

**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации**

**4.4. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ПО МЕТОДАМ КОНТРОЛЯ
3.1.1. КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ**

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ
ЗА НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

МР 4.4/3.1.1.0230-21

Москва • 2021

Генотипирование в эпидемиологическом надзоре за норовирусной инфекцией. МР 4.4/3.1.1.0230-21

1. Разработаны ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной» Роспотребнадзора (Н. В. Епифанова, Н. А. Новикова), ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. Т. Подколзин, К. В. Кулешов).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 19 января 2021 г.

3. Введены впервые.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителя и благополучия человека,
главный государственный санитарный
врач Российской Федерации



А. Ю. Попова

2021 г.

4.4. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ПО МЕТОДАМ КОНТРОЛЯ 3.1.1. КИШЕЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

МР 4.4/3.1.1.0230-21

I. Область применения

1.1. В настоящих методических рекомендациях (далее – МР) представлены методики генотипирования норовирусов на основе частичного секвенирования генома и анализа нуклеотидных последовательностей для использования в эпидемиологическом надзоре за норовирусной инфекцией в части слежения за возбудителем при спорадической и групповой заболеваемости.

1.2. МР предназначены для научных организаций (учреждений), занимающихся вопросами генотипирования возбудителей вирусных инфекций.

II. Общие положения

2.1. К настоящему времени показаны ведущая роль норовирусов в возникновении вспышек острого гастроэнтерита и второе по значимости место после ротавирусов в инфекционной кишечной патологии детей первых лет жизни. В последние три десятилетия произошла активизация эпидемического процесса норовирусной инфекции, которая стала представлять серьезную проблему для здравоохранения во многих странах мира. Высокая скорость молекулярной

эволюции норовирусов приводит к частому возникновению новых эпидемических вариантов вируса, получающих региональное или межрегиональное (глобальное) распространение [11, 13, 14].

Начиная с 2008 г. в Российской Федерации введена регистрация норовирусной инфекции, эпидемиологический надзор за которой предусматривает в том числе выявление и генотипирование норовирусов в образцах клинического материала и объектов окружающей среды¹.

2.2. Геном норовирусов представлен однонитевой РНК позитивной полярности размером примерно 7,5 тыс. нуклеотидных оснований и имеет три открытые рамки считывания (далее – OPC 1-3) (рис.).

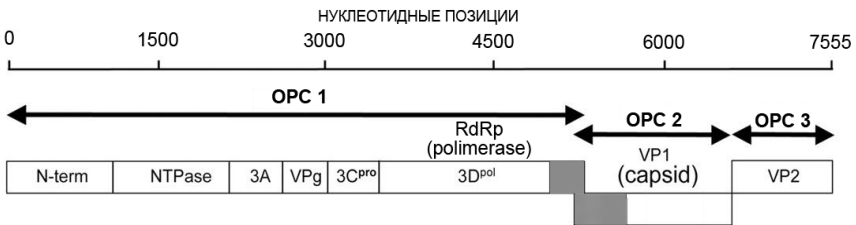


Рисунок. Схема структурной организации генома норовирусов.

Серым цветом выделены области, используемые для генотипирования в соответствии с данными рекомендациями

OPC1 кодирует большой полипротеин – предшественник неструктурных белков, в том числе РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp). OPC2 кодирует основной структурный белок капсида VP1, который включает N-терминальный участок, S-домен, Р-домен и С-терминальный участок. Р-домен состоит из двух субдоменов – Р1 и Р2. Субдомен Р2 несет антигенные детерминанты и сайты связывания с клеточными рецепторами хозяина. OPC3 кодирует минорный структурный белок капсида VP2. В месте соединения рамок считывания часто происходят события рекомбинации, являющейся одним из механизмов эволюции норовирусов.

2.3. Генотипирование норовирусов основано на определении типовой принадлежности VP1 и RdRp. Международной рабочей группой по классификации норовирусов на основе анализа аминокислотной последовательности VP1 в настоящее время выделено десять *геногрупп* (GI-GX), которые представлены 48 *генотипами* – 9 GI, 26 GII, 3 GIII, 2 GIV,

¹ МУ 3.1.1.2969—11 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 15.11.2011.

