13000 об./мин;
- термоциклер для проведения ПЦР;
- весы лабораторные;
- микроволновая печь;
- источник питания для электрофореза;
- камера для горизонтального гель-электрофореза;
- трансиллюминатор;
- спектрофотометр для 96-луночных планшет;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 2 до 20; от 20 до 200; от 100 до 1000 мкл).

### **Материалы:**

- наборы для сбора мазка со слизистой носоглотки для вирусологических исследований или стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке;
- одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2; 0,5; 1,5 мл;
- одноразовые пластиковые центрифужные пробирки объемом 50 мл;
- культуральные флаконы с площадью культивирования 25 см<sup>2</sup> с суточным монослоем культуры клеток;
- одноразовые наконечники с фильтром до 20; 200; 1000 мкл для автоматических дозаторов;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.

### **Реагенты:**

- питательная среда поддерживающая (питательная среда Игла в модификации Дульбеко (ДМЕМ), содержащая 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,2% гентамицина);

- вирусная транспортная среда (раствор Хенкса, содержащий 2% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,2% гентамицина);
- набор для выявления специфических антител к вирусу паротита методом иммуноферментного анализа (ИФА);
- набор для выделения вирусной РНК;
- набор для выполнения полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в один раунд;
- реактивы для проведения ПЦР — фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед./мкл); 10×буфер для *Taq* полимеразы (100 мМ Трис-НCl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 500 мМ KCl); 10 мМ смесь дНТФ; 25 мМ раствор MgCl<sub>2</sub>;
- синтетические олигонуклеотиды (праймеры):  
 MuV-1f (5'-TCAACACAATATCAAGTA-3', 6119–6139),  
 MuV-1r (5'-TTCTGTGTTGTATTGTGA-3', 6556–6573),  
 MuVf (5'-ATGATCTCATCAGGTAC-3', 6143–6159),  
 MuVr (5'-TCCTAAGTTTGTCTGG-3', 6539–6555);
- деионизированная вода;
- агароза;
- трис-ацетатный буфер (0,04М трис-ацетат, 0,002М ЭДТА; pH = 8,5);
- бромистый этидий;
- буфер для нанесения проб (0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленианола, 30% глицерола);
- молекулярно-весовой маркер ДНК с диапазоном длин от 100 до 600 пар нуклеотидов.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Необходимость дифференциации случаев эпидемического паротита у пациентов с острым проявлением одно- или двустороннего воспаления околоушных или других слюнных желез, развившимися без других видимых причин.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1. Подготовка клинических образцов для исследования**

#### **1.1. Клинический материал:**

- сыворотка крови;
- мазки со слизистой носоглотки;
- моча.

Для серологического исследования (выявление специфических IgM- и IgG-антител) может быть использована кровь, забранная как из вены, так и из пальца. IgM-антитела обнаруживаются в сыворотке крови с 4 по 28-й день заболевания. Выявление IgG-антител может быть использовано для диагностики в том случае, когда во втором из двух последовательно собранных образцов сыворотки выявляются специфические IgG, а в первом образце они отсутствовали, т. е. регистрируется сероконверсия к данной инфекции либо отмечается 4-кратное нарастание уровня IgG в парных сыворотках. Первая сыворотка крови для исследования на IgG собирается как можно раньше с момента появления клинических проявлений заболевания, но не позднее 7 дней, вторая — через 10–20

дней.

Кровь забирают в объеме 0,5–5 мл из вены в вакутайнер или из пальца в стерильную центрифужную пробирку. После образования сгустка кровь центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об./мин для отделения сыворотки. Сыворотку переносят в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке указывают имя или идентификационный номер пациента, дату забора и тип образца.

Желательно доставить сыворотку в тот же день, не замораживая, в лабораторию, выполняющую исследования на эпидпаротит. Если доставка в тот же день не представляется возможной, до проведения исследования сыворотка может храниться и транспортироваться при +2–8°C в течение 7 дней с момента забора. Более длительное хранение осуществляется при -20°C.

Следует не допускать повторных циклов замораживания-оттаивания сыворотки крови, т. к. это оказывает разрушающее действие на специфические антитела и приводит к искажению результатов исследования.

Для вирусологического исследования используются мазки со слизистой носоглотки и моча. Вирусная РНК может выявляться в этих биологических жидкостях за 5–7 дней до и в течение 5–6 дней после появления симптомов заболевания.

Мазок со слизистой носоглотки может быть получен с использованием коммерческих наборов для сбора образцов для вирусологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя набора. **Не использовать гельсодержащие наборы для сбора образцов для бактериологических исследований!** При отсутствии коммерческих наборов используют стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Для забора образца тампон помещают между щекой и десной и удерживают до полного намочения, при этом аккуратными движениями потирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Тампон вносят в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды, обламывают палочку и плотно укупоривают пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре +2–8°C в течение 48 ч после сбора.

