Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)

Методические указания
МУК 4.2.2410—08

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)

Методические указания
МУК 4.2.2410—08

ББК 51.9
О64

О64 **Организация** и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП): Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—36 с.

ISBN 978—5—7508—0866—3

1. Разработаны ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (О. Е. Иванова, Т. П. Еремеева, С. Г. Дроздов, М. И. Михайлов, О. Ю. Байкова, О. В. Юрашко); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Ф. Лазикова, Е. Б. Ежлова); ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Т. В. Воронцова, А. А. Ясинский, О. П. Чернявская) с учетом замечаний и предложений ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Москве, Ставропольском, Хабаровском краях, Омской, Свердловской областях; Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 июля 2008 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 28 июля 2008 г.

4. Введены в действие с 1 сентября 2008 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Л. С. Кучурова, Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 01.12.09

Формат 60x88/16 **Печ. л.** 2,25

Тираж 500 экз. Заказ 89

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5,7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения 5
3. Организация вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы 5
4. Правила сбора, маркировки, хранения и транспортирования материалов для исследования 7
4.1. Клинические материалы 7
4.2. Изоляты полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов 8
4.3. Маркировка материалов 9
4.4. Упаковка и транспортирование материалов для исследования 9
5. Порядок проведения вирусологических исследований 10
5.1. Получение и подготовка проб для исследования 10
5.1.1. Получение и регистрация проб 10
5.1.2. Подготовка фекальных проб для исследования в культуре клеток 11
5.1.3. Приготовление проб, отобранных с помощью ректального тампона 11
5.1.4. Приготовление секционных проб 12
5.2. Выделение и идентификация вирусов 12
5.2.1. Клеточные линии, рекомендуемые для выделения полиовирусов. Основные принципы работы 12
5.2.2. Выделение полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов 13
5.2.3. Идентификация выделенных полиовирусов 15
5.2.4. Идентификация выделенных других (неполио) энтеровирусов 16
5.3. Внутритиповая дифференциация полиовирусов 16
5.4. Сроки хранения материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом ОВП, а также от лиц, общавшихся с ними 17
5.5. Выявление и титрование нейтрализующих антител к полиовирусу 17
6. Обеспечение биологической безопасности при проведении вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича 18
Приложение 1. Нормативные ссылки 21
Приложение 2. Определение приоритетного («горячего») случая острого вялого паралича 24
Приложение 3. Приготовление сред и растворов 25
Приложение 4. Направление на лабораторное исследование 26
Приложение 5. Приготовление и титрование референс-штаммов (вакцинных штаммов Сэбина) вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3 28
Приложение 6. Проведение реакции нейтрализации для определения титра нейтрализующих антител к полиовирусу 31
Приложение 7. Список лабораторий Российской Федерации, осуществляющих вирусологические исследования материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича 35

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
28 июля 2008 г.
Дата введения: 1 сентября 2008 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)

Методические указания
МУК 4.2.2410—08

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (далее – Роспотребнадзор), осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за полиомиелитом, острыми вялыми параличами в рамках Национального плана действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации, а также могут быть использованы специалистами организаций здравоохранения, сотрудниками научно-исследовательских институтов и других заинтересованных организаций.

1.2. В методических указаниях определены требования к порядку сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП) в целях установления этиологических агентов заболеваний, а также изучения циркуляции полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов среди населения.

2. Общие положения

2.1. Вирусологические исследования материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (далее – ПОЛИО/ОВП) на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы (далее – НПЭВ) являются одним из важнейших элементов системы эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП, энтеровирусными инфекциями.

2.2. Все процедуры по сбору, транспортированию, подготовке к вирусологическому исследованию материалов от больных ПОЛИО/ОВП осуществляются в соответствии с требованиями нормативных и методических документов (прилож. 1).

2.3. Выполнение требований настоящих методических указаний направлено на совершенствование эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП, энтеровирусными инфекциями.

3. Организация вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича на полиовирусы, другие (неполио) энтеровирусы

3.1. Забор материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом ОВП проводят в лечебно-профилактических организациях (далее – ЛПО) в установленном порядке в соответствии с нормативными и методическими документами.

3.2. Вирусологические исследования материалов от больных ПОЛИО/ОВП осуществляют: Национальный центр по лабораторной диагностике полиомиелита в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН (далее – НЦ), вирусологические лаборатории региональных центров эпидемиологического надзора за полиомиелитом и ОВП в г. Москве, Хабаровском, Ставропольском краях, Свердловской, Омской областях, Санкт-Петербургском НИИЭМ им. Пастера (далее – РЦ).

