Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Государственная система
санитарно-эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ИЗДАНИЕ

МОСКВА — 2016

Издается с 2000 года

Выпуск 3 Сентябрь (65)

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

УЧРЕДИТЕЛЬ

Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации от 24 января 2012 г. ПИ № ФС77-48297

Формат 60×84/8, усл. печ. л. 16,74, заказ , тираж 500 экз.

Подписано в печать 17.06.16

Оригинал-макет подготовлен к печати отделом научно-методического обеспечения ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора

Реализация: 8 (495) 952-5089

E-mail: gost.e-ecolog.ru

Подписка
на *Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора* принимается во всех почтовых отделениях России.

Подписной индекс
в каталоге ОАО «Агентство «Роспечать» *«Газеты. Журналы»* – **79682**,
в объединенном каталоге ОАО «Агентство «Книга-Сервис» *«Пресса России»* – **29895**

Адрес издателя:

117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

Выпуск 3 (65), сентябрь 2016

Издается с 2000 г.

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

Главный редактор Попова А.Ю.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Андрияшина Н.В.	Орлов М.С.	Селюнина С.В.
Беляев Е.Н.	Прусаков О.В.	Смоленский В.Ю.
Ежлова Е.Б.	Сенникова В.Г.	Шевкун И.Г.

© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами: СП 3.1.3310—15 3

Ориентировочные допустимые концентрации (ОДК) полихлорированных дибензо-n-диоксинов и дибензофуранов (в пересчете на 2,3,7,8-тетрахлор-дибензо-пара-диоксин и его аналоги) в почве населенных мест, сельскохозяйственных угодий и промышленной площадки: ГН 2.1.7.3298—15 15

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения оксидом бериллия поверхности технологического оборудования: ГН 2.2.5.3299—15 17

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения нитроглицерином средств индивидуальной защиты: ГН 2.2.5.3300—15 19

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения нитроглицерином поверхностей технологического оборудования: ГН 2.2.5.3301—15 21

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения нитроглицерином невпитывающих поверхностей строительных конструкций: ГН 2.2.5.3302—15 23

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадки денге: МР 4.2.0108—16 25

Дезинфекционный режим в медицинских организациях в целях профилактики лихорадки Зика: МР 3.5.1.0109—16 39

Организация и проведение мероприятий по энтомологическому мониторингу и регуляции численности кровососущих комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*: МР 3.5.2.0110—16 54

Методика определения должной теплоизоляции обуви и рукавиц, предназначенных для защиты от холода: МР 2.2.8.0111—16 76

Измерение концентраций вредных веществ в воздухе рабочей зоны: Сборник МУК 4.1.3333—4.1.3336—16. Выпуск 58 88

Измерение концентраций пиметрозина в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии: МУК 4.1.3355—16 124

Измерение массовой концентрации акролеина в атмосферном воздухе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.3356—16 133

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
1 февраля 2016 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадки денге

Методические рекомендации
МР 4.2.0108—16

1. Область применения

1.1. Методические рекомендации (далее – МР) определяют порядок организации и проведения лабораторной диагностики лихорадки денге (далее – ЛД) и носят рекомендательный характер.

1.2. Настоящие МР предназначены для специалистов лабораторий, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с возбудителями опасных инфекционных болезней.

2. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. Постановление Правительства Российской Федерации от 15.09.2005 № 569 «О положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

3. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.11.2013 № 64 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)» (зарегистрировано в Минюсте России 19.05.2014, регистрационный номер 32325).

4. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.04.2003 № 85 «О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил СП 1.2.1318—03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами» (зарегистрировано в Минюсте России 19.05.2003, регистрационный номер 4558).

5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.05.2007 № 27 «О реализации Международных медико-санитарных правил (2005)» (зарегистрировано в Минюсте России 31.05.2007, регистрационный номер 9575).

6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера» (зарегистрировано в Минюсте России 24.03.2016, регистрационный номер 41525).

3. Общие положения

Лихорадка денге относится к острым природно-очаговым арбовирусным инфекционным заболеваниям с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, характеризующимся лихорадкой, общей интоксикацией, миалгией, артралгией, лимфоаденопатией, экзантемой, иногда геморрагическим синдромом.

Возбудитель ЛД – вирус денге (*Dengue virus)*, входящий в семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus*, серогруппу вируса денге (*Dengue virus group*), относится ко II группе патогенности (опасности) по классификации патогенности, действующей на территории Российской Федерации. Существует 4 субтипа вируса денге, различающихся серологически и генетически. Все четыре разновидности вируса денге способны вызвать ЛД, в том числе ее геморрагическую форму. Как правило, эта тяжелая форма возникает при повторном инфицировании другим субтипом вируса.

Ареал ЛД охватывает территории более чем 100 тропических и субтропических стран Африки, Америки, Южной и Юго-Восточной Азии, Океании и Австралии. Имеется информация об эпидемиях и вспышках этого заболевания в южных регионах Европы. В Российской Федерации существует вероятность формирования аутохтонных очагов ЛД на территории Черноморского побережья (Сочи и Сочинский район, Крым).

В последнее время в связи с развитием массового туризма, интенсификацией миграционных процессов и деловых связей возникла проблема завозных случаев этих заболеваний из тропических и субтропических стран в неэндемичные районы. Известны данные об импортированных случаях ЛД в Швеции, Финляндии, других европейских странах, в США, лихорадки Чикунгунья в Японии, Германии, Италии и других государствах Европы, Китае, Израиле, москитной лихорадки Тоскана (эндемичной в Средиземноморском регионе) в США, Германии и Швеции. Имеется информация о завозных случаях других арбовирусных инфекций. В течение шести лет (2009—2014 гг.) сотрудниками Инфекционной больницы № 1 г. Москвы и НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздрава России было диагностировано в общей сложности 178 лабораторно верифицированных случаев лихорадки денге (152), лихорадки Чикунгунья (16), лихорадки Западного Нила (6), москитных лихорадок (3) и японского энцефалита (1) среди лиц, госпитализированных после возвращения из поездок в тропические страны.

По данным Роспотребнадзора, в Российской Федерации наблюдалась следующая динамика регистрации завозных случаев ЛД: в 2012 г. – 63, в 2013 г. – 170, за 8 месяцев 2014 г. – 77, за 10 месяцев 2015 года – 100.

В эндемичных странах мира ежегодно регистрируются до 100 млн случаев ЛД в классической форме и примерно 500 000 в виде геморрагической лихорадки, летальность при которой достигает 15—20 %. Источником инфекции являются больные люди, обезьяны, возможно летучие мыши. Известны две эпидемиологические формы ЛД: джунглевая и городская. Переносчиками вируса при джунглевой форме являются комары *Aedes niveus* (нападающие как на обезьян, так и на людей), при городской эпидемиологической форме лихорадки – синантропные комары преимущественно *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*. Вирус способен размножаться в комарах при температуре воздуха не ниже 22 °С.

Вирусный геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности длиной около 11 тыс. нуклеотидов. РНК кодирует три структурных (С, prM/M, Е) и семь неструктурных (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) белков.

Основным иммуногенным белком вириона является белок Е, который играет доминирующую роль в генерации нейтрализующих антител и индукции иммунного ответа. На поверхности инфицированных клеток экспрессируется неструктурный гликопротеин NS1, который может секретироваться, инициирует активацию системы комплемента и играет важную роль в развитии шока при геморрагической ЛД.

Инкубационный период ЛД составляет от 2 до 15 дней после укуса инфицированного комара (чаще 5—7 дней), после чего развивается лихорадка, продолжающаяся 6—7 дней и иногда носящая двухфазный характер. Заболевание начинается внезапно с повышения температуры до 39—40 °С, появления озноба, болей в костях и мышцах поясничного отдела позвоночника, прямых мышцах живота, крестце, коленных суставах. Отмечается резкая слабость, головная боль, боль в глазных яблоках, светобоязнь, головокружение, потеря аппетита, возможна тошнота и рвота, бессонница, ощущение сухости во рту и сухости губ. У большинства больных увеличиваются периферические лимфатические узлы. Часто появляется экзантема, для которой характерен полиморфизм. Могут быть геморрагические проявления различной степени выраженности (от петехий до органных кровотечений). Лихорадка продолжается 2—7 дней, иногда она носит двухфазный характер и, как правило, заканчивается выздоровлением. Заболевание сопровождается ретроорбитальными болями, миалгией и артралгией. Отмечается покраснение кожи лица и груди с выраженной дерматографией. Примерно в 50 % случаев регистрируется макулопапулезная сыпь. В крови регистрируются лейкопения и тромбоцитопения, повышение уровня трансаминаз. По клиническому течению различают 2 формы ЛД: лихорадочную форму (классическую) и геморрагическую (протекает более тяжело, возможно развитие шокового состояния). В Международной классификации болезней 10-го пересмотра классическая ЛД имеет код А90, геморрагическая ЛД – А91.

Особенностью иммунопатогенеза геморрагической ЛД является то, что специфические антитела могут опосредовать феномен антителозависимого усиления инфекции. Антителозависимое усиление включает повышение связывания вируса с клетками, экспрессирующими рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов, после опсонизации антителами. Этот механизм может способствовать утяжелению течения заболевания, часто наблюдаемому при повторном инфицировании гетерологичным вирусом денге.

При геморрагической ЛД летальность достигает 5 %, а среди детей – до 15—20 %. ЛД является ведущей причиной госпитализации и смерти детей в Юго-Восточной Азии.

У реконвалесцентов, перенесших ЛД, типоспецифический иммунитет сохраняется в течение примерно 2 лет. Перекрестная устойчивость к инфицированию другим типом вируса непродолжительна и редко превышает 12 недель, поэтому уже через 2—3 месяца возможно повторное заболевание за счет заражения гетерологичным типом вируса. В течение жизни человек может последовательно переболеть ЛД, вызванной всеми типами вируса.

4. Методы лабораторной диагностики лихорадки денге

4.1. Для специфической диагностики ЛД используют иммунологические, молекулярно-генетические и вирусологические методы исследований.

4.2. С начала клинических проявлений и до 7 дня болезни вирус денге может быть обнаружен методом ОТ-ПЦР в сгустке крови, цельной крови, сыворотке крови, плазме, а также в аутопсийном материале (печень, легкие, лимфатические узлы, тимус, красный костный мозг). При получении положительного результата ОТ-ПЦР проводят определение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента к ДНК методом секвенирования.

4.3. Для выделения вируса денге используют новорождённых белых мышей и культуры клеток (Vero, ВНК-21), а также комариные культуры, например, С6/36. Процесс выделения и идентификации вируса денге довольно длительный и проводится в специализированных лабораториях с высоким уровнем защиты (BSL-3). Для выделения вируса используют пробы крови, сыворотки крови, плазмы, обогащенной лейкоцитами, полученные

в острый период заболевания (первые 7—10 дней болезни), суспензии органов, взятых при аутопсии.

4.4. Основным методом серодиагностики ЛД является иммуноферментный анализ (ИФА-IgM). Специфические антитела класса IgM выявляются у 50 % пациентов, начиная с 3—5-х суток после начала заболевания, а к 10-му дню уже у 99 %. Максимальные титры IgM наблюдаются через 2 недели после появления симптомов, постепенное снижение происходит в последующие 2—3 месяца. Возможна циркуляция IgM-антител в крови до полугода. Помимо ИФА-IgM антитела к вирусам денге можно выявлять в сыворотке или плазме больных непрямым методом МФА и методом иммунохроматографии (в сыворотке, плазме или цельной крови). Иммуноглобулины класса G (IgG) в низких титрах обычно обнаруживаются к концу первой недели заболевания, значительно нарастают в последующий период и, вероятно, персистируют в течение всей жизни. Для выявления сероконверсии IgG вторая проба сыворотки обследуется с интервалом в 10—14 дней. Пик IgG-антител приходится на 3—4-ю неделю заболевания, затем их концентрация снижается и остается, как правило, на определяемом уровне в течение длительного времени.

При вторичном инфицировании гетерологичным вирусом денге титры антител нарастают быстрее в основном за счет иммуноглобулинов класса G. Титр IgM во время инфекции, вызванной гетерологичным типом вируса, значительно ниже, чем при первой встрече с возбудителем. Обнаружение IgG-антител имеет значение при ретроспективной диагностике заболевания и дифференциации первичной и вторичной инфекции, вызванной вирусами денге разных типов. Количественное определение IgM и IgG к вирусу денге позволяет определить первичное или вторичное инфицирование, что особенно важно для прогноза исхода заболевания.

4.5. Белок NS1 (NS1-антиген) вируса денге детектируют методом ИФА (в сыворотке крови пациентов и в аутопсийном материале) и методом иммунохроматографии (в сыворотке, плазме, цельной крови) в течение примерно 10 дней с момента появления клинических признаков заболевания, что объясняется высокой концентрацией и продолжительной персистенцией вируса в крови, достигающей 10^6—10^8 инфекционных вирусных частиц на мл. Обнаружение NS1-антигена указывает на присутствие вируса денге в организме больного.

4.6. Другие серологические методы диагностики ЛД, такие как реакция нейтрализации (РН), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция связывания комплемента (РСК) в настоящее время используются редко. РН хотя и обладает высокой специфичностью (при ее использовании возможна идентификация серотипа вируса денге и дифференциация от других флавивирусных инфекций), однако является трудоемким неэкспрессным методом и может использоваться лишь в специализированной вирусологической лаборатории. РТГА также достаточно специфична, но, как и РСК, обладает низкой чувствительностью. РСК эффективна на поздних этапах заболевания, однако при ее использовании, как и в случае применения ИФА и МФА, возникают сложности по дифференциации ЛД от других родственных флавивирусных инфекций.

4.7. В настоящее время в Российской Федерации для серологической диагностики ЛД используются ИФА- и ПЦР-тест-системы. Перечень наборов реагентов и тест-систем для использования при лабораторной диагностике ЛД приведен в прилож. 4. Импортные наборы для выявления NS1-антигена вируса денге и антител классов IgM и IgG на основе метода иммунохроматографии могут быть скомбинированы в один тест, что удобно в использовании. Однако зарубежные тест-системы для постановки ИФА, МФА и иммунохроматографии пока не нашли применения в диагностических лабораториях России.

4.8. Для постановки точного дифференциального диагноза ЛД серологическое обследование крови больных с подозрением на эту инфекцию необходимо проводить наиболее специфичным методом ИФА-IgM в четырех тест-системах: ИФА-IgM-денге, ИФА-IgM-лихорадка Западного Нила (ЗН), ИФА-IgM-желтая лихорадка (ЖЛ), ИФА-IgM-японский энцефалит (ЯЭ). Эти заболевания имеют часто сходные ареалы распространения, этиоло-

гически связаны с родственными флавивирусами, перекрестно реагирующими в серологических реакциях. Кроме того, ЛД целесообразно дифференцировать от близкой по клинической картине лихорадки Чикунгунья, распространенной как и ЛД в Африке, Южной Азии, а в последнее время – в Южной Америке и Европе.

4.9. Лабораторное подтверждение диагноза ЛД основывается на наличии как минимум одного положительного результата на следующие тесты:

- обнаружение РНК вирусов денге методом ОТ-ПЦР;
- наличие NS1-антигена в одном образце сыворотки;
- наличие IgM в одном образце сыворотки;
- нарастание титра IgG в парных сыворотках, взятых с интервалом 2—3 недели, в четыре раза и более.

4.10. Первичное исследование материала от больного осуществляют методами ОТ-ПЦР, ИФА, иммунохимии и иммунохроматографии на базе вирусологических лабораторий, лабораторий особо опасных инфекций в субъектах Российской Федерации, а также, при необходимости, в региональных центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II—IV групп патогенности, в референс-лабораториях.

4.11. В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 17.03.2008 № 88 при выявлении положительных результатов первичного обследования пациентов с геморрагическим синдромом, в том числе случаев с летальным исходом, полученный материал отправляется на подтверждающее тестирование в один из Региональных центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I—II групп патогенности с прикрепленными субъектами Российской Федерации и Центров индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней, созданных на базе противочумных учреждений, или Национальный центр верификации диагностической деятельности, выполняющий функции Государственной коллекции – ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»*.

5. Правила забора, упаковки и транспортирования клинического (или секционного) материала, порядок проведения исследований и координация деятельности учреждений, осуществляющих диагностику заболеваний, вызванных вирусом денге

5.1. Забор, упаковку и транспортирование материала от пациентов (или умерших) с подозрением на инфекцию, вызванную вирусом денге, осуществляют в строгом соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», санитарных правил СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности» и методических указаний МУ 3.4.2552—09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

Забор, упаковку проводят в медицинских организациях. Забор материала от больных производится медицинскими работниками стационара, в который госпитализирован больной, под руководством специалиста Роспотребнадзора, подготовленного по вопросам диагностики особо опасных инфекционных болезней и биологической безопасности при работе с клиническим материалом, подозрительным на заражение возбудителями инфекционных болезней I—II групп патогенности. В случае невозможности быстрого прибытия указанных специалистов забор материала от больного осуществляют два медицинских работника, один из которых должен быть подготовлен по биологической безопасно-

* ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., тел.: (383) 336-60-10, факс (383) 336-74-09, e-mail: gost.e-ecolog.ru

сти при работе с клиническим материалом, подозрительным на заражение возбудителями инфекционных болезней I—II групп патогенности.

Секционный материал отбирают медицинские работники патолого-анатомических отделений (бюро судебно-медицинской экспертизы) в присутствии специалиста по особо опасным инфекциям. Забор материала производят в стерильные одноразовые флаконы, пробирки, контейнеры стерильными инструментами. Способы взятия, условия хранения и транспортирования клинического материала для лабораторной диагностики ЛД приведены в прилож. 1.

5.2. При подозрении на ЛД от больных для исследования берут кровь. Для серологических исследований, основанных на выявлении нарастания титра антител в парных сыворотках, образцы крови забирают в острую стадию заболевания, а затем через 2—3 недели. В случае летального исхода исследуют секционный материал (кровь из сердца, кусочки печени, селезенки, легких, лимфатических узлов, тимуса, красного костного мозга).

5.3. Оптимальные сроки детекции вируса денге и его маркеров в клиническом материале представлены в прилож. 2.

5.4. Отправку секционного материала в лабораторию рекомендуется осуществлять в транспортной таре со стабилизирующей средой (прилож. 3).

5.5. Первичное исследование материала от больного осуществляют методами ОТ-ПЦР, ИФА, НРИФ, иммунохроматографическим методом, а также выделяя вирус на чувствительной биологической модели (при наличии разрешения на проведение работ с вирусом денге). В случае получения положительного результата ОТ-ПЦР, при наличии соответствующего оснащения лаборатории, проводят определение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента к ДНК методом секвенирования. Для секвенирования фрагментов генома и генотипирования вируса денге возможно использование протокола, приведенного в прилож. 5.

5.6. Используемые на этапах первичного исследования материала от больного тест-системы и наборы реагентов должны быть разрешены к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

5.7. Результаты исследований направляют в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в управление Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации и в учреждение, направившее материал.

Список сокращений

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
НБМ	новорождённые белые мыши
ОТ-ПЦР	обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
РН	реакция нейтрализации
РНК	рибонуклеиновая кислота
РСК	реакция связывания комплемента
РТГА	реакция торможения гемагглютинации

Приложение 1

Способы взятия, условия хранения и транспортирования клинического материала для лабораторной диагностики лихорадки денге

1. Цельная кровь	
1.1. Сбор материала	Забор крови производят натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в объеме 5 мл в специальную вакуумную систему (с 6 % ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 %-й раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. **Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя**
1.2. Предобработка проб	Не требуется
1.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
1.4. Условия хранения материала	При температуре 2—8 °С – в течение 3 суток. При температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца. При температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала
1.5. Условия транспортирования материала	В специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: – при температуре 0—4 °С – не более трех суток; – при температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Температура транспортирования минус 20 °С допускается только с учетом однократного замораживания и транспортирования без размораживания не более 4 дней
2. Плазма крови	
2.1. Сбор материала	Забор крови производят натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в объеме 5 мл в специальную вакуумную систему (с 6 % ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 %-й раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. **Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя**
2.2. Предобработка проб	Пробирку с кровью центрифугируют при 1 600 g в течение 10 мин, после чего стерильно отбирают в пробирку типа Эппендорф плазму крови
2.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
2.4. Условия хранения материала	При температуре 2—8 °С – в течение 3 суток. При температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца. При температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала

Продолжение прилож. 1

2.5. Условия транспортирования материала	В специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: – при температуре 0—4 °С – не более трех суток; – при температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Температура транспортирования минус 20 °С допускается только с учетом однократного замораживания и транспортирования без размораживания не более 4 дней
3. Сыворотка крови	
3.1. Сбор материала	Забор крови проводят натощак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8—1,1 мм) в одноразовые пробирки без антикоагулянта
3.2. Предобработка проб	Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем центрифугируют при 800—1 600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной
3.3. Метод исследования	ИФА Иммунохимический анализ Иммунохроматография ОТ-ПЦР
3.4. Условия хранения материала	При температуре 2—8 °С – в течение 5 суток. При температуре минус 20 °С – в течение года. При температуре минус 70 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала
3.5. Условия транспортирования материала	В специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: – при температуре 0—4 °С – не более трех суток; – при температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Температура транспортирования минус 20 °С допускается только с учетом однократного замораживания и транспортирования без размораживания не более 4 дней
4. Аутопсийный материал	
4.1. Сбор материала	В качестве секционного материала используются печень, селезенка, легкие, лимфатические узлы, тимус, красный костный мозг. Кусочки ткани объемом не более 1 × 1 × 1 см помещают в одноразовые стерильные пробирки с закручивающимися крышками или с защелкой, содержащие физиологический раствор или транспортную среду
4.2. Предобработка проб	Кусочки органов гомогенизируют в стерильных фарфоровых ступках и готовят 10 %-ю суспензию на стерильном 0,9 %-м растворе натрия хлорида или фосфатном буфере. Суспензию переносят в микропробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 000 g в течение 30 секунд. Супернатант используют для выделения РНК и заражения культуры клеток
4.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР, выделение вируса

Продолжение прилож. 1

4.4. Условия хранения материала	При комнатной температуре – в течение 6 часов. При температуре 2—8 °С – в течение 3 суток. При температуре минус 20 °С – в течение 1 недели. При температуре минус 70 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала
4.5. Условия транспортирования материала	В специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: – при температуре 0—4 °С – не более трех суток; – при температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Температура транспортирования минус 20 °С допускается только с учетом однократного замораживания и транспортирования без размораживания не более 4 дней

