

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
25.03.2014
Регистрационный № 014-1213

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева, канд. биол. наук Н.В. Поклонская,
З.Ф. Богущ, вед. науч. сотр. К.Л. Дедюля, О.Н. Казинец

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики. В ней изложены порядок проведения лабораторной диагностики норовирусной инфекции (НоВИ) в условиях спорадической и групповой заболеваемости, методы исследований и алгоритмы их применения, включая оценку полученных данных и рекомендации по использованию.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.
3. Анализатор иммуноферментный.
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
5. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
6. Иономер.
7. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
8. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
9. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
10. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
11. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
12. Набор для выделения РНК/ДНК.
13. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции.
14. Набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2 геногрупп.
15. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free» (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл).
16. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free»).
17. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
18. Пластиковые планшеты для ИФА 96-луночные.
19. Посуда лабораторная (колбы, пробирки).
20. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги).
21. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
22. Система для автоматической промывки планшетов.
23. Тест-система для выявления антигенов норовирусов человека 1 и 2 геногрупп методом ИФА.

24. Термостат, регулируемый до $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.
25. Термоциклер или термоциклер с оптическим модулем для ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции.
26. Твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»).
27. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофлуоресцентным учетом результатов).
28. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
29. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»).
30. Центрифуга-вортекс.
31. Холодильник-морозильник (-18 — -20 ; $+4$ — $+8^{\circ}\text{C}$).
32. Этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Симптомы острого гастрита, гастроэнтерита, энтерита, пищевой токсикоинфекции, некротизирующего энтероколита у новорожденных и хронической диареи у реципиентов трансплантатов при отсутствии в клинических образцах бактериальных патогенов.

2. В случае регистрации групповой заболеваемости:

- рвота у более чем половины заболевших;
- средний инкубационный период 24–48 ч;
- средняя длительность заболевания 12–60 ч;
- отсутствие бактериальных патогенов в образцах стула заболевших.

3. Внутрибольничные случаи ОКИ и обследование контактных лиц или лиц из состава декретированных групп по эпидемическим показаниям.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Организация и порядок осуществления лабораторной диагностики НоВИ

1.1. В очагах регистрации групповой заболеваемости с клиническими признаками НоВИ лабораторное обследование проводится:

- при регистрации очага в организованных группах до 15 пострадавших — у всех лиц, при количестве пострадавших от 15 до 30 — не менее чем у 10 лиц, при большем количестве — 20% от количества пострадавших;

- при ограничении очага по территориальному принципу — до 30 пострадавших у всех лиц, при количестве пострадавших от 30 до 100 — не менее чем у 30 лиц, при большем количестве — 20% от количества пострадавших;

- критерием установления роли норовирусов (НоВ) как основного этиологического агента в очаге групповой заболеваемости служит его выявление не менее чем у 30% обследованных.

2.2. Диагноз НоВИ при спорадической заболеваемости ставится только при наличии лабораторного подтверждения.

2. Отбор проб для проведения лабораторной диагностики НоВИ

2.1. Клиническим материалом для лабораторной диагностики НоВИ являются образцы фекалий и/или рвотных масс. Предпочтительно использование в качестве

материала для исследования образцов фекалий.

2.2. Отбор образцов для лабораторных исследований проводят в течение 48–72 ч после появления первых клинических симптомов. В случае если это невозможно сделать, образцы могут быть взяты позже, после исчезновения клинических симптомов заболевания, вплоть до 7–10 сут после его начала.

2.3. Отбор проб осуществляется в стерильные пластиковые завинчивающиеся контейнеры в количестве 0,5–3,0 г стерильными инструментами.

2.4. Упаковка, условия хранения и транспортирования материала для лабораторной диагностики НоВИ должны соответствовать требованиям руководства «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» № 11-7-13-2002 от 30.12.2002 и СП 17-129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами».

2.5. Хранение проб осуществляется при +4°C до лабораторной диагностики, но не более 3 недель. Если лабораторная диагностика осуществляется в более поздние сроки, клинические образцы хранят при -20°C, не допуская их повторного замораживания-оттаивания. В таких условиях хранения РНК НоВ сохраняется в течение 5 лет.

