

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения –  
Главный государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

Н.П. Жукова

«20» *июня* 2019 г.

Регистрационный № 005-0519



МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОСТАДИЙНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР  
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ  
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра —  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Н. П. Жукова  
20.06.2019  
Регистрационный № 005-0519

**МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОТАВИРУСОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОСТАДИЙНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ  
ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

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

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

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР/РВ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и/или медицинскую профилактику инфекционных заболеваний вирусной этиологии.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или отделениях дневного пребывания, а также организаций, осуществляющих государственный санитарный надзор.

#### *Общие положения*

Классификация ротавирусов проводится по двум генам: VP7, кодирующему поверхностный белок гликопротеин (определяет G-тип), и VP4, кодирующему протеазазависимый протеин (определяет P-тип). В настоящее время в Европе наиболее широко распространены 6 генотипов ротавирусов: G1P[8], G4P[8], G2P[4], G9P[8], G3P[8] и G12P[8], на их долю приходится около 90 % выявленных штаммов. Однако регулярно появляются данные об обнаружении новых, эпидемически значимых вариантов ротавирусов и большом числе нетипируемых штаммов.

Метод генотипирования ротавирусов с использованием одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР/РВ позволяет выявлять 8 G-генотипов (G1-4, 8, 9, 10, 12) и 5 P-генотипов (P[4], [6], [8], [9], [10]) ротавирусов за короткий промежуток времени (3 ч вместо 8), проводя всю реакцию в одну стадию.

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

Автоматические пипетки переменного объема: 2–20, 20–200, 200–1 000 мкл.

Вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз).

Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой.

Набор для выделения РНК из образцов.

Набор для ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

Наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free».

Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Олигонуклеотиды для амплификации фрагментов ДНК и зонды.

ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free».

Термоциклер с оптическим модулем для ПЦР в реальном времени.

Фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2).

Холодильник-морозильник (-18–20 °С, 4–8 °С).

Центрифуга-вортекс.

Центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «эппендорф», 12 000 об/мин).

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Генотипирование ротавирусов от пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом А08.0 — ротавирусный энтерит.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Описание технологии генотипирования

### *Приготовление 10 % суспензии образца стула*

В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,9 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора, вносят 0,1 г (или 0,1 мл) пробы стула. Пробирку встряхивают на вортексе в течение 1–2 мин, затем центрифугируют в течение 5 мин при 5 000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для дальнейшего исследования. Длительное хранение пробы проводится при –20 °С.

### *Выделение РНК*

Выделение РНК из 10 % суспензии выполняют с использованием представленных в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь» наборов, предназначенных для выделения РНК из биологического материала, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

### *Одностадийная ОТ-ПЦР в реальном времени для генотипирования ротавируса*

Генотипирование ротавирусов проводится с помощью одностадийной мультиплексной ОТ-ПЦР/РВ. При выполнении генотипирования каждый исследуемый образец тестируется параллельно в трех реакциях с использованием трех панелей праймеров и зондов (таблицы 1–3). Первая и вторая панель содержат праймеры для детекции 8 G-генотипов (по 4 генотипа в панели), также каждая из них включает праймеры для детекции NSP3 гена, который выполняет роль внутреннего контроля и позволяет идентифицировать наличие РНК ротавируса в пробе, если G-генотип не соответствует ни одному из вышеперечисленных. Третья панель содержит праймеры для определения 5 Р-генотипов. Таким образом каждому генотипу в панели соответствует свой флюорофор.

Реакцию проводят в однораундовой ОТ-ПЦР с использованием наборов, представленных в «Государственном реестре медицинской техники и изделий медицинского назначения Республики Беларусь», в соответствии с прилагаемой инструкцией (рекомендуется использовать набор для ОТ-ПЦР в реальном времени).

