

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач

_____ Н. П. Жукова
23.04.2019
Регистрационный № 001-0419

**АЛГОРИТМ УСКОРЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ПОЛИОВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «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,
проф. 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 (ПЦР) 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.

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 г. (после исключения из состава живой вакцины полиовируса типа 2) во всем мире работа с вакцинным полиовирусом типа 2 (ПВ2) осуществляется в условиях, соответствующих таковым при работе с дикими полиовирусами. 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 ПВ2 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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 ПЦР в режиме реального времени.
4. Холодильник (от 2 до 8 °С) с морозильной камерой (от -20 °С и ниже).
5. Центрифуга-вортекс.
6. Центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 12 000 об/мин).

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.

Реактивы:

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

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», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2015 № 137.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Отбор образцов и выделение полиовируса в культуре клеток

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

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

Этап 2. Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из культуральной жидкости

Пробирки с наличием цитопатогенного агента предварительно замораживают и оттаивают для более полного разрушения вирусосодержащих клеток. Для выделения РНК используют коммерческие наборы для выделения РНК, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь. В качестве положительного контроля включают референс-штамм вакцинного полиовируса типа 1 (ПВ1), а в качестве отрицательного — деионизованную воду. Выделенные образцы РНК до исследования хранят при температуре от -20 °С и ниже.

Этап 3. Одностадийная ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК пан-энтеровирусов, пан-полиовирусов, вакцинных полиовирусов типа 1 и 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; для детекции вакцинных штаммов типа 1 и 3 — 10.

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-энтеровирус	PANEV-F	GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC
	PANEV-P	FAM-CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT-BHQ1
	PANEV-R	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA
Пан-полиовирус	PANPV-F	TTGGAGTTCTTCACITAITCIMGITTYGAYATG
	PANPV-P	FAM-TGRTTNARIGCRTGICCRTRTT-BHQ1
	PANPV-R	GGAGCTCCGGGTGGGAYRTACATATYTGRTAIAC
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 ПВ1, в качестве отрицательного контроля — деионизованную воду.

Для снижения риска контаминации и повышения чувствительности реакции исследование выполняют 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 отличаются 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	Реакционная смесь 2	Реакционная смесь 3
	Детекция пан-энтеровирусов (мкл, на одну реакцию)	Детекция пан-полиовирусов (мкл, на одну реакцию)	Идентификация ПВ1 и ПВ3 (мкл, на одну 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 выполняют одновременно при одном режиме амплификации в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. — Режим амплификации для однораундовой ОТ-ПЦР в реальном времени

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

Детекция флуоресцентного сигнала для реакционных смесей 1 и 2 осуществляется по каналам для флюорофора FAM, для реакционной смеси 3 — FAM и HEX.

Контроль качества реакции

Реакция подлежит учету при следующих условиях:

отрицательный контроль реакции — отрицательный (сигнал флуоресценции отсутствует по всем каналам);

автоматически определенная пороговая линия располагается в пределах экспоненциальной фазы амплификации;

в положительном контроле сигнал флуоресценции 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).

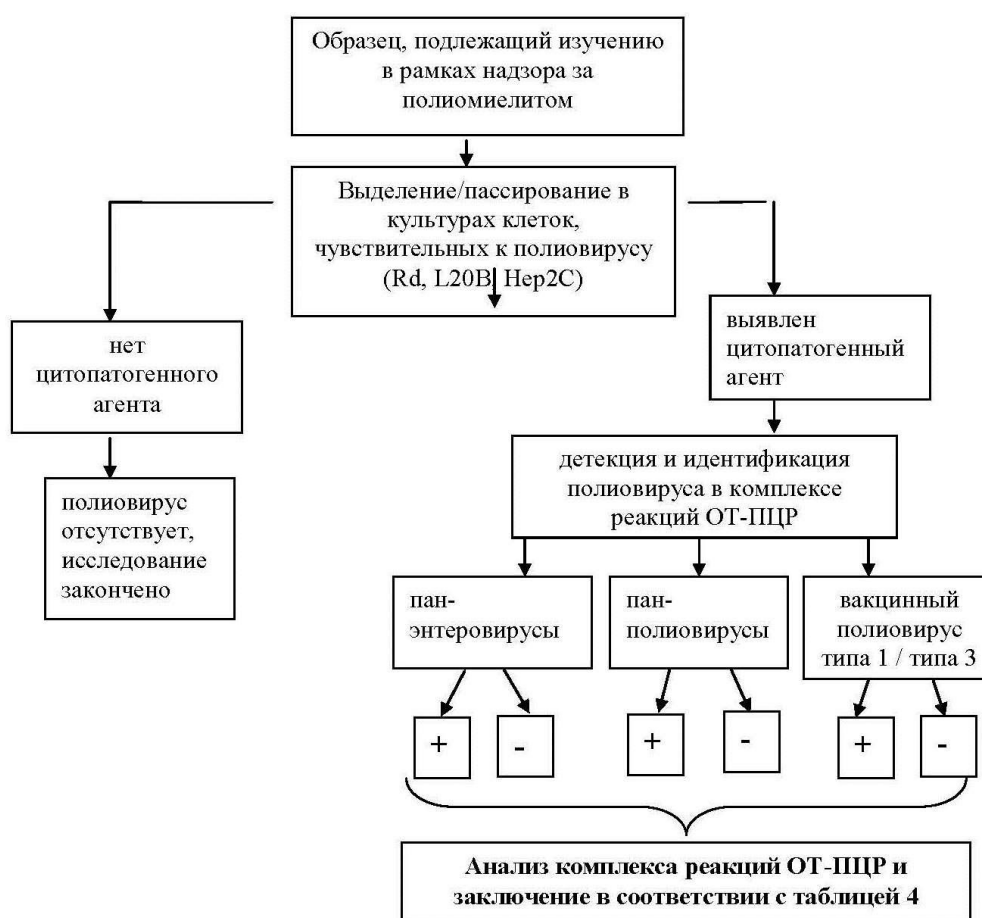


Рисунок — Алгоритм ускоренной детекции и идентификации полиовирусов с использованием молекулярных методов

Таблица 4. — Интерпретация результатов детекции полиовирусов

Результат идентификации			Окончательное заключение
пан- энтеровирусы	пан- полиовирусы	вакцинные полиовирусы типа 1 и 3	
+	+	+	Идентифицирован вакцинный полиовирус типа 1 или 3
+	+	-	Идентифицирован полиовирус, тип не установлен. Вероятно наличие дикого вируса или типа 2 — подлежит секвенированию для установления происхождения
+	-	-	Идентифицирован неполиомиелитный энтеровирус
-	+	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
-	-	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
-	+	-	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
+	-	+	Нелогичный результат, образец подлежит повторному исследованию
-	-	-	Изолят не относится к энтеровирусам

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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