

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный
санитарный врач

Республики Беларусь

Н.П. Жукова

19 сентября 2018 г.

Регистрационный № 022-1118



МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОРИ И КРАСНУХИ
И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

АВТОРЫ:

канд. биол. наук Г.В. Семейко, канд. биол. наук Е.Ю. Свирчевская, канд.
мед. наук М.А. Ермолович, д-р. мед. наук, профессор Е.О. Самойлович

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра —
Главный государственный
Санитарный врач
Республики Беларусь

_____ Н. П. Жукова
19.12.2018
Регистрационный № 022-1118

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОРИ И КРАСНУХИ
И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Г. В. Семейко, канд. биол. наук Е. Ю. Свирчевская,
канд. мед. наук М. А. Ермолович, д-р мед. наук, проф. Е. О. Самойлович

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы лабораторной диагностики кори и краснухи в условиях спорадической и групповой заболеваемости, включая методы генотипирования возбудителей, и оценка полученных данных.

Инструкция предназначена для врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов, осуществляющих лабораторную диагностику инфекционных заболеваний.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Корь и краснуха — вакциноуправляемые инфекции, находящиеся на стадии ликвидации. По мере снижения заболеваемости возрастает важность лабораторной верификации этих инфекций, что позволяет отличить их от других сходных по клинической картине заболеваний. При спорадической заболеваемости важно проводить обследование пациентов на обе эти инфекции с использованием серологических и молекулярных методов. В случае групповой заболеваемости важно лабораторно подтвердить первые случаи, далее диагностика может осуществляться на основании эпидемиологической связи. Для целей молекулярной эпидемиологии и дифференциации местных и завозных случаев важно определить генотип вируса для каждого спорадического случая и каждой цепочки передачи вируса при групповой заболеваемости.

Основу лабораторной диагностики кори и краснухи составляет определение в сыворотке крови вирус-специфических IgM антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). При необходимости исследуется нарастание концентрации специфических IgG антител в парных сыворотках методом ИФА и проводится выявление вирусной РНК в моче и носоглоточных мазках методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

Вакутайнеры 5 мл для забора крови из вены.

Скарификаторы, капилляры, резиновая груша, центрифужные пробирки для забора крови из пальца.

Набор для забора носоглоточных мазков (стерильный зонд-тампон в пробирке).

Стерильная емкость с крышкой для сбора мочи.

Оборудование и расходные материалы для лабораторных исследований

Автоматические пипетки переменного объема: 2–20, 20–200, 200–1000 мкл.

Автоматический ДНК-анализатор.

Камера для горизонтального электрофореза.

Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой.

Наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером в штативах, стерильные, с маркировкой «RNase, DNase free».

Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с маркировкой «RNase, DNase free»).

СВЧ-печь (для плавления агарозы, может быть заменена водяной баней).

Система документирования гелей.

Спектрофотометр.

Термоциклер для рутинной ПЦР/термоциклер с оптическим модулем для ПЦР в реальном времени.

Трансиллюминатор.

Холодильник-морозильник (от -18 до -20 °С, от 4 до 8 °С).

Центрифуга-вортекс.

Центрифуга высокоскоростная (с ротором для пробирок типа «Эппендорф», 12000 об/мин).

Реагенты для проведения лабораторных исследований

Агароза.

Буфер для загрузки ПЦР образцов в гель.

Вода для молекулярной биологии (свободная от РНКаз/ДНКаз).

ДНК-маркер молекулярного веса 10–1000 пар оснований.

Изопропиловый спирт.

Ингибитор РНКаз.

Интеркалирующий краситель (бромистый этидий или аналог).

Набор для выявления IgM антител к вирусу кори.

Набор для выявления IgG антител к вирусу кори.

Набор для выявления IgM антител к вирусу краснухи.

Набор для выявления IgG антител к вирусу краснухи.

Набор для выделения РНК из образцов, содержащих низкое количество нуклеиновых кислот.