2.6 Транспортировка образцов клинического материала осуществляется с соблюдением холодной цепи при +4°C непосредственно после их взятия и при 20°C, если пробы были предварительно заморожены.

3. Лабораторная диагностика НоВИ

3.1. Выбор метода лабораторной диагностики НоВИ

3.1.1. Выбор метода лабораторной диагностики норовирусной инфекции определяется в соответствии с таблицей 1

Таблица 1 — Методы вирусологической диагностики в применении к лабораторной диагностике НоВИ

| Наименование метода | Характеристика метода | Возможность использования для лабораторной диагностики НоВИ | Примечание |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|--|
| Вирусологи-ческий | Выделение вируса в культуре клеток | Не используется | НоВ относят к некультивируемым вирусам. Клеточных моделей НоВИ не существует |
| Электронно-микроскопический | Электронная микроскопия вирионов | Используется только в научных целях. Не применим для лабораторного подтверждения диагноза | Диагностическая чувствительность метода составляет около 17% |
| Серологический, выявление антител к | Иммуно-ферментный | Используется только в научных целях. Не | Значительное антигенное разнообразие НоВ |

| | | | |
|---|--|--|--|
| НоВ | анализ (ИФА) | применим для лабораторного подтверждения диагноза | и особенности формирования иммунного ответа определяют отсутствие диагностической значимости определения антител к НоВ |
| Серологический, выявление антигенов НоВ | Иммуно-ферментный анализ (ИФА) Иммуно-хроматографический тест (ИХТ) | Используют при расшифровке вспышек и эпизодов групповой заболеваемости, когда количество исследуемых проб ≥ 6 . Не рекомендуется использовать для установления этиологии спорадических случаев инфекции | Метод неэффективен в отношении ряда генотипов НоВ — GI.2, GII.2, обладает низкой чувствительностью в отношении всех генотипов НоВ геногруппы I (8–15%). В большинстве случаев требует подтверждения методом ОТ-ПЦР |
| Молекулярно-генетический | Полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции | Используют для установления этиологии спорадических случаев инфекции Используют при расшифровке вспышек и эпизодов групповой заболеваемости | «Золотой стандарт» лабораторной диагностики НоВИ. Метод выбора при наличии необходимых материалов и оборудования |

3.1.2. Серологические методы диагностики НоВИ (ИФА, ИХТ) используют только при расшифровке этиологии групповой заболеваемости в связи с их недостаточной чувствительностью и специфичностью. Методы не рекомендуется использовать, если количество исследуемых образцов из очага групповой заболеваемости ≤ 6 в связи с высокой вероятностью получения ложноотрицательного результата.

3.1.3. ИХТ используют только при невозможности использования других методов в связи с его минимальной диагностической чувствительностью в сравнении с другими методами лабораторной диагностики НоВИ (ИФА, ОТ-ПЦР). При получении отрицательного результата в ИХТ образцы клинического материала передают в лабораторию для его подтверждения с помощью ОТ-ПЦР.

3.1.4. Если при расшифровке этиологии групповой заболеваемости с использованием серологических методов был получен отрицательный результат, но эпидемиологические характеристики удовлетворяют критериям, изложенным в п. 2.2, отрицательный результат должен быть подтвержден методом ОТ-ПЦР.

3.1.5. Метод ОТ-ПЦР является золотым стандартом лабораторной диагностики НоВИ и должен быть использован для диагностики спорадических случаев НоВИ, а также по возможности для подтверждения отрицательного результата, полученного серологическими методами.

3.1.6. Лабораторную диагностику НоВИ осуществляют с использованием диагностических наборов и тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке.

3.1.7. Алгоритм проведения лабораторной диагностики НоВИ представлен на рисунке 1.