Приложение 2

Оптимальные сроки детекции вируса денге и его маркеров в клиническом материале

Диагностический метод	Период детекции	Исследуемый материал
Выявление РНК вируса денге методом ОТ-ПЦР	с 1-го по 7-й день от начала клинических проявлений болезни	цельная кровь, сгусток крови, сыворотка крови, плазма, аутопсийный материал
Выявление NS1-антигена вируса денге методом: ИФА иммунохроматографии	с 1-го по 10-й день от начала клинических проявлений болезни	 сыворотка крови, аутопсийный материал сыворотка крови, плазма крови, цельная кровь
IgM к вирусу денге методом ИФА, иммунохимии и иммунохроматографии	после 3—5-го дня от начала клинических проявлений заболевания	сыворотка, плазма, цельная кровь
IgG к вирусу денге методом ИФА, иммунохимии и иммунохроматографии	после 7-го дня от начала клинических проявлений заболевания и парная проба через 10—14 дней	сыворотка, плазма, цельная кровь
NS1-антиген вируса денге методом ИФА, иммунохимии и иммунохроматографии	с 1-го по 10-й день от начала клинических проявлений заболевания	сыворотка, плазма, цельная кровь
Выделение вируса	с 1-го по 7—10-й день от начала клинических проявлений болезни	цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, обогащенная лейкоцитами, аутопсийный материал

Приложение 3

Стабилизирующие транспортные среды

1. Стабилизирующая среда для хранения и транспортирования материала для исследований методом ОТ-ПЦР

С целью предотвращения разрушения нуклеиновых кислот рекомендуется использование следующих транспортных сред в зависимости от вида исследуемого материала:

– транспортная среда № 1, содержащая: NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, NaH_2PO_4 10 мМ, K_2HPO_4 2 мМ, сыворотку крупного рогатого скота 20 %;

– транспортная среда № 2, содержащая: сахарозу 0,218 М, KH_2PO_4 0,0038 М, K_2HPO_4 0,0072 М, БСА 1 %;

– транспортная среда ESP (или эквивалент), содержащая: саркозил 1 %; ЭДТА 0,05 М; свободную от нуклеаз проназу Е 1 мг/мл;

– специальные транспортные среды, разработанные и рекомендованные производителями наборов реагентов.

При необходимости длительного хранения и перевозки в отсутствии низкотемпературных холодильников рекомендуется использовать транспортную среду ESP (или эквивалент). Исследуемый материал может храниться в среде ESP (или эквиваленте) при температуре (25 ± 5)°С в темном месте в течение 10 дней.

2. Стабилизирующая среда для хранения и транспортирования материала для вирусологических исследований

Рекомендуется использование следующей стабилизирующей среды для хранения и транспортирования материала от людей для дальнейших вирусологических исследований.

Среда готовится в стерильных условиях, автоклавирование не допускается, можно стерилизовать фильтрованием через нитроцеллюлозный стерильный фильтр в стерильную посуду.

Состав:

– среда для культур клеток № 199, содержащая 0,5 % БСА;

– пенициллин 2×10^6 ед./л, стрептомицин 200 мг/л, полимиксин В 2×10^6 ед./л, гентамицин 250 мг/л, нистатин $0,5 \times 10^6$ ед./л.

Приложение 4

Тест-системы и наборы реагентов для диагностики лихорадки денге

ИФА:

– набор для определения антител IgM к возбудителю ЛД;

– набор для определения антител IgG к возбудителю ЛД;

– наборы реагентов для выявления антигенов вируса денге и антител классов IgM, IgG к нему методом иммуноферментного анализа.

Иммунохроматография:

– тест-система иммуноферментная для дифференцированного выявления IgM- и IgG-антител к антигенам вируса;

– тест-система иммуноферментная;

– тест-система иммуноферментная для определения антигена NS1;

– тест-система иммуноферментная для определения IgG/IgM.

Непрямая реакция иммунофлуоресценции (НРИФ):

– система для выявления иммуноглобулинов M вируса денге типов 1—4 IIFT (IgM);

– система для выявления иммуноглобулинов G вируса денге типов 1—4 IIFT (IgG);

– система для выявления иммуноглобулинов G к вирусу клещевого энцефалита / вирусу Западного Нила / вирусу японского энцефалита / вирусу желтой лихорадки / вирусу денге (типы 1—4), IgG;

– система для выявления иммуноглобулинов M к вирусу клещевого энцефалита / вирусу Западного Нила / вирусу японского энцефалита / вирусу желтой лихорадки / вирусу денге (типы 1—4), IgM.