3.3. Вирусологическому исследованию в РЦ подлежат материалы:

- пробы фекалий от больных детей в возрасте до 15 лет с явлениями ОВП (две пробы);
- пробы фекалий от детей в возрасте до 5 лет, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП, в случае позднего (после 14 дня с момента выявления паралича), неполного (1 проба стула) обследования больного (по одной пробе, не более 5 детей);

• пробы фекалий лиц, прибывших из эндемичных (неблагополучных) по полиомиелиту стран/территорий, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП (по одной пробе, не более 5 контактных);

• парные сыворотки крови больных с подозрением на полиомиелит или больных, отнесенных к приоритетным «горячим» случаям ОВП (прилож. 2). Сыворотки могут быть доставлены и исследованы в НЦ (по согласованию).

3.4. Вирусологическому исследованию в НЦ подлежат материалы:

• пробы фекалий от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание независимо от возраста (две пробы);

• пробы фекалий от больных детей, отнесенных к приоритетным («горячим») случаям ОВП (две пробы);

• пробы фекалий от детей в возрасте до 5 лет, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП, отнесённым к приоритетному («горячему») случаю (одна проба);

• пробы фекалий лиц, прибывших из эндемичных (неблагополучных) по полиомиелиту стран/территорий, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП, отнесённым к «горячему» случаю (по одной пробе, не более 5 контактных);

• пробы фекалий от больных вакциноассоциированым полиомиелитом, собранные повторно на 60-й и 90-й день от начала заболевания (по две пробы). В случае получения положительного вирусологического результата проводят повторный отбор проб для последующего исследования (по согласованию с НЦ);

• материалы от больных детей в возрасте до 15 лет с явлениями ОВП, исследованные в РЦ, из которых выделены полиовирусы, НПЭВ (пробы фекалий и изоляты);

• материалы от детей в возрасте до 5 лет, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП, в случае позднего, неполного обследования больного, исследованные в РЦ, из которых выделены полиовирусы, НПЭВ (пробы фекалий и изоляты);

• материалы от лиц, прибывших из эндемичных (неблагополучных) по полиомиелиту стран/территорий, общавшихся с больным ПОЛИО/ОВП, исследованные в РЦ, из которых выделены полиовирусы, НПЭВ (пробы фекалий и изоляты);

3.5. Результаты вирусологических исследований, идентификации и внутритиповой дифференциации сообщаются в организации здравоохранения, органы и учреждения Роспотребнадзора, направившие мате-

риалы, а также в установленном порядке в НЦ, РЦ, Координационный центр ликвидации полиомиелита Роспотребнадзора.

4. Правила сбора, маркировки, хранения и транспортирования материалов для исследования

4.1. Клинические материалы

4.1.1. Отбор клинического материала и его упаковку осуществляет медицинский работник ЛПО в установленном порядке.

4.1.2. От больного ПОЛИО/ОВП берут две пробы фекалий в максимально ранние сроки от момента возникновения ОВП (до 7-го, но не позднее 14-го дня). Первую пробу фекалий отбирают в день установления клинического диагноза, вторую через 24—48 ч после взятия первой пробы. Оптимальный размер фекальной пробы 8—10 г, что соответствует величине двух ногтей большого пальца взрослого человека. Сбор проб производят в специальные пластиковые ёмкости с завинчивающейся крышкой для забора фекальных проб.

4.1.3. В тех случаях, когда получить фекалии от больного невозможно, можно получить фекальную пробу с помощью ректальной «соломинки» или ректального тампона. Ректальную «соломинку» (натуральную или пластиковую, твёрдую, с внутренним диаметром 5 мм) осторожно вводят в прямую кишку и медленными движениями набирают достаточное количество фекальной массы. После выведения из прямой кишки соломинку сгибают или переламывают и помещают в стерильный флакон/пробирку. При использовании ректального тампона стерильный ватный тампон на деревянной палочке вводят в прямую кишку и протирают слизистую оболочку так, чтобы захватить фекальный материал. Тампон извлекают и, отломив палочку, помещают в стерильную пробирку/флакон с 1—2 мл транспортировочной среды (прилож. 3).