Набор для ПЦР со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР).

Набор для очистки ДНК из геля.

Набор для секвенирования.

Олигонуклеотиды для амплификации фрагментов ДНК и зонды.

Трис-ацетатный буфер, рН 8,5.

Этиловый спирт ректифицированный.

Сбор и первичная обработка клинических образцов

Лабораторная диагностика кори и краснухи включает использование серологических и вирусологических методов. Виды исследуемого клинического материала, сроки его сбора и выявляемые диагностические маркеры представлены в таблице 1.

Сыворотка крови. Для выявления специфических IgM и IgG антител может быть использована кровь, забранная как из вены, так и из пальца. Сыворотка может храниться и транспортироваться при 2–8 °С в течение 7 дней с момента забора. Более длительное хранение проводится при -20 °С.

Важно не допускать повторных циклов замораживания-оттаивания сыворотки крови, так как это оказывает разрушающее действие на специфические антитела и приводит к искажению результатов исследования.

Таблица 1. — Виды и сроки сбора клинических образцов и лабораторные маркеры, используемые для диагностики кори и краснухи

Вид клинического материала	Оптимальные сроки сбора материала	Диагностический маркер
Корь		
Сыворотка крови	С 4-го по 28-й день от начала сыпи	Специфические IgM антитела
	Сыворотка 1 — первые дни от начала сыпи (не позднее 7-го дня), сыворотка 2 — через 10–21-й день	Наращение концентрации специфических IgG антител в парных сыворотках
Носоглоточный мазок	С 1-го по 5-й день от начала сыпи	РНК вируса кори
Моча	С 1-го по 7-й день от начала сыпи	РНК вируса кори
Краснуха		
Сыворотка крови	С 6-го по 28-й день от начала сыпи	Специфические IgM антитела
	Сыворотка 1 – первые дни от начала сыпи (не позднее 7-го дня), сыворотка 2 — через 10–21-й день	Наращение концентрации специфических IgG антител в парных сыворотках
Носоглоточный мазок	С 1-го по 5-й день от начала сыпи	РНК вируса краснухи
Моча	С 1-го по 7-й день от начала сыпи	РНК вируса краснухи

Мазки со слизистой оболочки носоглотки. Мазок со слизистой оболочки носоглотки может быть получен с использованием коммерческих наборов для сбора образцов для вирусологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя. **Не использовать гельсодержащие наборы для сбора образцов для бактериологических исследований!** При отсутствии коммерческих наборов используйте стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Для забора образца тампон помещают между щекой и десной и удерживают до полного намочения, при этом аккуратными движениями потирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Тампон вносят в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды, обламывают палочку и плотно укупоривают пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре 2–8 °С в течение 48 ч после сбора.

При условии доставки образца в лабораторию в течение 2 ч после сбора допустимо поместить тампон с образцом в сухую стерильную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. В лаборатории в пробирку добавляют 2 мл вирусной транспортной среды, тщательно перемешивают на вортексе и оставляют на 1 ч при 2–4 °С для элюирования вируса. Затем тампон извлекают из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Образец центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 мин, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Моча. Предпочтительно собирать первую утреннюю порцию мочи, которая содержит наибольшее количество эпителиальных клеток. Мочу в объеме 10–50 мл

собирают в стерильный промаркированный флакон, плотно укупоривают и в день сбора отправляют с соблюдением холодной цепи в лабораторию, диагностирующую корь и краснуху. Если доставка в тот же день не представляется возможной, образец хранят в течение суток при температуре 4 °С. Образец нельзя замораживать. В лаборатории образец центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 мин, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Важно не допускать повторного замораживания-оттаивания носоглоточных мазков и мочи или их длительного хранения при -20 °С, так как это оказывает повреждающее действие на вирус.

Информация по биологической безопасности

Клинические образцы потенциально могут содержать широкое разнообразие возбудителей инфекционных заболеваний, поэтому все манипуляции необходимо проводить с соблюдением правил работы с инфицированным материалом и использованием средств индивидуальной защиты.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Лабораторная верификация диагноза кори и краснухи у пациентов с клиническими проявлениями, совместимыми с этими заболеваниями.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Выявление специфических IgM и IgG антител к вирусам кори и краснухи методом ИФА

Специфические IgM и IgG антитела к вирусам кори и краснухи выявляются с использованием коммерческих тест-систем для ИФА, зарегистрированных в Республике Беларусь. Исследование и интерпретация результатов проводятся строго в соответствии с инструкцией производителя.

Интерпретация результатов

Выявление специфических IgM антител к вирусам кори и краснухи является основным методом подтверждения диагноза. В то же время данный метод имеет ряд ограничений.

Ложноотрицательный результат может быть получен при исследовании рано взятых образцов, т. е. в период, когда иммунный ответ еще не сформировался, или уровень IgM ниже детектируемого в ИФА. К рано взятым относятся образцы, взятые до 4-го дня от начала сыпи для кори и до 6-го дня — для краснухи (таблица 1). В эти сроки до 20 % пациентов еще не имеют вирус-специфических антител. Если отрицательный результат получен при исследовании рано взятого образца сыворотки крови, рекомендуется забор и исследование второго образца.

Трудности в классификации случая у лиц с положительным уровнем IgM антител, у которых сыпь развилась через 7–14 дней после иммунизации. Диагноз

кори/краснухи может быть отвергнут, если имеется единичный случай появления макуло-папулезной сыпи у привитого в рамках рутинной иммунизации. Если же вакцинация проведена в очаге инфекции или в рамках ответных мер на вспышку, то такой случай на основании положительного результата исследования IgM антител должен быть классифицирован как корь/краснуха (если нет возможности подтвердить выделение от данного пациента вакцинного штамма вируса кори или краснухи).

Убедительным подтверждением диагноза является выявление сероконверсии вирус-специфических IgG антител: при одновременном исследовании парных сывороток первый образец является отрицательным, второй — положительным (таблица 1).

Диагностически значимое нарастание концентрации IgG может быть определено только в валидированной тест-системе для количественной оценки этого показателя. Критерии диагностически значимого нарастания концентрации IgG зависят от конкретной тест-системы. Показатели оптической плотности не являются прямым отражением концентрации антител и не могут непосредственно использоваться для такой оценки.

В сложных для серологической диагностики случаях следует провести вирусологическое исследование соответствующих образцов (носоглоточный мазок, моча).

Выделение РНК

Выделение РНК из образцов мочи и мазков со слизистой оболочки носоглотки выполняют с использованием разрешенных для применения на территории Республики Беларусь коммерческих наборов, предназначенных для выделения РНК из клинического материала, в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Диагностическая однораундовая ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса кори и вируса краснухи

При проведении диагностической ОТ-ПЦР каждый образец тестируется параллельно в двух реакциях: с праймерами к вирусу кори или вирусу краснухи и праймерами к рибонуклеазе Р (РНКазе Р), которая присутствует во всех клетках человека и используется в качестве внутреннего контроля для оценки эффективности выделения РНК.

Для снижения риска контаминации и повышения чувствительности реакции исследование проводят в однораундовой ОТ-ПЦР с использованием коммерческих наборов, разрешенных для применения на территории Республики Беларусь, в соответствии с прилагаемой инструкцией (рекомендуется использовать набор для ОТ-ПЦР в реальном времени). Реакцию проводят в объеме 25 мкл. Дополнительно в состав реакционной смеси для ОТ-ПЦР добавляют специфические праймеры и зонд, последовательности которых и количество на реакцию указаны в таблице 2, а также 10 единиц ингибитора РНКаз. Выделенную РНК добавляют в количестве 2,5 мкл. Режим амплификации представлен в таблице 3.