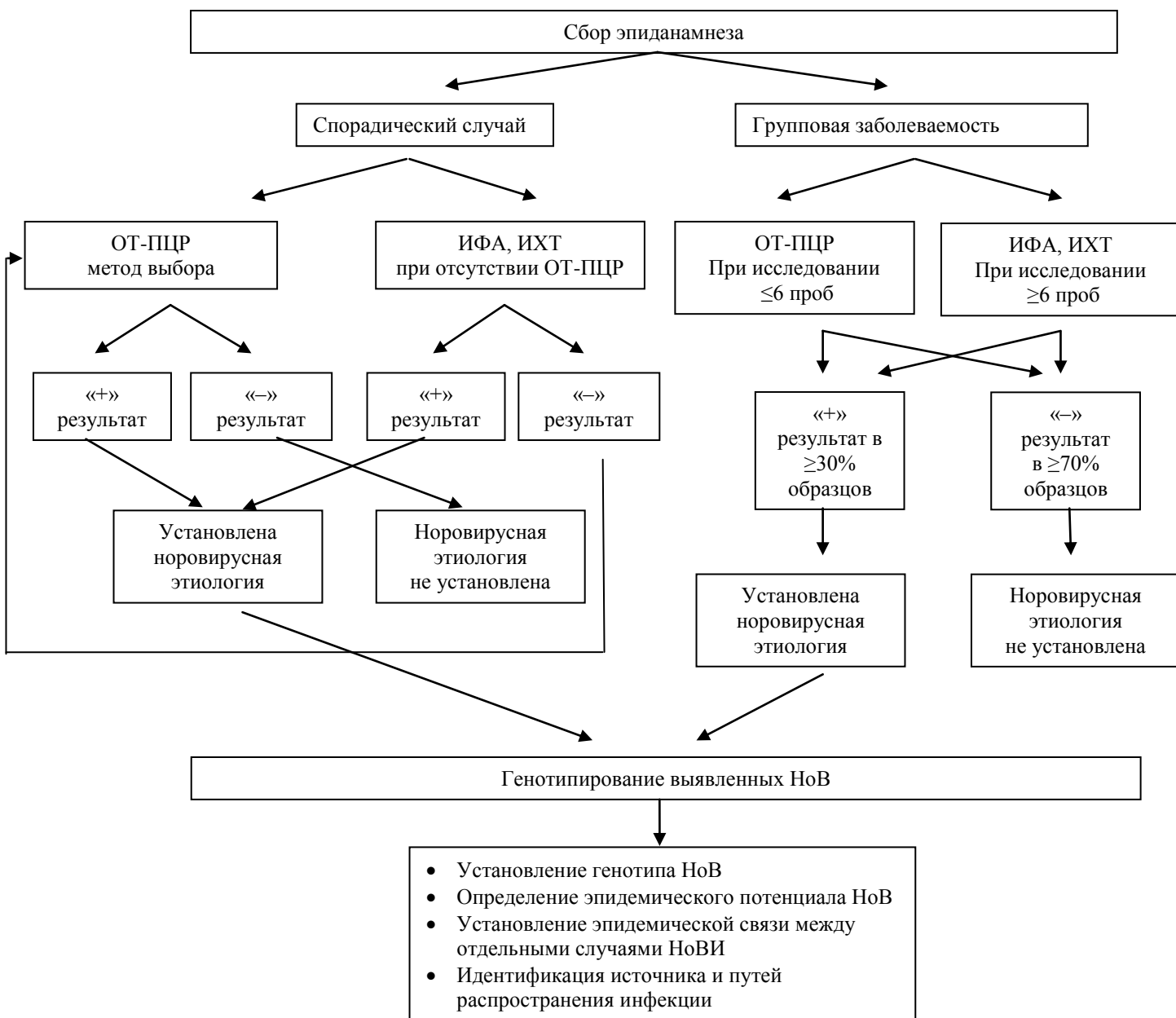


Рисунок 1 — Алгоритм проведения лабораторной диагностики НоВИ

3.2. Подготовка клинических образцов для проведения лабораторной диагностики НоВИ

3.2.1. Пробоподготовка для исследований методом ИФА:

- готовят 10–20% суспензию на физиологическом растворе или фосфатно-солевом твинсодержащем буферном растворе;
- для осветления суспензии пробу центрифугируют при 2000 об./мин 10 мин, затем надосадок переносят в другую пробирку и добавляют к нему равный объем хлороформа, встряхивают в течение 5 мин;
- повторяют центрифугирование в том же режиме, верхнюю фазу используют для исследования;
- для увеличения концентрации антигенов НоВ в пробах в супернатант, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, добавляют ПЭГ-6000-8000 и хлористый натрий до конечных концентраций 10% и 0,5 М (0,1 и 0,03 г на 1 мл супернатанта соответственно);
- смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ, а затем выдерживают в течение 18 ч в холодильнике при +4°C;
- образовавшуюся суспензию центрифугируют при 6000 об./мин в течение 2 ч;
- супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в том же буферном растворе, составляющем 1/20 исходного объема суспензии, и используют для исследования.

3.2.2. Пробоподготовка для исследований в ИХТ осуществляется в соответствии с инструкцией, прилагаемой к диагностической тест-системе.

3.2.3. Пробоподготовка для исследований методом ПЦР осуществляется следующим образом:

- при водянистой консистенции используют нативные образцы фекалий, предварительно осветленные центрифугированием при 2000 об./мин 5–10 мин;
- при полужидкой и твердой консистенции готовят 10% суспензию фекалий, для чего в пробирку объемом 1,5 мл вносят 0,9 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида) 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 исследованием отбирают 0,1 мл супернатанта и смешивают с 0,1 мл отрицательного контрольного образца. Эту пробу используют для выделения РНК.

3.3. Исследования методом ИФА и ИХТ

Постановку реакции осуществляют в соответствии с инструкцией, прилагаемой к используемому набору.

3.4. Исследования методом ОТ-ПЦР

3.4.1. Выделение РНК. Используют наборы, специально предназначенные для выделения РНК из образцов фекалий, зарегистрированные в установленном порядке. Процедуру выделения осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией.

3.4.2. Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием диагностических наборов, зарегистрированных в установленном порядке, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

3.4.3. ПЦР. Для диагностики НоВИ используют ПЦР с гибридационно-флюоресцентной или электрофоретической детекцией продуктов реакции. Предпочтительно использование ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в связи с низким риском перекрестной контаминации продуктами амплификации при ее использовании.

Постановку ПЦР осуществляют в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реактивов для ее проведения. Для постановки ПЦР могут быть использованы только наборы, зарегистрированные в установленном порядке.

3.5. Генотипирование НоВ

3.5.1. Показания к проведению генотипирования НоВ:

- обнаружение НоВ у пациентов и подтверждение норовирусной контаминации объектов окружающей среды (вода, пищевые продукты, смывы с предметов обихода) внутри очага групповой заболеваемости;
- обнаружение НоВ у пациентов в очаге групповой заболеваемости ОКИ;
- летальный исход у пациента с подозрением на НоВИ.

3.5.2. Генотипирование НоВ проводят прямым секвенированием продуктов ПЦР одновременно по 2 регионам генома — фрагментам генов, кодирующих РНК-полимеразу и капсидный белок VP1 НоВ.

3.5.3. Используют образцы клинического материала пациентов, в которых наличие НоВ было подтверждено методом ОТ-ПЦР. Если наличие НоВ было подтверждено другими методами, предварительно проводят подтверждение присутствия РНК НоВ методом ОТ-ПЦР. При получении отрицательного результата в ОТ-ПЦР образцы клинического материала непригодны для генотипирования. Исследуемые пробы передают в организацию, располагающую оборудованием для секвенирования ДНК. Транспортировку проб клинического материала осуществляют с соблюдением холодной цепи.

3.5.4. Каждый образец клинического материала должен сопровождаться направлением в котором должно быть указано:

- вид клинического материала;
- ФИО пациента, от которого был получен материал;
- возраст пациента, от которого был получен материал;
- клинический диагноз;
- дата отбора проб;
- вид пробоподготовки;
- принадлежность НоВ к I или II геногруппе в соответствии с ранее полученным результатом лабораторной диагностики данного образца.

3.5.5. Результаты секвенирования получают в течение 3–14 сут и пересылают затем по электронной почте в организацию, из которой поступили образцы для секвенирования в виде файлов в формате *.txt, каждый из которых содержит фрагмент нуклеотидной последовательности вируса, обнаруженного в 1 исследуемой пробе.

3.5.6. Для генотипирования используют программный продукт Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступный для свободного использования в режиме онлайн по адресу <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>.