2 GV, 2 GVI и по 1 генотипу для GVII, GVIII, GIX и GX. На основании разнообразия нуклеотидных последовательностей в области RdRp выделено восемь *P-групп* и 60 *P-типов* – 14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII и 1 GX. В каждой категории есть кандидаты на новые группы и типы, которые пока не утверждены из-за наличия единичных нуклеотидных последовательностей [16].

Представители геногрупп I, VIII и IX обнаружены исключительно у человека; III, V, VI и X – только у животных; II, IV, VII – у человека и животных (с сохранением гостальной специфичности). Внутритиповое разнообразие норовирусов представлено *вариантами (геновариантами)* или *субтипами (субгенотипами)* [14, 15, 16, 19, 20].

2.4. Международной группой экспертов по изучению норовирусной инфекции рекомендована двойная номенклатура норовирусов² [16, 19]. Обозначение штамма складывается следующим образом:

- организм/ norovirus GI, norovirus GII и т. п.;
- хозяин/ Hu (human), Bo (bovine), Po (porcine) и т. п.;
- код страны (ISO)/ RU, FR, DE, US, JP и т. п.;
- год выявления;
- геногруппа, генотип, вариант (по OPC2);
- [P-тип, вариант] (по OPC1);
- название города и номер образца.

Например:

- Norovirus GII/Hu/US/2014/GII.4Sydney[P4 New Orleans]/Pierce0249;
- Norovirus GII/Hu/PE/2013/GII.24[P24]/Loreto1972 или, если известна только последовательность OPC2, Norovirus GII/Hu/FR/2004/GII.12/Paris25.

2.5. Предпочтительным и получившим наиболее широкое распространение методом генотипирования норовирусов в рамках эпидемиологических исследований является таргетное секвенирование с использованием метода обрыва цепи (далее – метод Сэнгера). Традиционными мишенями для его проведения являются области генов полимеразы и основного структурного белка капсида, отличающиеся высокой генетической вариабельностью и информативностью для проведения филогенетического анализа.

² <https://www.rivm.nl/en/noronet> – официальный сайт (в свободном доступе) Международной группы по изучению норовирусов (Noronet) на базе Национального института общественного здравоохранения и окружающей среды Министерства здравоохранения, социального обеспечения и спорта (англ. National Institute for Public Health and the Environment Ministry of Health, Welfare and Sport). Нидерланды

2.6. Методики генотипирования норовирусов характеризуются более низкой аналитической чувствительностью, чем наборы реагентов, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), и предназначенные для детекции данных патогенов. Получение отрицательных результатов при использовании методик генотипирования не должно являться критерием для пересмотра результатов применения наборов реагентов для детекции норовирусов, разрешенных к применению в Российской Федерации.

2.7. Методики генотипирования норовирусов различаются по следующим основным параметрам:

- аналитической чувствительности – наиболее высокой аналитической чувствительностью обладают методики амплификации более консервативных и менее протяженных участков генома;

- дифференцирующей (разрешающей) способности – наиболее высокой дифференцирующей способностью обладают методики амплификации более протяженных и менее консервативных участков генома.

При исследовании образцов клинического материала, характеризующихся более высокой концентрацией патогенов, предпочтительно применение методик с более высокой разрешающей способностью. При исследовании образцов из объектов окружающей среды, характеризующихся более низкой концентрацией патогенов, предпочтительно использование методик с более высокой аналитической чувствительностью.

Выявление различий в нуклеотидном составе изолятов на исследуемом участке генома рекомендовано проводить с применением методик с более высокой разрешающей способностью, чем при необходимости определения только таксономической принадлежности изолята.

При необходимости сопоставления результатов применения описанных методик на образцах клинического материала и окружающей среды необходим выбор для анализа универсальных областей генома.

2.8. Результатом применения методик генотипирования на основе капиллярного секвенирования по Сенгеру является получение хроматограмм, удовлетворяющих критериям качества (п. 8.4). Отсутствие продуктов амплификации или неудовлетворительное качество хроматограмм является следствием возможных ошибок при проведении исследований и не подлежит интерпретации в качестве их результатов.