Таблица 2. — Праймеры и зонды для проведения однораундовой диагностической ОТ-ПЦР в реальном времени

Выявляемый возбудитель	Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Количество на реакцию, пмоль
Вирус кори	MV-N-F	TGGCATCTGAACTCGGTATCAC	7,5
	MV-N-R	TGTCCTCAGTAGTATGCATTGCAA	7,5
	MV-N-P	FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGABHQ	6,25
Вирус краснухи	RV11	CAACACGCCGCACGGACAAC	10,0
	RV12-1	CCACAAGCCGCGAGCAGTCA	10,0
	RV12-2	CCACGAGCCGCGAACAGTCG	10,0
	RV-P	FAM-AGGTCCAGGTCCC GCCCGAC-BHQ	5,0
РНКаза Р человека	hRNaseP-F	AGATTTGGACCTGCGAGCG	7,5
	hRNaseP-R	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	7,5
	hRNaseP-P	FAM-ТТСТGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ	2,5

Таблица 3. — Режим амплификации для проведения однораундовой диагностической ОТ-ПЦР в реальном времени

Обратная транскрипция	48°C — 30 мин
Активация ДНК-полимеразы	95°C — 5 мин
Амплификация: 95 °C — 15 с 60 °C — 1 мин	40 циклов

Контроль качества реакции

Реакция подлежит учету при следующих условиях:

отрицательные контроли обеих реакций (с праймерами к вирусу кори или краснухи и праймерами к РНКазе Р человека) отрицательные;

автоматически определенная пороговая линия располагается в пределах экспоненциальной фазы амплификации;

значение порогового цикла C_t положительных контролей обеих реакций менее 35.

В случае несоответствия полученных результатов любому из указанных критериев реакцию необходимо повторить. Если изложенные критерии соблюдены, результаты исследования образцов интерпретируют в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. — Интерпретация результатов диагностической ОТ-ПЦР

Вирус кори/краснухи	РНКаза Р	Результат
$C_t < 40$	$C_t < 40$	Положительный
Отрицательный	$C_t < 40$	Отрицательный
$C_t < 40$	Отрицательный	Положительный
Отрицательный	Отрицательный	Неопределенный

Неопределенный результат может свидетельствовать о проблемах с выделением РНК и/или наличием ингибиторов ПЦР в образце. В таком случае

рекомендуется выделение РНК повторно, по возможности с использованием другого метода.

Генотипирование вирусов кори и краснухи

Генотипирование вирусов кори и краснухи включает амплификацию предназначенного для генотипирования фрагмента генома, детекцию продуктов реакции в агарозном геле, очистку ДНК из геля, секвенирование ДНК и сравнение полученной нуклеотидной последовательности с эталонными последовательностями известных генотипов.

Для генотипирования вируса отбирают пробы, предварительно исследованные с помощью диагностической ОТ-ПЦР, для которых значение C_t составило не ниже 37.

Однораундовая ОТ-ПЦР для генотипирования вируса кори

Для определения генотипа вируса кори анализируется участок N гена длиной 450 нуклеотидов. Для снижения риска контаминации и повышения чувствительности реакции исследование проводят в однораундовой ОТ-ПЦР с использованием коммерческих наборов, разрешенных для применения на территории Республики Беларусь, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Объем реакционной смеси составляет 50 мкл. Дополнительно в состав реакционной смеси добавляют специфические праймеры (таблица 5) и 10 единиц ингибитора РНКаз. Выделенную РНК добавляют в количестве 5 мкл. Режим амплификации представлен в таблице 6.

