

Г У «Брестский областной центр гигиены,
эпидемиологии и общественного здоровья»

г. Брест, пл. Свободы, 11 «Б»

Срок исполнения _____

Тодушкиной Е.А.
Михнович З.М.
Главном враче
ЗСРЦ
Для руководства
в работе, доверенно
до минёрных совещаний
Ф.

Главный врач

Н.Т.Гиндюк

«24» 12 2014г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -

Главный государственный санитарный врач

Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский

«_____» _____ 2014 г.

Регистрационный № 014-1213 _____

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Инструкция по применению

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

Авторы: Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Дедюля К.Л.,
Казинец О.Н.

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 sporadic и групповой заболеваемости, методы исследований и алгоритмы их применения, включая оценку полученных данных и рекомендации по использованию.

1 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники:

- 1 автоклав;
- 2 автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 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 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

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 электрофоретическим 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 ($-18 - -20^{\circ}\text{C}$, $+4 - +8^{\circ}\text{C}$);

32 этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

2 Показания для проведения лабораторной диагностики НоВИ

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

2.2 В случае регистрации групповой заболеваемости:

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

2.3 Внутрибольничные случаи ОКИ и проведение обследования контактных лиц или лиц из состава декретированных групп по эпидемическим показаниям.

3 Организация и порядок осуществления лабораторной диагностики НоВИ

3.1 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.

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

4 Отбор проб для проведения лабораторной диагностики НоВИ

4.1 Клиническим материалом для проведения лабораторной диагностики НоВИ являются образцы фекалий и/или рвотных масс. Предпочтительно использование в качестве материала для исследования образцов фекалий.

4.2 Отбор образцов для лабораторных исследований проводят в течение 48-72 часов 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.

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

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

4.5 Хранение проб осуществляется при +4⁰С до проведения лабораторной диагностики, но не более 3 недель. Если проведение лабораторной диагностики осуществляется в более поздние сроки, клинические образцы хранят при -20⁰С, не допуская их повторного замораживания-оттаивания. В таких условиях хранения РНК НоВ сохраняется в течение 5 лет.

4.6 Транспортировка образцов клинического материала осуществляется с соблюдением холодовой цепи при +4⁰С непосредственно после их взятия и при -20⁰С если пробы были предварительно заморожены.

5 Проведение лабораторной диагностики НоВИ

5.1 Выбор метода лабораторной диагностики НоВИ

5.1.1 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
Вирусологический	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 НоВ	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Используется только в научных целях. Не применим для лабораторного подтверждения диагноза.	Значительное антигенное разнообразие НоВ и особенности формирования иммунного ответа определяют отсутствие диагностической значимости определения антител к НоВ
Серологический Выявление антигенов НоВ	Иммуноферментный анализ (ИФА) Иммунохроматографический 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 и 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.

5.1.2 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.

5.1.3 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.

5.1.4 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.