3.5.7. Исследуемую нуклеотидную последовательность (последовательности) НоВ вставляют в соответствующее окно (рисунок 2) в следующем виде:

- знак «>», обозначающий начало новой нуклеотидной последовательности;
- уникальный идентификатор (как правило, регистрационный номер) исследуемой нуклеотидной последовательности;
- с новой строки — исследуемая нуклеотидная последовательность, не содержащая пробелов;
- нераспознанные нуклеотидные основания в последовательности должны быть заменены на символ «N», в противном случае программе не удастся проанализировать исследуемую последовательность.

3.5.8. После вставки последовательности необходимо нажать кнопку «Старт».

3.5.9. После обработки нуклеотидной последовательности результаты генотипирования будут представлены в виде таблицы (рисунок 3). Таблица содержит информацию о роде, геногруппе, генотипе и если есть — эпидемическом варианте исследуемого изолята. В графе «Отчет» («Report») содержится ссылка на полный отчет о результатах генотипирования, включая реконструкцию филогенетических взаимоотношений исследуемой нуклеотидной последовательности.

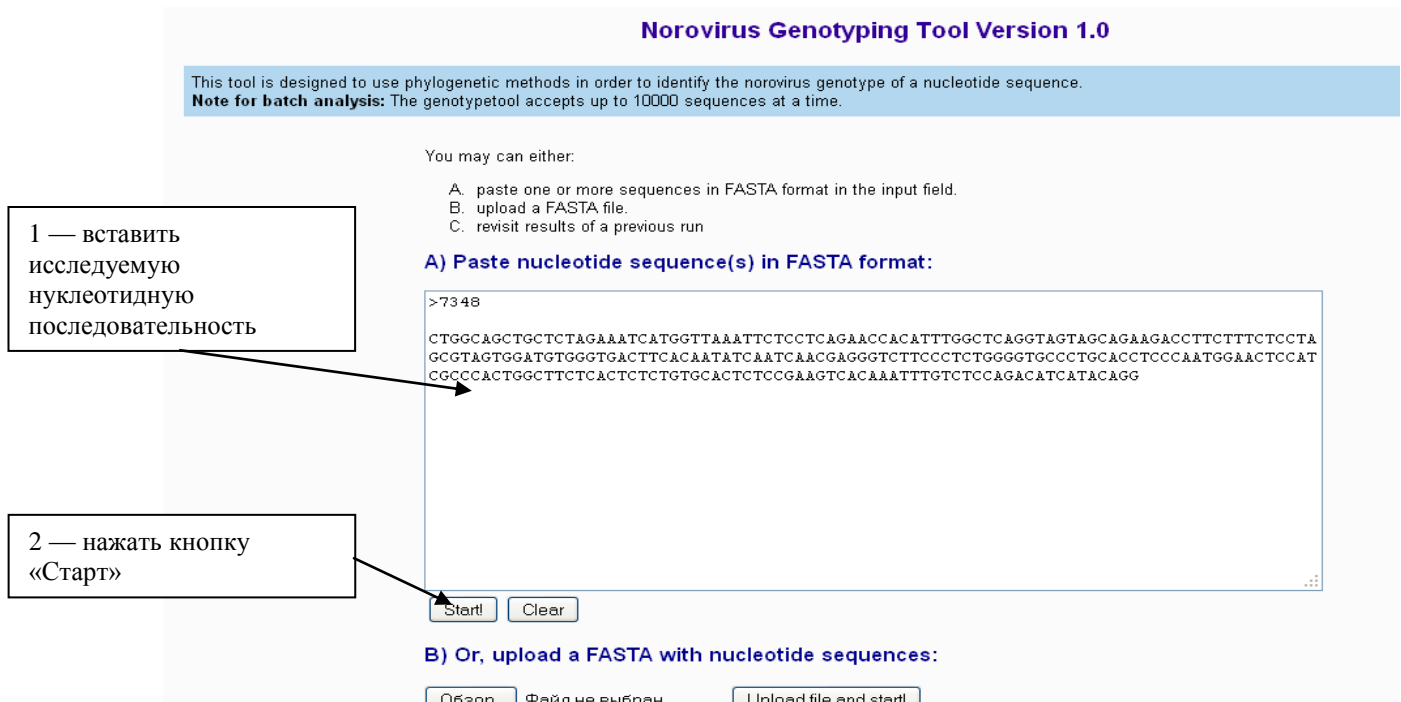


Рисунок 2 — Интерфейс окна программы «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0» для генотипирования норовирусов