2.9. Для определения принадлежности нуклеотидных последовательностей норовирусов в формате FASTA (формат представления нуклеотидных последовательностей) конкретным генотипам могут быть

использованы различные базы данных³. Для автоматического генотипирования штаммов норовирусов может проводиться сравнение установленной нуклеотидной последовательности с последовательностями соответствующих участков генома типовых штаммов⁴ [18]. В случае выявления нового генотипа для определения наиболее близких нуклеотидных последовательностей также могут быть использованы различные программы⁵.

2.10. Филогенетический анализ проводят при изучении филогенетических взаимосвязей идентифицированных норовирусов с референтными нуклеотидными последовательностями с использованием специализированных программ⁶.

III. Сущность метода

3.1. Метод генотипирования норовирусов, основанный на определении нуклеотидных последовательностей области генов полимеразы и структурного белка капсида VP1, предназначен для определения генотипа/варианта норовирусов и различий в нуклеотидном составе изучаемых последовательностей изолятов, для установления потенциальной взаимосвязи между возможными источниками инфекции, факторами передачи и пострадавшими лицами в очагах групповой заболеваемости и при проведении планового мониторинга циркуляции норовирусов.

IV. Показания к исследованию

4.1. Показания к применению метода:

– мониторинг циркуляции норовирусов при спорадической заболеваемости с целью определения таксономической принадлежности изолятов к определенным геногруппам, генотипам и вариантам;

– реконструкция эпидемиологических связей в очагах групповой заболеваемости норовирусной инфекцией и молекулярная характеристика этиологического агента.

³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> – пример базы данных, содержащей все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков (в свободном доступе).

⁴ <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>; <https://norovirus.ng.philab.cdc.gov/names.cgi> – примеры сервисов для автоматического генотипирования норовирусов (в свободном доступе).

⁵ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – пример программы для идентификации нуклеотидных и белковых последовательностей (в свободном доступе).

⁶ <https://www.megasoftware.net> – пример программы для комплексного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (в свободном доступе).

V. Работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности)

5.1. Работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней, а также с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными норовирусами, осуществляются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁷, а также могут использоваться методические указания⁸.

5.2. Сбор, обработка, упаковка, хранение и транспортировка материала должны соответствовать санитарно-эпидемиологическим требованиям⁹, а также могут использоваться методические указания¹⁰.

5.3. Приготовление концентратов воды проводится в соответствии с методическими указаниями¹¹.

5.4. Используют только стерильные микропробирки и наконечники для дозаторов переменного объема; при работе с исходным образцами и материалом, содержащим нуклеиновые кислоты, применяют наконечники с аэрозольным барьером. Все операции проводят в отдельном халате, одноразовых перчатках, защитных очках.

VI. Подготовка материала к исследованию

6.1. Для исследования используют образцы клинического материала и объектов окружающей среды с доказанным содержанием РНК норо-

⁷ СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2008 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 21.02.2008, регистрационный номер 11197), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 02.06.2009 № 42 (зарегистрировано Минюстом России 08.07.2009, регистрационный номер 14280), от 29.06.2011 № 86 (зарегистрировано Минюстом России 12.07.2011, регистрационный номер 21317) (далее – СП 1.3.2322—08).

⁸ МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности», утвержденные Роспотребнадзором 22.12.2009 (далее – МУ 1.3.2569—09).

⁹ СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности», утвержденные постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 28.08.1995 №14 (далее – СП 1.2.036—95).

¹⁰ МУ 3.1.1.2969—11; методические указания МУК 4.2.2746—10 «Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью», утвержденные Роспотребнадзором 30.09.2010 (далее – МУК 4.2.2746—10); МУК 4.2.2029—05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов», утвержденные Роспотребнадзором 18.11.2005 (далее – МУК 4.2.2029—05).

¹¹ МУК 4.2.2029—05.

вирусов при использовании разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке наборов реагентов¹²:

– образцы клинического материала (фекалии и/или рвотные массы) от пострадавших лиц и лиц – предполагаемых источников инфицирования. Наиболее информативным является исследование данных материалов в первые 72 часа от начала заболевания;

– образцы из объектов окружающей среды (преимущественно концентраты воды). Исследование других типов образцов (продукты питания, смывы с поверхностей) из-за низкой концентрации патогенов имеет низкую информативность и не рекомендовано к рутинному применению. Получение отрицательных результатов исследований в таких случаях не может свидетельствовать об эпидемиологической безопасности объектов исследования;

– аутопсийный материал – содержимое желудка, толстой и тонкой кишки.

6.2. Работу по проведению ПЦР-исследований осуществляют в соответствии с методическими указаниями¹³.

VII. Материально-техническое обеспечение исследований¹⁴

7.1. Оборудование:

- ламинарный бокс, класс биологической безопасности II тип А;
- термостат для пробирок по типу «Эппендорф» от +25 до +100 °С;
- холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не выше –16 °С;
- микроцентрифуга для пробирок по типу «Эппендорф» до 16 тыс. об./мин;
- вортекс;
- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;

¹² Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2013, № 1, ст. 14; 2020, № 49, ст. 7897) (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416); приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий» (зарегистрировано Минюстом России 09.07.2012, регистрационный номер 24852), с изменением, внесенными приказами Минздрава России от 25.09.2014 № 557н (зарегистрировано Минюстом России 17.12.2014, регистрационный номер 35201), от 07.07.2020 № 686н (зарегистрировано Минюстом России 10.08.2020, регистрационный номер 59225) (далее – приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

¹³ МУ 1.3.2569—09.

¹⁴ **Примечание:** допускается использование средств измерений, вспомогательного оборудования и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками; допускается использование других реактивы с аналогичными характеристиками.

- центрифуга/вортекс;
- программируемый амплификатор;
- камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл;
- источник постоянного тока с напряжением 150—460 В;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей;
- видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов и передачи изображения;
- микроволновая печь для плавления агарозы;
- генетический анализатор для капиллярного секвенирования по Сенгеру;
- спектрофотометр со специализированными кюветами для работы в ультрафиолетовом диапазоне либо спектрофотометр, производящий измерения концентрации нуклеиновых кислот «в капле»;
- автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл);
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов);
- штативы для микропробирок объемом 0,5 мл и 1,5 мл и наконечников;
- колба коническая из термостойкого стекла по ГОСТ 21400 для плавления агарозы на 250 мл;
- мерный цилиндр на 1 л по ГОСТ 1770;
- емкость с дезинфицирующим раствором для сброса наконечников;
- пластиковая ёмкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.

7.2. Расходные материалы:

- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10, до 200 и до 1000 мкл;
- набор из отдельных для каждой зоны работ средств индивидуальной защиты¹⁵ (халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки);
- одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл;
- комплект капилляров для секвенатора размером 36 см или 50 см.

При использовании наборов реагентов отдельных производителей, может возникнуть потребность в использовании дополнительного оборудования (магнитные штативы, станции для автоматической экстрак-

¹⁵ МУ 1.3.2569—09.

ции нуклеиновых кислот, расходные материалы для их использования и т. д.).

7.3. Наборы реагентов.

Для экстракции РНК могут применяться как наборы реагентов для экстракции РНК на миниколонках, так и наборы для ручного выделения с учетом рекомендаций, изложенных в п. 8.3.

Для проведения реакции обратной транскрипции могут применяться наборы реагентов с учетом рекомендаций, изложенных в п. 8.3.

Для проведения ПЦР используются наборы, обеспечивающие минимальное накопление неспецифических продуктов амплификации («горячий» старт).

Набор реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозных гелях.

Набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля.

Комплект реагентов для проведения реакции секвенирования, соответствующий выбранной модели генетического анализатора и размеру анализируемого продукта амплификации.

7.4. Олигонуклеотиды (праймеры) [12, 14, 17].

Информация по спектру специфичности, составу олигонуклеотидов (праймеров), их рекомендуемым концентрациям в реакционных смесях, программам амплификации и характеристикам получаемого продукта представлены в приложениях 1, 2 к настоящему МР.

VIII. Порядок проведения исследований

Сведения о методиках генотипирования норовирусов

8.1. Методики генотипирования норовирусов на основе метода Сэнгера включают следующие этапы:

- экстракцию вирусной РНК из образцов материалов для исследований;
- проведение реакции обратной транскрипции;
- проведение ПЦР;
- автоматическое секвенирование нуклеотидных последовательностей по двум цепям;
- анализ хроматограмм с получением консенсусной последовательности;
- интерпретацию полученных результатов.

