

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский

« _____ » 2016 г.

Регистрационный № 014-1115



**АЛГОРИТМ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Инструкция по применению

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

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

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
07.04.2016
Регистрационный № 014-1115

**АЛГОРИТМ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
ВИРУСОВ-КОНТАМИНАНТОВ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

инструкция по применению

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

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

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм генотипирования эпидемически значимых вирусов-контаминантов объектов окружающей среды, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваемости острой гастроэнтеропатией, вызванной возбудителем Норволк, и энтеровирусной инфекцией, обусловленными загрязнением объектов окружающей среды. Настоящая инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов.

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. Буфер для секвенирования.
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
5. Гель для секвенирования.
6. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
7. Иономер.
8. Источник тока для электрофореза.
9. Комплект капилляров для секвенирования;
10. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
11. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
12. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
13. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
14. Набор для выделения РНК/ДНК из образцов, содержащих низкое количество нуклеиновых кислот.
15. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции.
16. Набор для очистки ДНК из геля.
17. Набор для ПЦР со стадией обратной транскрипции в одной пробирке.
18. Набор реагентов для амплификации кДНК энтеро- и норовирусов человека 1 и 2 геногрупп.
19. Набор реагентов для ПЦР (буфер для ПЦР, раствор $MgCl_2$, Taq-полимераза).
20. Набор дНТФ.
21. Набор для секвенирования.
22. 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).

23. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл, с маркировкой «RNAse, DNAse free»).
24. Олигонуклеотиды для амплификации фрагментов ДНК для молекулярного типирования.
25. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
26. Посуда лабораторная (колбы, пробирки).
27. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги).
28. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
29. Термоциклер или термоциклер с оптическим модулем для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции.
30. Твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»).
31. Трансиллюминатор.
32. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
33. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»).
34. Центрифуга-вортекс.
35. Холодильник-морозильник (-18–20°C, +4–8°C).
36. Этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Установление путей и факторов передачи вирусных инфекций в условиях регистрации:

- групповой заболеваемости острой гастроэнтеропатией, вызванной возбудителем Норволк (норовирусом), энтеровирусной инфекцией, в возникновении которой по результатам эпидемиологического расследования предполагается роль факторов окружающей среды (воды, объектов и предметов среды обитания человека, пищевых продуктов);

- внутрибольничной заболеваемости острой гастроэнтеропатией, вызванной возбудителем Норволк.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Отбор проб для генотипирования вирусов-контаминантов объектов окружающей среды

1.1. Выбор объектов окружающей среды для отбора проб осуществляют по итогам эпидемиологического расследования. Объектами окружающей среды высокого риска вирусной контаминации в отношении норовирусов являются пищевые продукты, предметы и объекты среды обитания человека, в отношении энтеровирусов — вода различных видов водопользования (питьевая из централизованных и децентрализованных систем водоснабжения, вода водоемов, бутилированная вода).

1.2. Отбор проб из объектов окружающей среды (вода, объекты и предметы среды обитания человека, пищевые продукты) осуществляют только с помощью специальных наборов для отбора проб и экстракции/концентрирования вирусов.

1.3. Отбор проб осуществляется в стерильные пластиковые завинчивающиеся пробирки в объеме 1–3 мл.

1.4. Упаковка, условия хранения и транспортирования материала для генотипирования 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».

1.5. Хранение проб осуществляется при +4°C в течение 1 сут до лабораторной диагностики. Если таковая осуществляется в более поздние сроки, клинические образцы хранят при -20°C.

1.6. Транспортировка образцов осуществляется с соблюдением холодной цепи при -20°C.

2. Подтверждение вирусной контаминации объектов окружающей среды

2.1. Подтверждение вирусной контаминации объекта окружающей среды осуществляется методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в реальном времени в отношении норовирусов I и II групп, энтеровирусов.

2.2. Если положительный результат исследования по выявлению вирусной контаминации объекта окружающей среды был получен другим методом (ИФА, нМФА), до проведения генотипирования присутствие вирусной контаминации должно быть подтверждено методом ОТ-ПЦР.

2.3. В пробах из объектов окружающей среды должно быть подвержено присутствие того же типа вируса, который был этиологическим агентом групповой/внутрибольничной заболеваемости.

2.4. Постановка ОТ-ПЦР для подтверждения вирусной контаминации объекта окружающей среды.

2.4.1. Выделение РНК

Используют наборы, специально предназначенные для выделения РНК из образцов, полученных с объектов окружающей среды — воды, пищевых продуктов, смывов с поверхностей, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь. Процедуру выделения осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.4.2. Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием коммерческих наборов, разрешенных для применения на территории Республики Беларусь, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.4.3. ПЦР

Предпочтительно использование ПЦР с гибридационно-флуоресцентной 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 постановки ПЦР могут быть использованы только наборы, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь.

3. Генотипирование этиологического агента групповой/внутрибольничной заболеваемости

Осуществляют в точном соответствии с инструкциями по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции» № 165-1208 от 11.05.2009 и «Алгоритм лабораторной диагностики норовирусной инфекции» № 014-1213 от 05.03.2014.

4. Генотипирование вирусов-контаминантов объектов окружающей среды

4.1. Требования к организации рабочего места

В связи с крайне низким содержанием вирусов-контаминантов в объектах окружающей среды все операции при их генотипировании должны быть максимально защищены от контаминации вирусами, вирусными нуклеиновыми кислотами и продуктами предыдущих ПЦР. Организация лаборатории, в которой проводят все этапы, начиная с выделения вирусной РНК и заканчивая очисткой фрагмента ДНК для секвенирования, должна соответствовать требованиям, предъявляемым к ПЦР-лаборатории с детекцией конечного продукта методом гель-электрофореза, и включать разделение на зоны 1–3. В зоне 1 проводят обработку проб окружающей среды, выделение РНК, внесение образцов в пробирки со смесью для ОТ-ПЦР. Зона 1 для работы с пробами окружающей среды должна быть расположена в отдельном боксе, в котором не проводятся работы с пробами клинического материала и/или изолятами и штаммами вирусов. В зоне 2 готовят ПЦР-смеси для 1, 2 раундов и реакции термоциклического секвенирования. В зоне 3 проводят ОТ-ПЦР, вносят образцы в пробирки для 2-го раунда ПЦР, осуществляют выделение и очистку ДНК для секвенирования, вносят образцы ДНК в пробирки для реакции термоциклического секвенирования.

В зависимости от этиологии групповой/внутрибольничной заболеваемости и типа вируса, обнаруженного в образцах окружающей среды, проводят генотипирование норо- или энтеровирусов. В связи со значительным многообразием рода *Enterovirus* генотипирование проводят параллельно в 2-х постановках: в отношении всего рода *Enterovirus* и в отношении вида *Human Enterovirus B* для достижения максимальной чувствительности реакции.

Схема использования праймеров для генотипирования вирусов-контаминантов представлена в таблице 1.

Таблица 1. — Схема генотипирования вирусов-контаминантов

Энтеровирус				Норовирус II	
1-й раунд		2-й раунд		1-й раунд	2-й раунд
ОТ-ПЦР		ПЦР		ОТ-ПЦР	ПЦР
<i>Enterovirus</i>	<i>Human Enterovirus B</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Human Enterovirus B</i>		
Название используемых пар праймеров					
224	NestVP1F1	AN89	NestVP1F2	NoG2F	G2SKF
222	NestVP1R1	AN88	NestVP1R2	G2SKR	G2SKR

4.2. Выделение РНК из проб объектов окружающей среды проводится в соответствии с п. 4.1 настоящей инструкции.

4.3. Проведение 1-го этапа гнездовой ПЦР со стадией обратной транскрипции в одной пробирке.

Для накопления фрагмента ДНК для молекулярного типирования используют 2-стадийную гнездовую ПЦР. Для дополнительного повышения чувствительности 1-ю стадию осуществляют с помощью ОТ-ПЦР в одной пробирке. Для ее проведения используют коммерческие наборы, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь в соответствии с прилагаемой инструкцией. Дополнительно в состав универсального набора для ОТ-ПЦР добавляют специфические олигонуклеотиды (праймеры), последовательности которых указаны в таблице 2.

Состав реакционной смеси для ОТ-ПЦР готовят в соответствии с инструкцией к используемому набору. Выделенную РНК добавляют в количестве не менее 10 мкл.

Таблица 2. — Праймеры для ОТ-ПЦР в одной пробирке

Тип выявляемого возбудителя	Название праймера	Последовательность, 5'→3'	Количество на реакцию, пмоль
Род <i>Enterovirus</i>	224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	50
	222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	50
Вид <i>Human Enterovirus B</i>	NestVP1F1	GARACDGGICAYACITCICARGT	30
	NestVP1R1	CCICCHGGIGGBAYRTACAT	30
Род <i>Norovirus</i> , геногруппа II	NoG2F	GCCCAGRCARGARCCNATGTT	20
	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	20

Реакционную смесь готовят в зоне № 2, после чего переносят пробирки в зону № 1, где в них добавляют 10 мкл выделенной РНК. Затем подготовленные пробирки вносят в зону № 3, где их помещают в термоциклер. Режимы амплификации представлены в таблицах 3–5.

Таблица 3. — Режим амплификации ОТ-ПЦР для праймеров 222/224

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95° — 30 с Отжиг: 42° — 30 с Элонгация: 60° — 45 с	40 циклов

Таблица 4. — Режим амплификации 1-го раунда для праймеров NestVP1F1/NestVP1R1

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95°C — 30 с Отжиг: 55°C — 3 мин Элонгация: 72°C — 40 с	40 циклов

Таблица 5. — Режим амплификации 1-го раунда для праймеров NoG2F/ G2SKR

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95°C — 30 с Отжиг: 55°C — 45 с Элонгация: 72°C — 30 с	40 циклов

После прохождения реакции пробирки помещают в холодильник (+2–8°C), где они находятся до постановки 2-го раунда гнездовой ПЦР, но не более 1 сут.

4.4. Проведение 2-го раунда гнездовой ПЦР

Для этого раунда используют универсальные коммерческие наборы для ПЦР с горячим стартом, разрешенные для применения на территории Республики Беларусь в соответствии с прилагаемой инструкцией. Дополнительно в состав реакционной смеси добавляют специфические олигонуклеотиды (праймеры), последовательности которых указаны в таблице 6.

Таблица 6. — Праймеры для 2-го раунда гнездовой ПЦР

Тип выявляемого возбудителя	Название праймера	Последовательность, 5'→3'	Кол-во на реакцию, пмоль
Род <i>Enterovirus</i>	AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	40
	AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	40
Вид <i>Human Enterovirus B</i>	NestVP1 F2	GAYAMIATVCARACIMGVCA YGT	30
	NestVP1 R2	GGHGGYAYRTACATDAKYTGRTGDGT	30
Род <i>Norovirus</i> , II генотипа	G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	20
	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	20

Реакционную смесь готовят в зоне № 2, после чего переносят пробирки в зону № 3, где в них добавляют 1–2 мкл продуктов ПЦР 1-го раунда. Затем подготовленные пробирки помещают в термоциклер. Режимы амплификации представлены в таблицах 7–9.

Таблица 7. — Режим амплификации 2-го раунда гнездовой ПЦР для праймеров AN89/ AN88

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95° — 30 с Отжиг: 63° — 1 мин Элонгация: 72° — 40 с	45 циклов

Таблица 8. — Режим амплификации 2-го раунда гнездовой ПЦР для праймеров NestVP1F2/ NestVP1R2

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95°C — 30 с Отжиг: 53°C — 3 мин Элонгация: 72°C — 30 с	45 циклов

Таблица 9. — Режим амплификации 2-го раунда гнездовой ПЦР для праймеров G2SKF/ G2SKR:

В соответствии с инструкцией к набору	Проведение реакции обратной транскрипции
Денатурация: 95°C — 30 с Отжиг: 51°C — 30 с Элонгация: 72°C — 30 с	45 циклов

После прохождения 2-го раунда реакции пробирки помещают в холодильник (+2–8°C), где они находятся до проведения электрофоретического разделения продуктов 2-го раунда реакции, но не более 1 сут.

4.5. Электрофоретическое разделение продуктов реакции

Для выделения фрагмента ДНК проводят электрофорез в 2%-м агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Размер фрагментов ДНК разных типов вирус-контаминантов при накоплении с различными парами праймеров:

Род *Enterovirus*, праймеры 222/224; AN89/ AN88: ДНК 375 п.н.

Вид *Human Enterovirus B*, праймеры NestVP1F1/ NestVP1R1, NestVP1F2/ NestVP1R2 : ДНК 311 п.н.

Норовирусы II геногруппы, праймеры NoG2F/ G2SKR, G2SKF/ G2SKR: ДНК 320 п.н.

При наличии в трансиллюминаторе переключателя между коротко- и длинноволновой областью УФ-излучения он должен быть переведен в положение, соответствующее длинноволновому УФ-излучению. При этом гель не должен подвергаться УФ-облучению дольше 30 с – 1 мин.

При наличии в дорожках геля соответствующей полосы она аккуратно и быстро вырезается с помощью стерильных пинцета и скальпеля. Вырезанный фрагмент геля помещается в стерильную пластиковую пробирку и маркируется в соответствии с номером пробы.

4.6. Выделение и очистка образцов ДНК из агарозного геля

Выделение и очистка фрагмента ДНК осуществляется с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК из геля в соответствии с инструкцией производителя.

4.7. Секвенирование ДНК

Первым этапом является определение концентрации ДНК в исследуемых пробах и ее чистоты. Концентрация ДНК определяется спектрофотометрически по измерению оптической плотности раствора при длине волны 260 нм (OD_{260}).

Для определения чистоты препарата проводят измерения OD_{260}/OD_{280} . Препарат считается чистым, если отношение значений 260 нм/280 нм приблизительно равно 1,8. Все измерения осуществляют в соответствии с инструкцией к используемому прибору.

Следующий этап — постановка реакции термоциклического секвенирования. Она осуществляется с помощью коммерческих наборов, разработанных для использования на соответствующей модели ДНК-анализатора. Для каждой пробы проводят 2 реакции — отдельно с прямого или обратного праймеров. Для секвенирования полученных фрагментов ДНК используют праймеры, которые были использованы для проведения 2-го раунда гнездовой ПЦР (таблица 2). В каждую пробирку с реакционной смесью вносят **один!** праймер.

Постановку реакции осуществляют в соответствии с инструкцией к используемому коммерческому набору.

Следующий этап — очистка продуктов реакции термоциклического секвенирования. Очистку осуществляют либо преципитацией этанолом, либо с использованием коммерческих наборов (колонок). В последнем случае очистка проводится в соответствии с инструкцией к набору для очистки. Протокол очистки с помощью преципитации этанолом изложен в инструкции к набору для секвенирования.

Заключительным этапом является электрофоретическое разделение продуктов реакции термоциклического секвенирования и распознавание последовательности ДНК. Данный этап проводится с помощью автоматического ДНК-анализатора в соответствии с инструкцией к прибору и с использованием соответствующего программного обеспечения.

4.7. Генотипирование вирусов-контаминантов компьютерными методами

4.7.1. Генотипирование норовирусов

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>.

Исследуемую нуклеотидную последовательность (последовательности) НоВ вставляют в соответствующее окно (рисунок 3) 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.

После вставки последовательности необходимо нажать кнопку «Старт».

После обработки нуклеотидной последовательности результаты генотипирования будут представлены в виде таблицы (рисунок 4). 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.

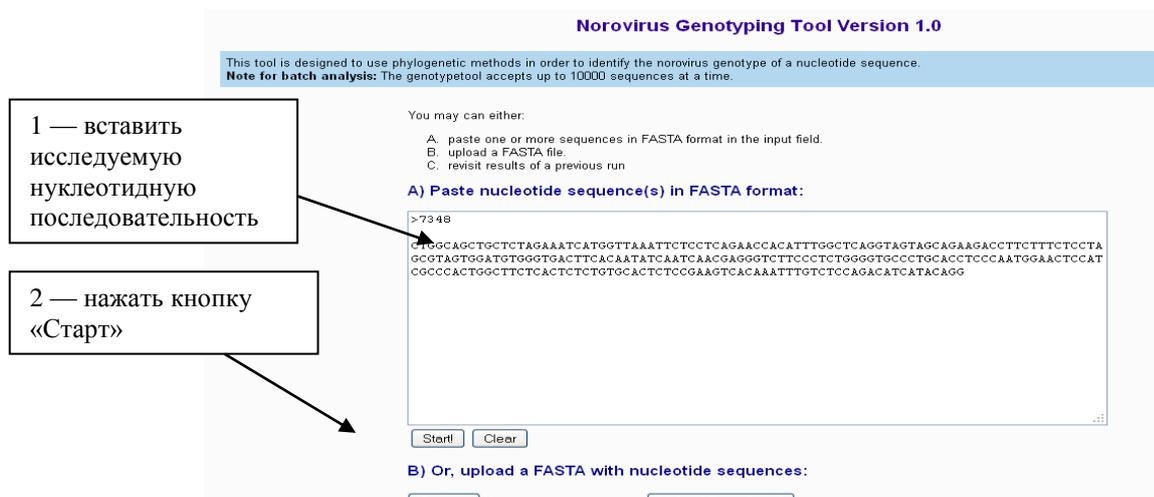


Рисунок 3. — Интерфейс окна программы «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0» для генотипирования норовирусов

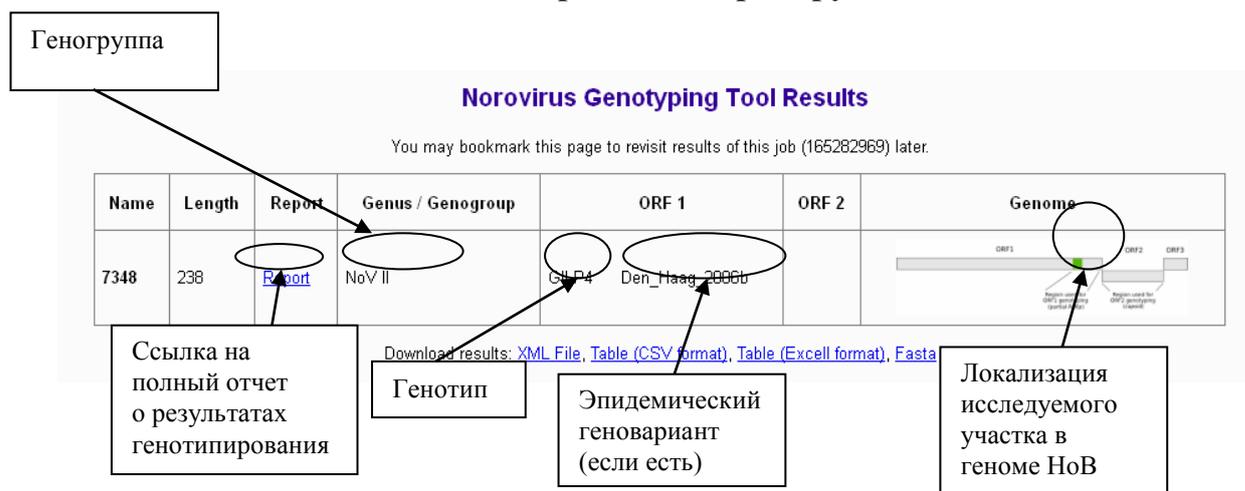


Рисунок 4. — Таблица результатов генотипирования норовирусов

4.7.2. Генотипирование энтеровирусов

Генотипирование энтеровирусов независимо от того, проводилось ли накопление фрагмента ДНК с праймерами для рода *Enterovirus* или для вида *Human Enterovirus B*, проводят в точном соответствии с инструкцией по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции» № 165-1208 от 11.05.2009.

4.8. Филогенетический анализ вирусов-контаминантов и этиологического агента заболеваемости

Исследуют нуклеотидные последовательности, полученные из 3–5 образцов клинического материала, собранные при расследовании групповой/внутрибольничной заболеваемости, и все нуклеотидные

последовательности, выделенные из проб объектов окружающей среды (вода, пищевые продукты), обследование которых проводилось по эпидпоказаниям. Дополнительно в филогенетический анализ включают нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank, выбранные по следующим критериям:

- максимальная доля идентичных нуклеотидов с исследуемыми нуклеотидными последовательностями. Ссылки на эти последовательности расположены в верхних строках таблицы результатов поиска BLAST;

- нуклеотидные последовательности вирусов того же типа, циркулировавшие в сопредельных странах;

- нуклеотидные последовательности вирусов, выделенных тот же период времени, что и исследуемые;

- нуклеотидная последовательность прототипного штамма того же серотипа энтеровирусов или того же генотипа норовирусов;

- нуклеотидная последовательность прототипного штамма следующего наиболее близкого серотипа энтеровирусов или генотипа норовирусов (внешняя группа).

Реконструкцию филогенетических взаимоотношений выбранных нуклеотидных последовательностей проводят в соответствии с инструкцией по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции» № 165-1208 от 11.05.2009. Результатом филогенетической реконструкции является эволюционное древо. Его передают в виде файла специалистам опорных баз.

4.9. Установление путей и факторов передачи инфекции

Если все исследуемые нуклеотидные последовательности (выделенные из объектов окружающей среды и полученные от пациентов при расшифровке этиологии групповой/внутрибольничной заболеваемости) формируют монофилетический кластер на эволюционном древе, то это является свидетельством наличия у них гипотетического общего предка и является молекулярно-эпидемиологическим доказательством роли исследуемых объектов внешней среды как факторов и/или путей распространения инфекции. После дополнения этих данных результатами эпидемиологического расследования, указывающими на роль факторов окружающей среды в развитии заболеваемости, получают окончательное доказательство внешнесредового пути распространения инфекции.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Получение ложноположительного результата

Пути устранения:

- 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.

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

Пути устранения:

- увеличение объема РНК с 10 до 20–30 мкл при постановке 1-го раунда ОТ-ПЦР;

- постановка 2-го раунда ПЦР в 3–4 повторах для каждой пробы, после проведения электрофореза и вырезания полос ДНК из геля объединение всех кусочков в 1 пробирке, дальнейшая очистка и секвенирование как 1 образца.

В некоторых случаях, несмотря на все предпринятые усилия, образцы, собранные из объектов окружающей среды, могут содержать низкое количество РНК вирусов-контаминантов, недостаточное для проведения их генотипирования. В этом случае заключение по участию факторов окружающей среды в формировании групповой/внутрибольничной заболеваемости делают по результатам эпидемиологического расследования.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения, в котором
внедрена инструкция

" _____ " _____ 20__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения

2. Кем предложено (наименование учреждения разработчика, автор)
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь

3. Источник информации

4. Где и когда начато внедрение

наименование лечебного учреждения, дата внедрения

5. Общее количество наблюдений

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____
Эффективность внедрения:

7. Замечания, предложения

Дата _____

Ответственные за
внедрение

должность, Ф.И.О., кафедра

подпись

Примечание: Акт внедрения направляется организации-разработчику (п. 2), пп. 4–8 заполняются организацией, внедрившей разработку.