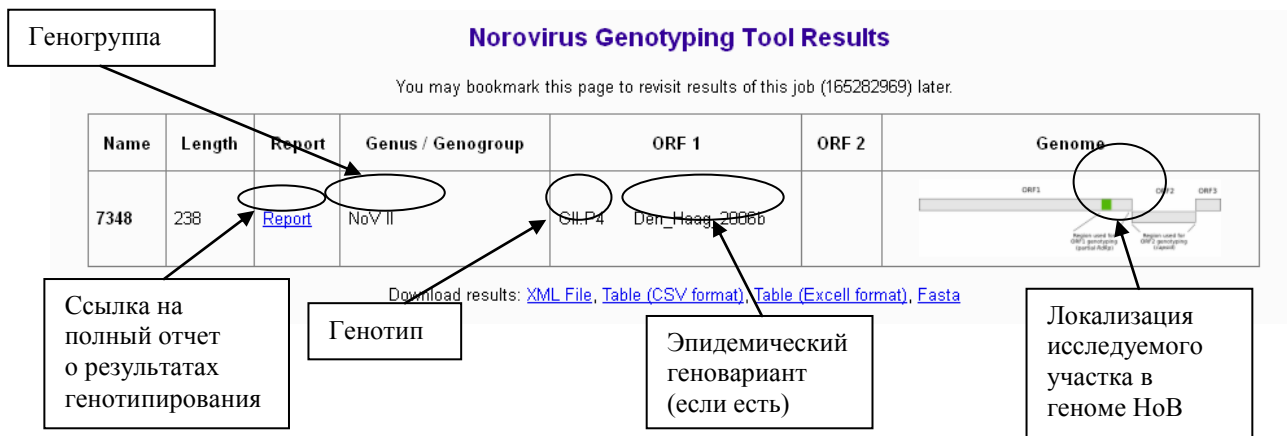


Рисунок 3 — Таблица результатов генотипирования норовирусов

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Возможные проблемы при выявлении АГ НоВ методом ИФА и в ИХТ

1.1. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля не соответствуют установленным пороговым уровням. Пути устранения — строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

1.2. Отрицательный результат ИФА и/или ИХТ может быть получен вследствие антигенной вариабельности НоВ, поэтому категорически не рекомендуется использовать данные методы в лабораторной диагностике спорадических случаев НоВИ. Отрицательный результат ИФА и/или ИХТ при расшифровке этиологии групповой заболеваемости должен быть подтвержден в ОТ-ПЦР.

2. Возможные проблемы при постановке ОТ-ПЦР

2.1. Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующую тест-систему) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

2.1.1. Пути устранения ложноотрицательных результатов:

- развести исследуемую пробу (10% осветленную суспензию фекалий) раствором отрицательного контрольного образца 1:1 для устранения возможных ингибиторов реакции;

- на всех этапах исследования использовать одноразовую стерильную пластиковую посуду и наконечники во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК применять только обработанную диэтилпиракарбонатом воду или соответствующий РНК-элюент, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата РНКазами.

2.1.2. Пути устранения ложноположительных результатов:

- строго соблюдать пространственное разделение рабочих зон, использовать отдельные наборы посуды, пипеток и отдельные комплекты спецодежды для каждой из рабочих зон;

- строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую;

- при одновременном проведении значительного количества исследований рекомендуется использовать только наборы с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции.

3. Возможные проблемы при генотипировании НоВ

3.1. Низкое содержание нуклеиновых кислот НоВ в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

Пути устранения:

- проведение ОТ-ПЦР для накопления секвенируемых фрагментов генома в одной пробирке;

- использование гнездовой или полугнездовой модификации ПЦР для накопления секвенируемых фрагментов генома;

- использование реамплификации для накопления секвенируемых фрагментов генома.

При невозможности идентификации генотипа или эпидемического геноварианта НоВ нуклеотидную последовательность следует передать в научно-исследовательский центр, располагающий специалистами и базой для ее полного филогенетического анализа.