8.2. Проведение исследований по представленным в МР алгоритмам должно проводиться обученным персоналом, владеющим навыками проведения ПЦР, подготовки образцов для секвенирования, использова-

ния оборудования для автоматического секвенирования и интерпретации его результатов.

Экстракция РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации

8.3. Материалами для исследования служат:

- образцы клинического материала (образцы фекалий, рвотные массы);
- образцы объектов окружающей среды (концентраты образцов воды);
- образцы аутопсийного материала (содержимое желудка, толстой и тонкой кишки).

Экстракция РНК норовирусов может проводиться с применением различных наборов реагентов, использующих принцип фенол-хлороформной экстракции, преципитации или сорбции на силикагеле, в соответствии с инструкцией производителя. Не допускается применение упрощенных методов экстракции на основе термического лизиса образцов.

При работе с образцами, содержащими потенциально низкие концентрации норовирусов (концентраты воды, клинические образцы от реконвалесцентов и др.), целесообразно использовать наборы реагентов, позволяющие проводить экстракцию РНК из увеличенного объема образца (500—1000 мкл). При этом более высокая чувствительность обеспечивается применением методик с получением продукта амплификации меньшего размера.

Для проведения реакции обратной транскрипции могут использоваться различные наборы реагентов, содержащие случайные 6-мерные праймеры (англ. hexo random), в соответствии с инструкцией производителей. Предпочтительным является применение наборов, содержащих генетически модифицированные обратные транскриптазы с пониженной активностью РНК-азы Н и повышенной термической стабильностью.

При использовании для проведения реакции обратной транскрипции наборов разных производителей могут предъявляться различные требования к необходимости дополнительного разведения кДНК перед проведением ПЦР.

Для проведения ПЦР могут использоваться готовые универсальные смеси для ПЦР (мастер-микс), не содержащие олигонуклеотидов для амплификации, выпускаемые различными производителями для применения в научно-исследовательских целях. Используемые смеси для ПЦР должны обеспечивать возможность реализации «горячего старта» за счет использования термоактивируемых полимераз или физического разделения нуклеотидов и Taq-полимеразы. В состав нуклеотидов в

данных смесях не должен входить урацил. Алгоритмы применения данных ПЦР-смесей в комбинации с используемыми олигонуклеотидами регламентируются рекомендациями производителя.

Для проведения детекции продуктов ПЦР могут использоваться различные наборы реагентов, предназначенные для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле и их последующего выделения из геля, в соответствии с инструкцией производителя.

Автоматическое секвенирование нуклеотидных последовательностей, анализ электрофореграмм с получением консенсусной последовательности

8.4. С учетом особенностей геномов норовирусов необходимо отдавать предпочтение оборудованию для автоматического секвенирования и программному обеспечению для конструирования общей (консенсусной) нуклеотидной последовательности, которые наиболее корректным образом проводят распознавание и дифференцировку смешанных пиков, однонуклеотидных делеций, инсерций и нуклеотидных повторов.

Автоматическое секвенирование нуклеотидных последовательностей проводится по двум цепям; в противном случае результат анализа участка считается недостоверным. Для секвенирования в предлагаемых в данных методических рекомендациях методиках применяются те же олигонуклеотиды, которые используются для получения продуктов амплификации.

Результат конструирования консенсусной нуклеотидной последовательности перед ее анализом должен быть пересмотрен оператором.

Для проверки рекомендуется придерживаться следующего порядка:

– если в двух электрофореграммах для позиции наряду с четкими пиками присутствуют одинаковые подпики, необходимо ввести в позицию вырождение; если подпик присутствует лишь в одной электрофореграмме, ввести в консенсусную позицию нуклеотид, соответствующий основному пику;

– если на одной из электрофореграмм в анализируемой позиции присутствует несколько слабовыраженных пиков одновременно, а на другой электрофореграмме четкий пик, соответствующий какому-либо из нуклеотидов, то в общей последовательности вместо вырождения в анализируемой позиции следует поставить четко интерпретируемый нуклеотид;

– если на одной из электрофореграмм в анализируемой позиции присутствует несколько четких пиков одновременно, а на другой электрофореграмме один четкий пик, соответствующий какому-либо из нук-

леотидов, то в общей последовательности данную позицию следует считать вырожденной;

- если присутствует эффект смещения (соседние пики накладываются друг на друга), то в общей нуклеотидной последовательности следует указать основание, присутствующее на второй электрофореграмме;

- если присутствует эффект истощения краски (пики с малой амплитудой), то участок электрофореграммы следует исключить из анализа.

Слабовыраженным пиком считается пик, высота которого меньше или равна 1/3 средней высоты пиков в электрофореграмме. Четким пиком – пик, высота которого больше 1/3 средней высоты пиков в электрофореграмме.

Полученная общая нуклеотидная последовательность должна быть проанализирована на наличие стоп-кодонов, делеций/инсерций, нетипичных оснований, сдвигов рамок считывания, присутствия в смеси нескольких штаммов.

Дальнейшему анализу и интерпретации подлежит фрагмент секвенированной нуклеотидной последовательности с исключением участков, комплементарных используемым олигонуклеотидам.

Оценка достоверности различий между изолятами и филогенетический анализ

8.5. Методики амплификации, представленные в приложениях 1, 2 к настоящему МР, обеспечивают получение информации о нуклеотидных последовательностях в перекрывающихся областях генома и допускают проведение оценки в отношении образцов материала, по которым не удалось получить единый продукт ПЦР для фрагмента генов полимеразы и капсидного белка.

Достоверное выявление точечных полиморфизмов (п. 8.4) между сравнимыми нуклеотидными последовательностями свидетельствует о наличии различий между исследуемыми изолятами норовирусов.

При изучении филогенетических взаимосвязей идентифицированных норовирусов филогенетический анализ проводят отдельно для участков последовательностей, кодирующих полимеразу и капсидный белок.

IX. Интерпретация результатов

Таксономическая интерпретация полученных результатов

9.1. Анализ единой нуклеотидной последовательности фрагментов генов полимеразы и капсидного белка VP1 (pol+caps) генома норовирусов, включающей место соединения OPC1 и OPC2, позволяет достовер-

но установить генотип норовируса одновременно по гену полимеразы и по гену капсидного белка.

Анализ отдельных фрагментов гена полимеразы (pol) и гена капсидного белка (caps), полученных с применением комбинации методик, не позволяет достоверно установить их принадлежность к одному изоляту, по причине возможного наличия в материале смеси различных норовирусов (особенно при анализе материалов из объектов окружающей среды).

Особого внимания заслуживают случаи выявления нуклеотидных последовательностей, характеризующихся:

– менее чем 75%-й гомологией с представленными в международных базах данных последовательностями норовирусов;

– менее чем 95%-й гомологией с представленными в международных базах данных последовательностями норовирусов GII.4 известных геновариантов;

– неописанной или нетипичной комбинацией генотипов, определенных по генам полимеразы и капсидного белка (при получении единой нуклеотидной последовательности этого участка генома).

Образцы, содержащие изоляты, соответствующие данным критериям, могут направляться для дальнейшего изучения в профильные референс-центры Роспотребнадзора¹⁶.

***Эпидемиологическая интерпретация полученных результатов.
Реконструкция связей между различными звеньями
эпидемиологической цепи***

9.2. Выявление нуклеотидных последовательностей в одном очаге при наличии достоверных различий в их нуклеотидном составе на изучаемом участке генома интерпретируется как исключаящее эпидемиологическую связь источников их изоляции.

Выявление нуклеотидных последовательностей в одном очаге при отсутствии достоверных различий в их нуклеотидном составе свидетельствует о возможном (но необязательном) наличии эпидемиологической связи между источниками их изоляции. Заключение о наличии эпидемиологической связи принимается с учетом результатов эпидемиологического расследования и сведений о генетической вариабельности патогена на данной территории.

¹⁶ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Сомнительные результаты оценки идентичности нуклеотидных последовательностей изолятов (смешанные пики, различия в нуклеотидных последовательностях, секвенированных по разным цепям и т. д.) интерпретируются в пользу заключения о наличии различий между ними.

Х. Эффективность метода

10.1. Эффективность метода субвидового типирования на основе секвенирования нуклеотидных последовательностей определяется его аналитической чувствительностью – минимальной концентрацией РНК патогена, обеспечивающей его 100%-е выявление в образцах, и дифференцирующей способностью (дискриминирующей силой) – средней вероятностью того, что система типирования дифференцирует два неродственных изолята, случайно выбранных из популяции данного таксона.

В таблице представлены показатели, доступные для предварительной характеристики эффективности методик.

Таблица

Параметры аналитической чувствительности на различных субтипах норовирусов (NoV) человека и дифференцирующей способности представленных методик

Геногруппа/ генотип/геновариант		NoV GI caps (G2SKF/ G2SKR) 343 п.н.о.	NoV GI pol (MON431/MON433) 213 п.н.о.*	NoV GI pol+caps (MON431/G2SKR) 570 п.н.о.*
Аналитическая чувствительность**	GI.4 New Orleans [P4 New Orleans]	5×10^5	5×10^5	1×10^6
	GI.4 Sydney [P31]	5×10^5	5×10^5	5×10^6
	GI.17[P17]	5×10^5	5×10^5	1×10^6
	GI.2[P16]	5×10^5	5×10^5	1×10^6
Дифференцирующая способность***		1	2	3
Геногруппа/ генотип/геновариант		NoV GI caps (G1SKF/ G1SKR) 329 п.н.о.	NoV GI pol (MON432/MON434) 213 п.н.о.	NoV GI pol+caps (MON432/G1SKR) 579 п.н.о.
Аналитическая чувствительность**	GI.6[P6]	5×10^5	5×10^5	1×10^6
	GI.2[P2]	5×10^5	5×10^5	1×10^6
Дифференцирующая способность***		2	1	3

Примечания:

* значительное количество вырожденных позиций в олигонуклеотидах MON 431/432/433/434 (4—5 в пределах одного олигонуклеотида) может обуславливать существенные различия в аналитической чувствительности при использовании олигонуклеотидов различных синтезов.

** оценка аналитической чувствительности проводилась с применением положительного образца СОП Norovirus GI-sec (клонирование в pET20-ms2).

*** представлены ранговые значения дифференцирующей способности методик (где 3 – максимальная, 1 – минимальная в пределах одной геногруппы), оценивавшейся по количеству парсимоничных позиций в пределах анализируемого участка генома.

**Методики для амплификации участков генома норовирусов
II геногруппы**

1. NoV GI1 область гена капсидного белка VP1

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием			Размер продукта	
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время		Температура	Время			
G2SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	20 пкм/мкл	95 °C	15мин		95 °C	15мин		343 п.н.о.	
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C	10 с	40 циклов		
			50 °C	60 с		50 °C	10 с			
G2SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	2 мин	72 °C	10 с	343 п.н.о.		
			72 °C	2 мин		72 °C	2 мин			
			4 °C	пауза (хранение)		4 °C	пауза (хранение)			

2. NoV GI1 область гена полимеразы

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием			Размер продукта	
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время		Температура	Время			
MON431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	20 пкм/мкл	95 °C	15мин		95 °C	15мин		213 п.н.о.	
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C	10 с	40 циклов		
			50 °C	60 с		50 °C	10 с			
MON433	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	2 мин	72 °C	10 с	213 п.н.о.		
			72 °C	2 мин		72 °C	2 мин			
			4 °C	пауза (хранение)		4 °C	пауза (хранение)			

3. NoV GII область генов полимеразы и капсидного белка VP1

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием			Размер продукта	
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время		Температура	Время			
MON431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	20 пкм/мкл	95 °C	15 мин		95 °C	15 мин		570 п.н.о.	
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C	15 с	40 циклов		
			50 °C	60 с		50 °C	15 с			
G2SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	2 мин	72 °C	15 с	2 мин		
			72 °C	пауза (хранение)		72 °C	пауза (хранение)			
			4 °C	пауза (хранение)		4 °C	пауза (хранение)			

Примечание:

Y – C или T; R – A или G; H – A или C или T; N – C или G или T или A, I – инозин.