ОТ-ПЦР:

– набор реагентов для амплификации кДНК вируса денге (субтипов 1—4) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выделение РНК из исследуемого материала:

– комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала.

Обратная транскрипция:

– комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

Приложение 5

Генотипирование вируса денге

Обеззараживание материала, выделение нуклеиновых кислот, проведение обратной транскрипции и амплификации, секвенирование продуктов амплификации осуществляют в соответствии с нормативными правовыми актами и методическими документами, регламентирующими требования к безопасности работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности) при использовании молекулярно-генетических методов исследования.

Выделение РНК вируса денге осуществляется из 100 мкл исследуемого образца. Обратная транскрипция проводится со статистической смесью гексануклеотидов (статзатравкой) в течение 1 часа при температуре 37 °С. В случае использования коммерческих наборов реагентов для проведения реакции обратной транскрипции руководствуются инструкцией производителя.

Амплификацию фрагментов для секвенирования проводят с праймерами (таблица), специфичными для консервативного участка нетранслируемого региона 5'-UTR и гена *capsid protein C*.

Последовательности праймеров

Вирус денге	Праймеры	Структура олигонуклеотидной последовательности	Температура отжига, °С	Размер ампликона
Субтип 1—4	F1	AGTTGTTAGTCTRYGTGGACCG	51	
Субтип 1	R398	AGCATRAGRAGCATGGTCAC	51	417
Субтип 2	R458	GATCATGTGTGGTTCTCCRTT	51	478
Субтип 3	R459	AATCATGCGCGGCTCTC	51	475
Субтип 4	R345	CCTATCTCCTTCCTGAATCCA	51	365

После обеззараживания исследуемого материала, выделения РНК и реакции обратной транскрипции проводят ПЦР в реакционной смеси следующего состава (на 1 исследование):

кДНК 5 мкл
10×Taq буфер без Mg^{2+} 3 мкл
100 mM раствор $MgCl_2$ 1 мкл
5 mM раствор dNTP 1 мкл
Смесь праймеров 5 мкл
(концентрация каждого 10 μM/L, конечная концентрация 0,3 μM/L)
SmartTaq ДНК-полимераза 0,3 мкл
Вода для ПЦР до конечного объема 30 мкл

ПЦР проводят, используя программу амплификации, представленную в таблице:

Температурные и временные режимы при проведении ПЦР

Температура, °С	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	05:00	1
95	00:15	40
50	00:20	
72	00:40	
72	02:00	1
4	хранение	

ПЦР-продукты разделяют в 2 %-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Фрагменты необходимой длины вырезают и выделяют из агарозного геля, используя наборы для выделения двухцепочечных молекул ДНК из продуктов ПЦР и агарозных гелей методом фильтрации на мембране.

Секвенирование ПЦР-продуктов проводят с помощью наборов реагентов в соответствии с протоколами производителей, используя прямые и обратные праймеры. Последующий анализ продуктов реакции проводят в автоматическом секвенаторе, использующем капиллярный электрофорез.

Анализ прочитанных нуклеотидных последовательностей проводят сравнением с известными нуклеотидными последовательностями генотипов вируса денге, депонированными в международной базе данных NCBI/BLAST (gost.e-ecolog.ru).

Методические рекомендации разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова, Ю. В. Демина, Н. В. Шеенков); ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (В. А. Терновой, О. В. Пьянков, И. В. Плясунова, А. П. Агафонов, В. Н. Михеев); ФКУЗ «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Т. Ю. Красовская, С. А. Щербакова, И. Н. Шарова, В. В. Кутырев); ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, подразделение «Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского (А. М. Бутенко, В. Ф. Ларичев); ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» ДЗМ г. Москвы (Н. А. Малышев, М. А. Сайфуллин).

gost.e-ecolog.ru