Таблица 5. — Специфические праймеры для однораундовой ОТ-ПЦР для генотипирования вируса кори

Название	Направление	Последовательность (5'→3')	Количество на реакцию, пмоль	Длина ПЦР продукта (п.н.)
MeV216	Прямой	TGGAGCTATGCCATGGGAGT	30	634
MeV214	Обратный	TAACAATGATGGAGGGGTAGG	30	

Таблица 6. — Режим амплификации для проведения однораундовой ОТ-ПЦР для генотипирования

Обратная транскрипция	50°C — 30 мин
Активация ДНК-полимеразы	95°C — 15 мин
Амплификация: 95 °C — 30 с 55 °C — 30 с 72 °C — 30 с	40 циклов
Финальная элонгация	72 °C — 10 мин

Однораундовая ОТ-ПЦР для генотипирования вируса краснухи

Генотипирование вируса краснухи выполняется на основании анализа нуклеотидной последовательности варибельного участка E1 гена длиной 739 нуклеотидов. Высокое содержание Г-Ц пар в геноме вируса краснухи (около 69,5 %) обуславливает наличие стабильных вторичных структур, что значительно осложняет работу с ним. Кроме того, содержание вируса в клиническом

материале, даже собранном в оптимальные сроки, является невысоким. Поскольку участок для генотипирования достаточно длинный, для получения необходимой нуклеотидной последовательности он разделен на два перекрывающихся фрагмента. Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для их амплификации, представлены в таблице 7.

Таблица 7. — Праймеры для однораундовой ОТ-ПЦР для генотипирования вируса краснухи

Название	Направление	Последовательность (5'→3')	Длина ПЦР продукта (п.н.)	Количество на реакцию, пмоль
Фрагмент 1				
8633F	прямой	AGCGACGCGGCCTGCTGGGG	480	30
9112R	обратный	GCGCGCCTGAGAGCCTATGAC		30
Фрагмент 2				
8945F	прямой	TGGGCCTCCCCGGTTTG	633	30
9577R	обратный	CGCCCAGGTCTGCCGGGTCTC		30

Для амплификации вируса краснухи рекомендуется использовать набор, предназначенный для РНК/ДНК с высоким содержанием Г-Ц пар. Состав реакционной смеси и условия амплификации для вируса краснухи аналогичны вышеописанным для вируса кори.

Электрофорез в агарозном геле

Контроль наличия продуктов амплификации выполняют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 115 В в течение 30 мин. Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора по сравнению с ДНК-маркером.

Размер ПЦР-продукта для вируса кори составляет 634 п.н.

Размер ПЦР-продуктов для вируса краснухи составляет 480 и 633 п.н.

При наличии в дорожках геля соответствующей полосы ее вырезают и помещают в стерильную пробирку для последующей очистки.

Очистка образцов ДНК из агарозного геля

Очистка амплифицированных фрагментов ДНК вирусов кори и краснухи осуществляется с помощью соответствующих коммерческих наборов согласно инструкции производителя.

Секвенирование ДНК по методу Сэнгера

Первым этапом является измерение концентрации ДНК в исследуемых пробах и оценка качества ее очистки. Концентрация ДНК определяется спектрофотометрически по измерению оптической плотности раствора при длине волны 260 нм. Для установления чистоты препарата проводят измерение при длинах волн 260 и 280 нм. Препарат считается чистым, если соотношение значений 260/280 нм приблизительно равно 1,8; более низкие значения свидетельствуют о наличии примеси белков в растворе нуклеиновой кислоты.

Вторым этапом является реакция термоциклического секвенирования, которая проводится с применением коммерческих наборов, разработанных для

использования на соответствующей модели секвенатора. Для каждой пробы проводят две реакции — отдельно с прямым и обратным праймером, которые использовались в ПЦР (таблица 5 и 7). В каждую пробирку с реакционной смесью вносят только один праймер. Постановку реакции осуществляют в соответствии с инструкцией к используемому набору.

Третий этап — очистка продуктов реакции термоциклического секвенирования. Осуществляется либо с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией, либо методом преципитации этанолом. 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 выполняется с помощью автоматического ДНК-анализатора согласно инструкции к прибору с использованием соответствующего программного обеспечения.

Генотипирование вируса кори

После получения нуклеотидной последовательности фрагмента N гена длиной 450 нуклеотидов, генотип вируса кори определяется путем сравнения с эталонными последовательностями признанных генотипов с использованием программы, встроенной в Международную базу данных нуклеотидных последовательностей вируса кори MeaNS — Measles Nucleotide Surveillance (<http://www.who-measles.org>).

Войдя на страницу базы данных, необходимо перейти в раздел Sequence analysis, а затем — Genotype. Исследуемую нуклеотидную последовательность вируса кори вставляют в соответствующее окно и нажимают кнопку «генотипировать» (рисунок 1).

MeaNS Measles Nucleotide Surveillance

Welcome
Contributing user
21 November 2018, 09:44
Logout

Charts WHO Map Data **Sequence analysis** Home About us Overview Contact us T&C

Sequence match **Genotype** Phylogeny Monthly Summary NL Summary NL Listing

Genotyping Tool

Genotype is assigned to the input sequence based on sequence similarity to the WHO reference sequences. This is either calculated for the C-terminal 450 nucleotides of the Nucleoprotein (N) gene or the full length Hemagglutinin (H) gene of

I agree to deposit this sequence to the MeaNS system - Yes No

Select genotyping gene - Nucleoprotein (N) Hemagglutinin (H)

Please input your sequence:

GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACCTCGGTATCACTGCCGAGSAGTGAAGGCTTGTTCAGAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGACAGTAGAGAGTTGGACCCAGACAAGCTCAAGTGTCTATTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAAATGAGCTACCA
GGATTGGGGGGCAAGGAAGATAGGAGGGTCAGACAGAGTCCGGGAGAGCCAGGGAGAGCAACAGAGAAACCCGGTCCAGCAGATCAAGTGATGCGAGAGCTGCCCATCTTCCAACCAGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATCGGAGTCAGGCCAAGATCCG
CAGGACAGTCTGAAGGTCAGCTGCACCCCTGCTCAGGCTGCAAGCCATGGCAGGGATCCTGGAAAGAACAAAGTTTCAGACACGGACACCCCCAGGGTGTACAATGACAGAGATCTTCTAGAC

Sample data: Measles virus N gene - **Genotype: A** (WHO name: Edmonston-wt.USA/54; Genbank id: U01987)
Measles virus H gene - **Genotype: A** (WHO name: Edmonston-wt.USA/54; Genbank id: U03669)

Genotype **Clear this form**

1 – вставить исследуемую нуклеотидную последовательность

2 – нажать кнопку «генотипировать»

Рисунок 1. — Интерфейс окна программы для генотипирования вируса кори

После обработки и анализа данных на странице появляется раздел с результатами генотипирования. В таблице представлены эталонные последовательности признанных генотипов с максимальной долей идентичных нуклеотидов с исследуемой нуклеотидной последовательностью. Ниже представлены в сравнении две последовательности, исследуемая и максимально похожая эталонная, с указанием различий (рисунок 2).

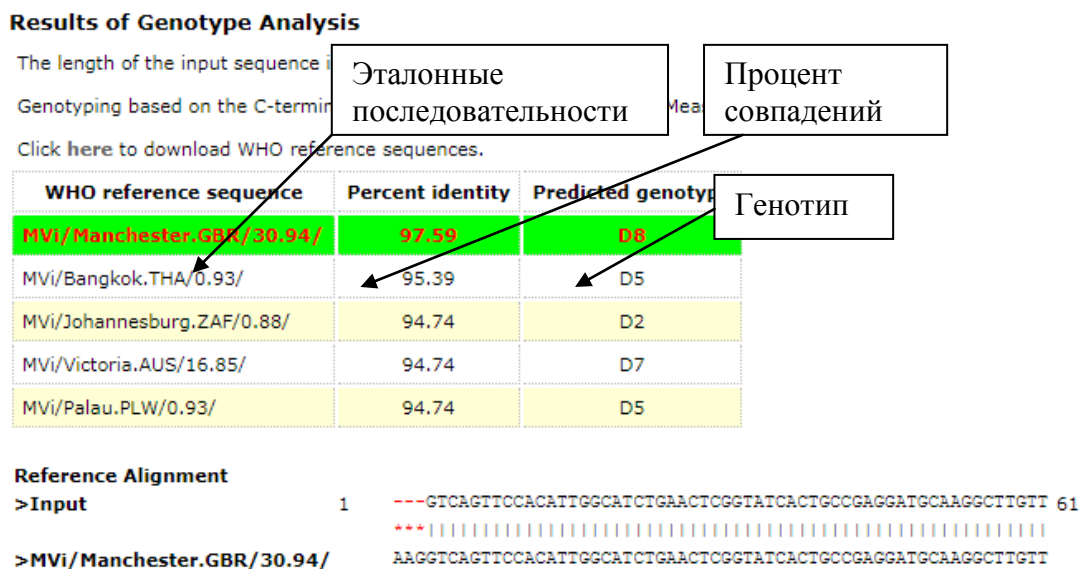


Рисунок 2. — Раздел результатов генотипирования вируса кори

Генотипирование вируса краснухи

Генотипирование вирусов краснухи проводится с использованием программы, встроенной в Международную базу данных нуклеотидных последовательностей вируса краснухи RubENS — Rubella Nucleotide Surveillance (<http://www.who-rubella.org>).

Генотипирование вируса краснухи выполняется путем сравнения нуклеотидной последовательности участка E1 гена длиной 739 нуклеотидов с эталонными последовательностями признанных генотипов. Для этого необходимо перейти в раздел «Tools» на странице базы данных и выбрать вкладку «Genotyping tool». Исследуемую нуклеотидную последовательность вируса краснухи вставляют в соответствующее окно и нажимают кнопку «отправить» (рисунок 3).

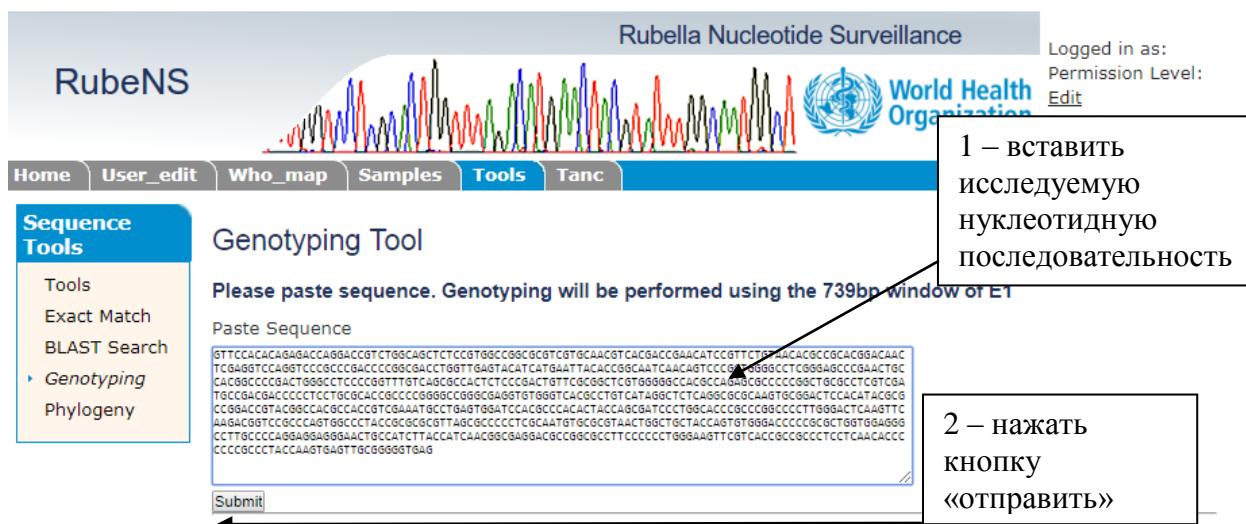


Рисунок 3. — Интерфейс окна программы для генотипирования вируса краснухи

После обработки данных появляется страница, где указан генотип и степень достоверности полученного результата (рисунок 4).