**Методики для амплификации участков генома норовирусов
I геногруппы**

1. NoV GI область гена капсидного белка VP1

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием			Размер продукта
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время		Температура	Время		
G1SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	20 пкм/мкл	95 °C	15 мин		95 °C	15 мин		329 п.н.о.
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C	10 с	40 циклов	
			50 °C	60 с		50 °C	10 с		
G1SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	72 °C	10 с	40 циклов		
			72 °C	2 мин		72 °C		2 мин	
			4 °C	пауза (хранение)		4 °C	пауза (хранение)		

2. NoV GI область гена полимеразы

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием			Программа для амплификаторов с активным регулированием			Размер продукта
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время		Температура	Время		
MON432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	20 пкм/мкл	95 °C	15 мин		95 °C	15 мин		213 п.н.о.
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C	10 с	40 циклов	
			50 °C	60 с		50 °C	10 с		
MON434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	72 °C	10 с	40 циклов		
			72 °C	2 мин		72 °C		2 мин	
			4 °C	пауза (хранение)		4 °C	пауза (хранение)		

3. NoV GI область генов полимеразы и капсидного белка VP1

Олигонуклеотиды (праймеры)		Рабочие концентрации	Программа для амплификаторов с матричным регулированием		Программа для амплификаторов с активным регулированием		Размер продукта	
Название	Последовательность (5'-3')		Температура	Время	Температура	Время		
MON432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	20 пкм/мкл	95 °C	15 мин	95 °C	15 мин	579 п.н.о.	
			95 °C	60 с	40 циклов	95 °C		15 с
			50 °C	60 с		50 °C		15 с
G1SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	20 пкм/мкл	72 °C	60 с	72 °C	15 с		
			72 °C	2 мин	72 °C	2 мин		
			4 °C	пауза (хранение)	4 °C	пауза (хранение)		

Примечание:

Y – C или T; R – A или G; H – A или C или T; N – C или G или T или A, I – инозин.

Библиографические ссылки

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

2. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3. СП 3.1.1.3108—13 «Профилактика острых кишечных инфекций».

4. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

5. Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

6. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

7. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

8. МУ 3.1.1.2969—11 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции».

9. МУК 4.2.2029—05 «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

10. МУК 4.2.2746—10 «Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью».

11. Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Новикова Н.А., Парфенова О.В., Фомина С.Г. Эпидемические варианты норовирусов генотипа GI.4 на территории Нижнего Новгорода в 2006—12 гг. // Журн. Микробиол. 2014. № 2. С. 64—72.

12. Anderson A.D., Garrett V.D., Sobel J., Monroe S.S., Fankhauser R.L., Schwab K.J., Bresee J.S., Mead P.S., Higgins C., Campana J., Glass R.I.; Outbreak Investigation Team // Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am. J. Epidemiol.* 2001;154(11):1013-1019.

13. Bull R., Tu E., McIver C., Rawlinson W.D., White P.A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis // *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(2):327-333.

14. Cannon J.L., Barclay L., Collins N.R., Wikswø M.E., Castro C.J., Magaña L.C., Gregoricus N., Marine R.L., Chhabra P., Vinjé J. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GI.4 recombinant viruses // *J. Clin. Microbiol.* 2017;55(7):2208-2221.

15. Chhabra P., Aswath K., Collins N., Ahmed T., Olórtégui M.P., Kosek M., Cebelinski E., Cooper P.J., Bucardo F., Lopez M.R., Castro C.J., Marine R.L., Ng T.F.F., Vinjé J. Near-Complete Genome Sequences of Several New Norovirus Genogroup II Genotypes // *Genome Announc.* 2018 Feb 8;6(6). pii: e00007-18. doi: 10.1128/genomeA.00007-18.

16. Chhabra P., de Graaf M., Parra G.I., Chan M.C., Green K., Martella V., Wang Q., White P.A., Katayama K., Vennema H., Koopmans M.P.G., Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes // *J Gen Virol.* 2019;100(10):1393-1406. (Corrigendum: Updated classification of norovirus genogroups and genotypes // *J Gen Virol.* 2020;101(8):893.)

17. Kojima S., Kageyama T., Fukushi S. Hoshino F.B., Shinohara M., Uchida K., Natori K., Takeda N., Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses // *J. Virol. Methods.* 2002;100(1-2):107-114.

18. Kroneman A., Vennema H., Deforche K. v d Avoort H., Peñaranda S., Oberste M.S., Vinjé J., Koopmans M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses // *J. Clin. Virol.* 2011;51(2):121-125.

19. Kroneman A., Vega E., Vennema H., Vinjé J., White P.A., Hansman G., Green K., Martella V., Katayama K., Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping // *Arch. Virol.* 2013;158(10):2059-2068.

20. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus // *J. Clin. Microbiol.* 2015;53(2):373-381.