Таблица 1. — Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 1)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G1-F	ACW TAC CAA TAA CAG GAT CAA TGG A	G1
G1-R	AAT GAI TCR TTC CAK TCA CCA TCA	
G1-P	FAM-TCC AAC WGA AGC AAG TAC TCA AA- BHQ1	

Продолжение таблицы 1

G2-F	GCA TCI GAR TTA GCA GRT CTT A	G2
G2-R	TAC CGT GCA GTC IGT TCC CAT	
G2-P	HEX-CCA TAG GAT TGC ACA GCC A-BHQ1	
G12-F	TGG TTA TGT AAT CCA TGG ACG	G12
G12-R	AAT GTT GYG GAC GTC GGT TGT	
G12-P	Cy3.5-CCC ATT GAT ATC CAT TTA TT-BHQ2	
G8-F	CCA GTT GGC CAY CCT TTT GT	G8
G8-R1	TTG TCA CAC CAT TTG TRA ATT C	
G8-R2	TTG TCA CAC CAT TCG TAA ACT C	
G8-P	Cy5.5-TTC CAY GAA CTA TCW GCT AT-BHQ2	
NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 2. — Праймеры и зонды для определения G-генотипа ротавируса (панель 2)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
G3-F	ACG AAC TCA ACR CGA GAG G	G3
G3-R	GTT GCT GCT TCA GTT GGG TAA TA	
G3-P	FAM-TTC CTR ACT TCG ACT TTA TGT TT-BHQ1	
G4-F	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	G4
G4-R	ATC AGA AGC TCC AAC TCA AA	
G4-P	HEX-ATA AAC TGA ACC TGT CGG CC-BHQ1	
G9-F1	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAY AAA TAC	G9
G9-F2	CCA TAA ACT TGA TGT GAC TAC GAG TAC	
G9-R	TGY AGT AGT TGG ATC YGC TGT A	
G9-P	Cy3.5-TCT AAC ACA TCT GAG CCA CC-BHQ2	
G10-F	GAC GAA GCA AAY AAA TGG ATA GC	G10
G10-R	TGA CAT CCT ATY CCT AGY GTT T	
G10-P	Cy5.5-CAT GAT TGT CCC ATY GCT-BHQ2	
NSP3-F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC	Ген NSP3
NSP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	
NSP3-P	Cy5-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-BHQ2	

Таблица 3. — Праймеры и зонды для определения P-генотипа ротавируса (панель 3)

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5' → 3')	Генотип
P[8]-F	TGG RTT RAC NTG CGG TTC AA	P[8]
P[8]-R	GAC GGT CCT TAT CAG CCT ACT AC	
P[8]-P	FAM-AAT AGT GAC TTT TGG ACT GCA G-BHQ1	
P[4]-F	TCC GCA GTA YTY GAA CTA TCA G	P[4]
P[4]-R	GAC GGA CTY TAA CCT CTA AYA ATA G	
P[4]-P	HEX-TTC ATG GTG AAA CAC CAA CAG-BHQ1	
P[6]-F	TTA ATC CCG GAC CRT TTG C	P[6]
P[6]-R	ACA ACT TGT TGA TTA GTT GGA TTC	
P[6]-P	Cy5-TCA CTT CCC CAT GAC TCC AA-BHQ2	

Продолжение таблицы 3

P[9]–F	TGA GAC MTG YAA TTG GAC ATT TTG	P[9]
P[9]–R	GAA GGR AAA GTT GCT GAA GGT A	
P[9]–P	Cy3.5–AAG RCA ATA CGT ATT AGA TGG–BHQ2	
P[10]–F	CTG ACC ACC GTG CTT CAT TA	P[10]
P[10]–R	TGA AAA CCA CRT CAT CAG GAA	
P[10]–P	Cy5.5–TAT CAG AGC CAA AAC TCT ATG G–BHQ2	

При восстановлении олигонуклеотидов из лиофилизованного состояния каждый из них растворяют отдельно в деионизированной воде с целью достижения концентрации 100 мкМ/мкл для праймеров и 10 мкМ/мкл для зондов. Отдельно готовят смеси праймеров (таблица 4) и реакционные смеси, содержащие ферменты и зонды (таблица 5).

Таблица 4. — Состав смеси праймеров для панелей 1–3

Панель 1		Панель 2		Панель 3	
Название (концентрация 100 мкМ)	Объем, мкл	Название (концентрация 100 мкМ)	Объем, мкл	Название (концентрация 100 мкМ)	Объем, мкл
G1–F	0,15	G3–F	0,15	P[4]–F	0,15
G1–R	0,15	G3–R	0,15	P[4]–R	0,15
G2–F	0,15	G4–F	0,15	P[6]–F	0,15
G2–R	0,15	G4–R	0,15	P[6]–R	0,15
G12–F	0,15	G9–F1	0,15	P[8]–F	0,15
G12–R	0,15	G9–F2	0,15	P[8]–R	0,15
G8–F	0,15	G9–R	0,15	P[9]–F	0,15
G8–R1	0,15	G10–F	0,15	P[9]–R	0,15
G8–R2	0,15	G10–R	0,15	P[10]–F	0,15
NSP3–F	0,15	NSP3–F	0,15	P[10]–R	0,15
NSP3–R	0,15	NSP3–R	0,15	Вода	6,0
Вода	5,85	Вода	5,85	Всего	7,5
Всего	7,5	Всего	7,5		