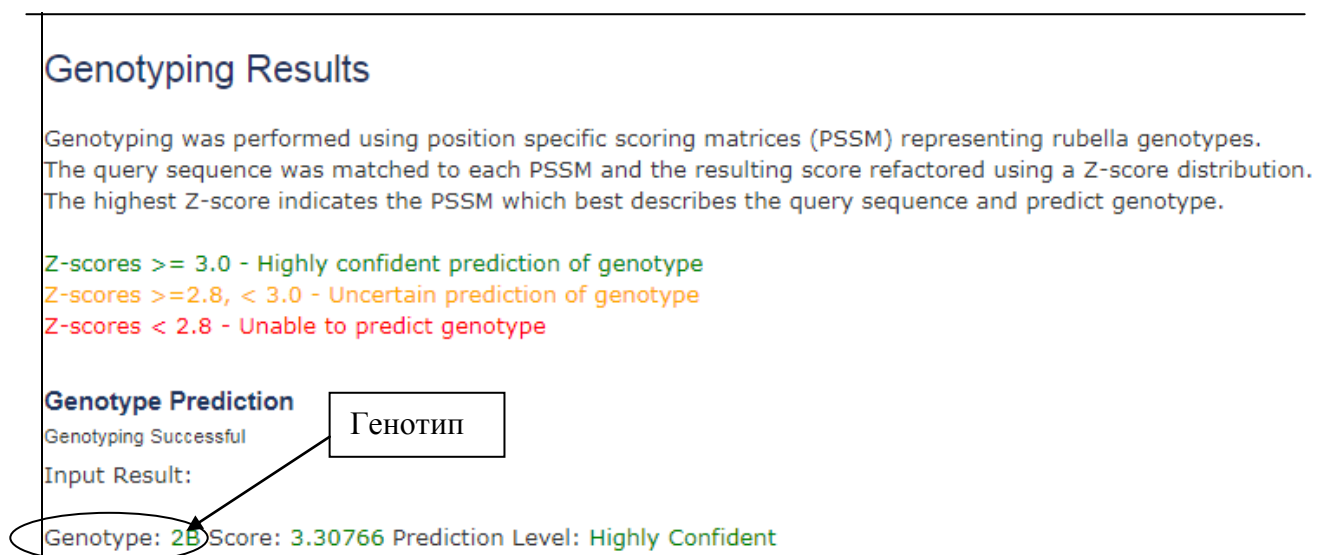


Рисунок 4. — Раздел результатов генотипирования вируса краснухи

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

<p>В ИФА значения оптической плотности контрольных образцов не соответствуют указанным в сертификате контроля качества данной партии</p>	<p>Тест считается недействительным и его надо повторить, учитывая все требования к его проведению</p>
<p>Реакционная смесь во всех лунках имеет специфическое окрашивание</p>	<p>При хранении появилось окрашивание субстрата. Такой субстрат использовать нельзя</p>

Несоответствие интенсивности окрашивания и оптической плотности реакционной смеси в лунках	Промывочный буфер мутный. Помутневший раствор использовать нельзя
Все пробы в ПЦР отрицательные, включая положительный контроль	Пропущен компонент ПЦР-смеси, задан неправильный режим амплификации, использованы реагенты с истекшим сроком годности
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировала или не была добавлена
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Реагенты контаминированы
Не удается выполнить секвенирование, хотя в генотипирующей ОТ-ПЦР получен целевой ПЦР-продукт	Низкое содержание ДНК. Повторно выполнить генотипирующую ОТ-ПЦР для накопления большего количества ПЦР-продукта