Если доставка образца в лабораторию будет произведена в течение 2 ч после сбора, допустимо поместить тампон с образцом в сухую стерильную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. В лаборатории в пробирку добавляют 2 мл вирусной транспортной среды, тщательно перемешивают на вортексе и оставляют на 1 ч при +2–4°C для элюирования вируса. Затем тампон извлекают из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Смыв центрифугируют при 2500 об./мин в течение 10 мин, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Образцы мочи предпочтительно собирать утром, поскольку первая утренняя порция мочи содержит большее количество эпителиальных клеток. Мочу в объеме 10–50 мл собирают в стерильный промаркированный флакон, плотно укупоривают и в день сбора образца отправляют с соблюдением холодовой цепи в лабораторию, проводящую исследования на паротит. Если доставка в тот же день не представляется возможной, образец хранят в течение 1 сут при температуре +4°C.

Образец нельзя замораживать. В лаборатории образец центрифугируют при 2500 об./мин в течение 10 мин, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Следует не допускать повторного замораживания-оттаивания образцов или длительного хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ , т. к. это оказывает повреждающее действие на вирус.

### **1.2. Выявление специфических антител к вирусу паротита методом ИФА**

ИФА тест-системы для диагностики паротита основаны на принципе твердофазного непрямого ИФА.

Принцип непрямого ИФА состоит в том, что антитела к вирусу паротита, содержащиеся в исследуемом образце, комплементарно связываются с антигенами вируса паротита, сорбированными на носителе. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляется с помощью антител против иммуноглобулинов человека, конъюгированных с ферментом пероксидазой. Добавленный в реакцию краситель (субстрат) окисляется, приобретая окрашивание, степень которого зависит от количества специфических антител в исследуемом образце и может быть измерено фотометрически. В образцах, не содержащих специфических антител, окрашивание развиваться не будет. При использовании непрямого варианта ИФА для выявления IgM-антител требуется удаление из сыворотки крови IgG-антител, которые могут взаимодействовать с ревматоидным фактором в случае присутствия его в образце и давать ложноположительный результат исследования. С этой целью исследуемая сыворотка крови предварительно соединяется с абсорбентом ревматоидного фактора.

Исследование сыворотки крови в ИФА проводят строго в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

### **1.3. Выделение вируса паротита в культуре клеток**

Из культуральных флаконов с площадью культивирования  $25\text{ см}^2$  со свежим сформированным суточным монослоем культуры клеток Vero (перевиваемая культура клеток почек зеленых африканских мартышек) удаляют ростовую среду и вносят 0,5 мл пробы и 1 мл поддерживающей среды. Пробу инкубируют в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем во флакон дополнительно вносят 4 мл поддерживающей среды и инкубируют в течение 7 сут при  $37^{\circ}\text{C}$ . Флаконы ежедневно просматривают с использованием инвертированного микроскопа для выявления цитопатического эффекта (ЦПЭ). В случае развития дегенерации клеток или в случае ее отсутствия через 7 дней инкубации клеточную суспензию замораживают при  $-20^{\circ}\text{C}$  и в дальнейшем используют для исследования в ПЦР.

### **1.4. Выделение вирусной РНК**

РНК из клинического образца или культуральной жидкости выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения РНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы РНК хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **1.5. Гнездовая ОТ-ПЦР**

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в деионизированной воде. Для удобства готовят растворы праймеров и проб с конечной концентрацией, равной 20 мкМ.

Разведения готовят по формуле:  $V [H_2O] = n [\text{праймера /пробы}] / C [\text{раствора}]$ .

Пример: если количество (n) высушенного праймера/пробы в пробирке равно 12,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C], равной 20 мкМ, необходимо добавить H<sub>2</sub>O в объеме (V) 625 мкл.

Для постановки реакции готовят смесь праймеров и смесь из компонентов набора для однораундовой ОТ-ПЦР, содержащую ферменты, в соответствии с протоколом, представленным в таблице 1.

В каждую пробирку вносят по 2 мкл смеси праймеров и 4 мкл РНК соответствующей пробы, выдерживают 4 мин при температуре 97°C для денатурации вирусной РНК. Затем пробирки помещают на лед и добавляют в них по 19 мкл реакционной смеси, содержащей ферменты, и проводят реакцию в следующих условиях: обратную транскрипцию в течение 30 мин при 42°C, 15 мин при 95°C для денатурации смеси обратных транскриптаз и активации полимеразы и 40 циклов амплификации. Каждый цикл включает следующие стадии: денатурация при 94°C — 30 с, отжиг праймеров при 50°C — 30 с, элонгация при 72°C — 45 с. В последнем цикле элонгацию проводят 7 мин.