Таблица 5. — Реакционные смеси, содержащие зонды, для панелей 1–3

Панель 1		Панель 2		Панель 3	
Название компонента	Объем, мкл	Название компонента	Объем, мкл	Название компонента	Объем, мкл
G1–P (10 мкМ)	0,5	G3–P (10 мкМ)	0,5	P[8]–P (10 мкМ)	0,5
G2–P (10 мкМ)	0,5	G4–P (10 мкМ)	0,5	P[4]–P (10 мкМ)	0,5
G12–P (10 мкМ)	0,5	G9–P (10 мкМ)	0,5	P[6]–P (10 мкМ)	0,5
G8–P (10 мкМ)	0,5	G10–P (10 мкМ)	0,5	P[9]–P (10 мкМ)	0,5
NSP3–P (10 мкМ)	0,5	NSP3–P (10 мкМ)	0,5	P[10]–P (10 мкМ)	0,5
2X буфер*	12,5	2X буфер*	12,5	2X буфер*	12,5
Ферменты*	0,5	Ферменты*	0,5	Ферменты*	0,5
Всего	15,5	Всего	15,5	Всего	15,5

\* — компоненты коммерческого набора для одностадийной ОТ-ПЦР.

В пробирки вносят по 7,5 мкл соответствующей смеси праймеров и добавляют по 2 мкл выделенной РНК. Смесь инкубируют 5 мин при 95 °С, затем

быстро охлаждают на льду. Далее в каждую пробирку вносят по 15,5 мкл реакционной смеси, содержащей соответствующие зонды, и инкубируют в следующих условиях: обратная транскрипция 20 мин при 50 °С, активация ДНК-полимеразы 2 мин при 95 °С и 45 циклов амплификации (15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С). Считывание флуоресценции рекомендуется установить с 6 цикла.

#### *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 каналам в соответствии с генотипом вируса; значение порогового цикла  $C_t$  положительного контроля не выше 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 на любом цикле. Если изложенные критерии соблюдены, рекомендуется заполнить таблицу 6 для установления генотипа вируса и интерпретации результатов (таблица 7).

Таблица 6. — Учет результатов генотипирования ротавируса

Номер пробы			Генотип					
Панель 1			Панель 2			Панель 3		
Генотип	Флюорофор	$C_t$	Генотип	Флюорофор	$C_t$	Генотип	Флюорофор	$C_t$
G1	FAM		G3	FAM		P[8]	FAM	
G2	HEX		G4	HEX		P[4]	HEX	
G12	Cy3.5		G9	Cy3.5		P[6]	Cy3.5	
G8	Cy5.5		G10	Cy5.5		P[9]	Cy5.5	
NSP3	Cy5		NSP3	Cy5		P[10]	Cy5	

Таблица 7. — Интерпретация результатов

	Результат детекции			Заключение
	NSP3	G	P	
1	+	+	+	Установлен генотип по двум генам
2	+	+	-	P-генотип не установлен. Вероятно, он является редко встречающимся и не может быть определен данными праймерами — необходимо секвенирование
3	+	-	+	G-генотип не установлен. Вероятно, он является редко встречающимся и не может быть определен данными праймерами — необходимо секвенирование
4	+	-	-	Ротавирус нетипируемый по двум генам либо если значение $C_t$ для NSP3 выше 40, ротавирусная РНК присутствует в очень низкой концентрации.

Продолжение таблицы 7

5	-	+	+	Нелогичный результат, исследовать повторно
6	-	+	-	Нелогичный результат, исследовать повторно
7	-	-	+	Нелогичный результат, исследовать повторно
8	-	-	-	РНК ротавируса не обнаружена

Наличие положительного результата более чем для одного G или P генотипа свидетельствует о присутствии смеси вирусов нескольких генотипов в одной пробе.

### **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 положительная с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировала или не была внесена
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Реагенты контаминированы; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации