

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -  
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: 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

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 необходимых медицинских изделий, реактивов, лекарственных средств и т.д.:**

- 1 автоклав;
- 2 автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 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 энтеровирусов 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 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 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-флюоресцентной 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 (минус 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.

### **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<sup>0</sup>С в течение суток до проведения лабораторной диагностики. Если проведение лабораторной диагностики осуществляется в более поздние сроки, клинические образцы хранят при минус 20<sup>0</sup>С.

1.6 Транспортировка образцов осуществляется с соблюдением холодовой цепи при минус 20<sup>0</sup>С.

## **2 Подтверждение вирусной контаминации объектов окружающей среды**

2.1 Подтверждение вирусной контаминации объекта окружающей среды осуществляется методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной 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-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, 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 г.

### **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 проведении их генотипирования 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 вирус-контаминантов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема генотипирования вирус-контаминантов

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

#### 4.1. Выделение РНК из проб с объектов окружающей среды

Проводится в соответствии с п. 5.4.1 настоящей инструкции

#### 4.2 Проведение 1-го этапа гнездовой ПЦР со стадией обратной транскрипции в одной пробирке

Для накопления фрагмента ДНК для молекулярного типирования используют 2-х стадию 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 проведения ОТ-ПЦР в одной пробирке

Тип выявляемого возбудителя	Название праймера	Последовательность, 5'→3'	Количество на реакцию, пмоль
Род Enterovirus	224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	50
	222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	50
Вид Human Enterovirus B	NestVP1F1	GARACDGGICAYACITCICARGT	30
	NestVP1R1	CCICCHGGIGGBAYRTACAT	30
Род Norovirus, геногруппа II	NoG2F	GCCCAGRCARGARCCNATGTT	20
	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT	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 <sup>0</sup> – 30 сек Отжиг: 42 <sup>0</sup> – 30 сек Элонгация: 60 <sup>0</sup> – 45 сек	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 <sup>0</sup> С – 30сек Отжиг: 55 <sup>0</sup> С – 3мин Элонгация: 72 <sup>0</sup> С – 40 сек	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 <sup>0</sup> С – 30 сек, Отжиг: 55 <sup>0</sup> С – 45 сек, Элонгация: 72 <sup>0</sup> С – 30 сек	40 циклов

После прохождения реакции пробирки помещают в холодильник (+2-8<sup>0</sup>С), где они находятся до постановки 2-го раунда гнездовой ПЦР, но не более 1 суток.

#### 4.3 Проведение 2-го раунда гнездовой ПЦР

Для проведения 2-го раунда гнездовой ПЦР 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 проведения 2-го раунда гнездовой ПЦР

Тип выявляемого возбудителя	Название праймера	Последовательность, 5'→3'	Кол-во на реакцию, пмоль
Род Enterovirus	AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	40
	AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACA T	40
Вид Human Enterovirus B	NestVP1 F2	GAYAMIATVCARACIMGVCA YGT	30
	NestVP1 R2	GGHGGYAYRTACATDAKYTGRTGDGT	30
Род Norovirus, II геногруппа	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 <sup>0</sup> – 30 сек Отжиг: 63 <sup>0</sup> – 1 мин Элонгация: 72 <sup>0</sup> – 40 сек	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 <sup>0</sup> С – 30 сек Отжиг: 53 <sup>0</sup> С – 3 мин Элонгация: 72 <sup>0</sup> С – 30 сек	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 <sup>0</sup> С – 30 сек Отжиг: 51 <sup>0</sup> С – 30 сек, Элонгация: 72 <sup>0</sup> С – 30 сек	45 циклов

После прохождения 2-го раунда реакции пробирки помещают в холодильник (+2-8<sup>0</sup>С), где они находятся до проведения электрофоретического разделения продуктов 2-го раунда реакции, но не более 1 суток.

#### 4.4 Электрофоретическое разделение продуктов реакции

Для выделения фрагмента ДНК проводят электрофорез в 2%-ном агарозном геле. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером. Размер фрагментов ДНК разных типов вирусов-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 коротковолновой и длинноволновой областью УФ-излучения, он должен быть переведен в положение, соответствующее длинноволновому УФ-излучению. При этом гель не должен подвергаться УФ-облучению дольше, чем в течение 30 сек – 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.

#### 4.5 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.

#### 4.6 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 260нм/280нм 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 (Рис.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 (Рис. 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.

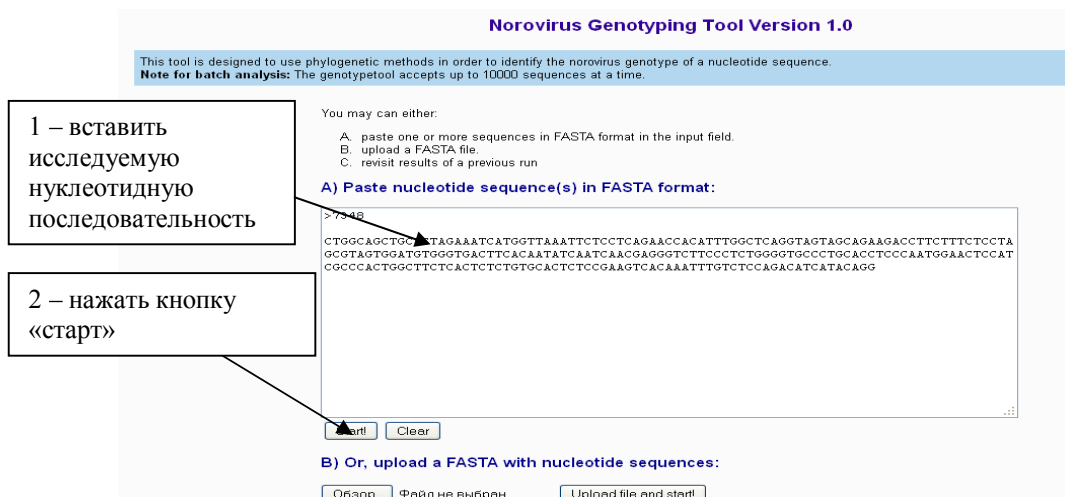


Рис.3 – Интерфейс окна программы «Norovirus Genotyping Tool Version 1.0» для генотипирования норовирусов

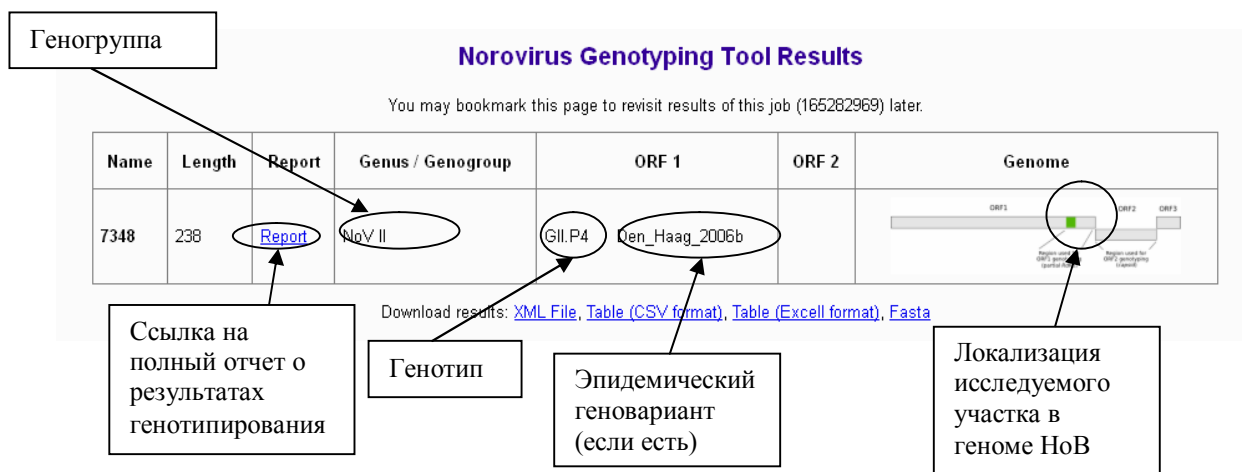


Рис. 4 – Таблица результатов генотипирования норовирусов

#### 4.7.2 Генотипирование энтеровирусов

Генотипирование энтеровирусов, вне зависимости 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» Рег. № 165-1208 от 11.05.2009 г.

#### 4.8 Филогенетический анализ вирусов-контаминантов и этиологического агента заболеваемости

Для филогенетического анализа 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» Рег. № 165-1208 от 11.05.2009 г. Результатом филогенетической реконструкции является эволюционное древо. Полученное эволюционное древо 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, 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.

### **5 Возможные проблемы при осуществлении лабораторной диагностики НоВИ и пути их устранения**

#### 5.1 Наличие 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.

5.2 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 вирус-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), п.п. 4-8  
заполняются организацией, внедрившей разработку.