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

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

5.1.7 Алгоритм проведения лабораторной диагностики НоВИ представлен на Рис.1

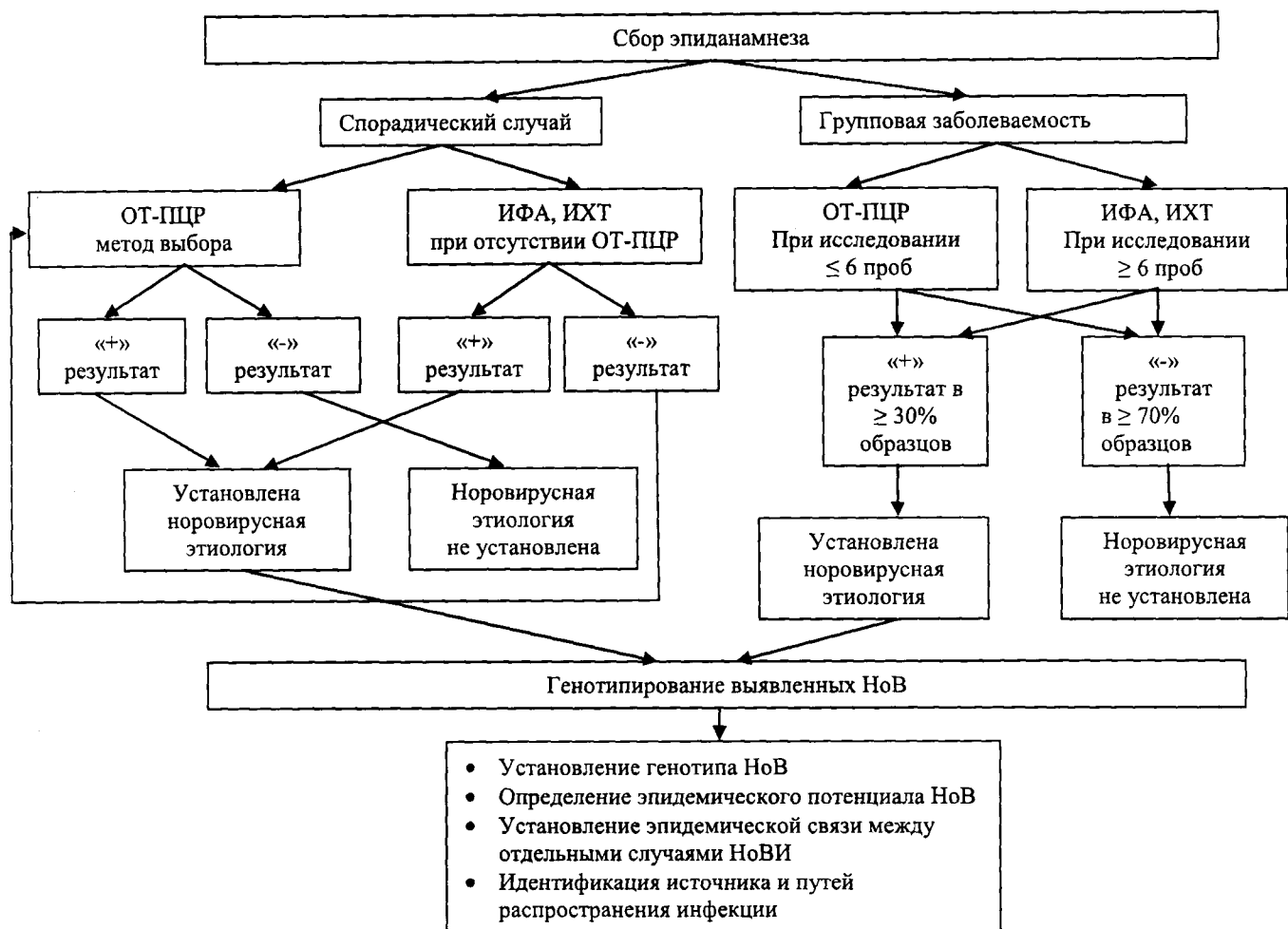


Рисунок 1. Алгоритм проведения лабораторной диагностики НоВИ

5.2 Подготовка клинических образцов для проведения лабораторной диагностики НоВИ

5.2.1 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 минут, 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 (0,1г и 0,03г на 1 мл супернатанта, соответственно);

- смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ, а затем выдерживают в течение 18 часов в холодильнике при +4°C;

- образовавшуюся суспензию центрифугируют при 6 000 об/мин в течение 2 часов;

- супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в том же буферном растворе, составляющем 1/20 исходного объема суспензии, и используют для исследования.

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

5.2.3 Пробоподготовка для исследований методом ПЦР осуществляется следующим образом:

- при водянистой консистенции используют нативные образцы фекалий, предварительно осветленные центрифугированием при 2000 об/мин 5-10 минут;

- 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 проведением исследования отбирают 0,1 мл супернатанта и смешивают с 0,1 мл отрицательного контрольного образца. Эту пробу используют для выделения РНК.

5.3 Проведение исследований методом ИФА и ИХТ

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

5.4 Проведение исследований методом ОТ-ПЦР

5.4.1 Выделение РНК

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

5.4.2 Обратная транскрипция

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

5.4.3 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.

5.5 Генотипирование НоВ

5.5.1 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.

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

5.5.3 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 проведения секвенирования ДНК. Транспортировку проб клинического материала осуществляют с соблюдением холодовой цепи.

5.5.4 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.

5.5.5 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.

5.5.6 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>

5.5.7 Исследуемую нуклеотидную последовательность (последовательности) НоВ вставляют в соответствующее окно (Рис.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.

5.5.8 После вставки последовательности необходимо нажать кнопку «старт».

5.5.9 После обработки нуклеотидной последовательности результаты генотипирования будут представлены в виде таблицы (Рис. 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.

Norovirus Genotyping Tool Version 1.0

This tool is designed to use phylogenetic methods in order to identify the norovirus genotype of a nucleotide sequence.
Note for batch analysis: The genotypetool accepts up to 10000 sequences at a time.

You may can either:

- A. paste one or more sequences in FASTA format in the input field.
- B. upload a FASTA file.
- C. revisit results of a previous run

A) Paste nucleotide sequence(s) in FASTA format:

```
>7348
CTGGCAGCTGCTCTAGAAATCATGGTTAAATTCTCCTCAGAACCACATTTGGCTCAGGTAGTAGCAGAAGACCTTTCTTCCTA
GCCTAGTGGATGTGGGTGACTTCACAATATCAATCAACGAGGGTCTTCCCTCTGGGGTGCCTGACCTCCCAATGGAACCTCAT
CGCCCACTGGCTTCTCCTCTCTGTGCACTCTCCGAAGTCACAAATTTGTCTCCACATCATACAGG
```

1 – вставить исследуемую нуклеотидную последовательность

2 – нажать кнопку «старт»

B) Or, upload a FASTA with nucleotide sequences:

Рис.2 – Интерфейс окна программы «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0» для генотипирования норовирусов

Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (185282969) later.

Name	Length	Report	Genus / Genogroup	ORF 1	ORF 2	Genome
7348	238	Report	NoV II	GII.P4	Den_Haag_2006b	

Download results: [XML File](#), [Table \(CSV format\)](#), [Table \(Excel format\)](#), [Fasta](#)

Геногруппа

Ссылка на полный отчет о результатах генотипирования

Генотип

Эпидемический геновариант (если есть)

Локализация исследуемого участка в геноме NoV

Рис.3 – Таблица результатов генотипирования норовирусов

6 Возможные проблемы при осуществлении лабораторной диагностики НоВИ и пути их устранения

6.1 Возможные проблемы при выявлении АГ НоВ методом ИФА и в ИХТ

6.1.1 Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля не соответствуют установленным пороговым уровням. Пути устранения:

- строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

6.1.2 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.

6.2 Возможные проблемы при постановке ОТ-ПЦР

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

6.2.2 Пути устранения ложноотрицательных результатов:

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

- при проведении всех этапов исследований использовать одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников 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 РНКазам.

6.2.3 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.

6.3 Возможные проблемы при проведении генотипирования НоВ

6.3.1 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 проведения ее полного филогенетического анализа.