Состав реакционной смеси для второго раунда ПЦР (гнездовой) представлен в таблице 2.

Таблица 1 – Компоненты смесей для ОТ-ПЦР

*Приготовление смеси праймеров*

| Реагенты | Концентрация | Объем на одну реакцию, мкл | Объем на N реакций, мкл* |
|----------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| MuV-1f   | 20 мкМ       | 1                          | N + 1                    |
| MuV-1r   | 20 мкМ       | 1                          | N + 1                    |

*Приготовление смеси с ферментом*

| Реагенты                          | Концентрация | Объем на одну реакцию, мкл | Объем на N реакций, мкл* |
|-----------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| H <sub>2</sub> O деионизированная |              | 16                         | 16 · (N + 1)             |
| ПЦР-буфер                         | 5x           | 5                          | 5 · (N + 1)              |
| дНТФ                              | 10 мМ        | 1                          | N + 1                    |
| Смесь ферментов                   | 5 ед./мкл    | 1                          | N + 1                    |

Примечание — \*N — это число исследуемых образцов, положительный и отрицательный контроли

Таблица 2 – Компоненты смеси для второго раунда ПЦР

| Реагенты                          | Концентрация | Объем на одну реакцию, мкл | Объем на N реакций, мкл |
|-----------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------------|
| H <sub>2</sub> O деионизированная |              | 13,75                      | 13,75 · (N + 1)         |
| ПЦР-буфер                         | 10x          | 2,5                        | 2,5 · (N + 1)           |
| дНТФ                              | 10 мМ        | 0,5                        | 0,5 · (N + 1)           |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 25 мМ        | 1                          | N + 1                   |
| MuVf                              | 20 мкМ       | 1                          | N + 1                   |

|                |           |      |              |
|----------------|-----------|------|--------------|
| MuVr           | 20 мкМ    | 1    | N + 1        |
| Taq-полимераза | 5 ед./мкл | 0,25 | 0,25·(N + 1) |
| Вся смесь      |           | 20   |              |

Приготовленную смесь для второго раунда ПЦР разливают в лунки по 20 мкл, а затем добавляют по 5 мкл кДНК, полученной в ходе ОТ-ПЦР, в разведении 5х. Реакцию проводят в следующих условиях: после начальной денатурации кДНК (1,5 мин при 94°C) проводят 30 циклов амплификации: денатурация при 94°C — 30 с, отжиг праймеров при 55°C — 30 с, элонгацию при 72°C — 1 мин. В последнем цикле элонгацию проводят 5 мин.

Контроль наличия продуктов амплификации выполняют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 110 мА в течение 30 мин. Учет флюоресценции бромистого этидия, связанного с ДНК-фрагментами, выполняют в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Результаты интерпретируют путем сравнения наличия и размеров продуктов ПЦР в исследуемых пробах и образцах положительного контроля, а также соответствия размера синтезируемого фрагмента маркеру молекулярной массы. Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 412 пар нуклеотидов, и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно проведенной реакции.

## **2 Анализ и интерпретация результатов**

### **2.1. Критерии лабораторного подтверждения диагноза эпидпаротит:**

- выявление IgM-антител к вирусу паротита в сыворотке крови;
- выявление нарастания концентрации IgG-антител в парных сыворотках крови;
- определение РНК вируса паротита в клинических образцах (носоглоточный смыв или моча) методом ПЦР;
- изоляция вируса паротита в культуре клеток Vero из клинических образцов с последующей идентификацией методом ПЦР.

Положительный результат, полученный, по крайней мере, одним из методов исследования, является лабораторным подтверждением диагноза эпидемический паротит.

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

| Осложнения                                                                                                                                           | Возможные причины и их устранение                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Значения оптической плотности (ОП) контрольных образцов не соответствуют области применения, указанной в сертификате контроля качества данной партии | Тест считается недействительным и его надо повторить, учитывая все требования к проведению теста                      |
| Реакционная смесь во всех лунках имеет специфическое окрашивание                                                                                     | При хранении появилось окрашивание субстрата. Такой субстрат использовать нельзя                                      |
| Помутнение среды и изменение ее цвета на желтый во флаконах с культурой клеток Vero                                                                  | Контаминация под воздействием бактерий.<br>Исследуемую пробу обрабатывают антибиотиком.<br>Выделение вируса повторяют |
| Все пробы в ПЦР отрицательны, включая положительный контроль                                                                                         | Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; не пригоден реагент (реагенты)               |
| Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами                                                               | РНК контрольных образцов деградировали или не были добавлены                                                          |
| Ампликон в пробе отрицательного контроля                                                                                                             | Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК                                                               |