4.1.4. В летальных случаях берут пробы (кусочки ткани) из шейного и поясничного отделов спинного мозга, продолговатого мозга, Варолиева моста, нисходящего отдела толстой кишки. Пробы отбирают как можно раньше после наступления смерти. Ткани иссекают стерильными инструментами, помещают в отдельные стерильные пластиковые или стеклянные ёмкости с транспортировочной средой, добавленной в таком количестве, чтобы сохранить их влажными. Объём каждой пробы (кусочка тканей ЦНС) должен составлять примерно 1 $см^3$; из толстой кишки иссекают сегмент длиной 3—5 см, содержащий фекальные массы.

4.1.5. Для диагностических серологических исследований у больных ПОЛИО/ОВП отбирают две пробы крови. Первая должна быть взя-

та в первые семь дней от начала заболевания, вторая – спустя 2—3 нед. Оптимальный объём пробы – 3—5 мл. Если взятие крови из вены по каким-либо причинам невозможно, берут кровь уколом пальца, что позволяет взять 0,3—0,4 мл крови. Пробы крови помещают в стерильные ёмкости (пробирки, флакончики) без антикоагулянтов или консервантов. Пробы оставляют при комнатной температуре на 2 ч для свёртывания крови. После образования сгустка его отделяют от стенки сосуда, пробу помещают в холодильник при температуре от 2 до 8 °С и спустя 24 ч отбирают сыворотку. Центрифугированием при 1 500 g в течение 5—10 мин сыворотку осветляют, переносят стерильной пипеткой в стерильную ёмкость. Если нельзя воспользоваться центрифугой или обработке подлежит сразу большое количество проб, с помощью стерильной пипетки можно осторожно отсосать сыворотку от сгустка так, чтобы в неё не попали выпавшие в осадок эритроциты. Во всех случаях следует предотвращать попадание в сыворотку эритроцитов, т. к. при хранении они подвергаются гемолизу, что может повлиять на результаты серологических исследований.

4.1.6. Пробы фекалий должны быть доставлены в РЦ или в НЦ в течение 72 ч с момента отбора. До отправки их хранят в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С. Транспортирование проб осуществляют при температуре от 2 до 8 °С (обратная «холодовая» цепь). Если доставка проб по какой-либо причине задерживается, пробы хранят при температуре –20 °С. Условия транспортирования должны обеспечивать их сохранение.

4.1.7. Пробы крови (сыворотки) доставляют в лабораторию в течение 72 ч от момента отбора. До отправки пробы хранят при температуре от 2 до 8 °С. Эту же температуру обеспечивают при транспортировании проб. Если доставка по какой-либо причине задерживается, сыворотки хранят при температуре –20 °С. Условия транспортирования должны обеспечивать их сохранение.

4.2. Изоляты полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов

Изоляты полиовирусов, НПЭВ, выделенные в РЦ из материалов от больных ПОЛИО/ОВП, должны быть отправлены для подтверждения и внутритиповой дифференциации (далее – ВТД) в НЦ в течение 7 дней от момента идентификации вируса в РЦ. Для доставки изолятов используют пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками с наружной резьбой объёмом 2,0 мл. Вместе с изолятами доставляются образцы фекалий, из которых они были выделены. До отправки изоляты хранят при

температуре –20 °С. Транспортирование проб осуществляют в условиях «холодовой цепи», обеспечивающих их сохранение.

4.3. Маркировка материалов

Все материалы должны быть снабжены этикеткой, на которой четко обозначают фамилию и инициалы больного, идентификационный номер, тип пробы, дату отбора. Пробы доставляются с направлением (в 2 экз.) на лабораторное исследование (прилож. 4).

4.4. Упаковка и транспортирование материалов для исследования

При транспортировании материалов в лабораторию необходимо соблюдать принцип «тройной упаковки», которая включает следующие компоненты:

1) первичная ёмкость – маркированный контейнер/пробирка/флакон с пробой, надёжно закрытые крышкой, герметизированной лабораторной плёнкой или парафином;

2) вторичная ёмкость – прочный водонепроницаемый, непротекающий контейнер (или полиэтиленовый пакет) с адсорбирующим материалом в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его протечки. Во вторичную ёмкость помещают контейнер/пробирку/флакон с пробой. Образцы от одного пациента упаковываются отдельно. Также во вторичную ёмкость помещают направление на исследование, вложенное в полиэтиленовый пакет;

3) внешняя упаковка – прочный термоизолирующий контейнер или термос, предназначенные для транспортирования биологических материалов. Для обеспечения температурных условий транспортирования, в термоконтейнеры помещают охлаждающие элементы или пакеты со льдом. На внешней поверхности термоконтейнера или термоса укрепляют этикетку с указанием адреса, телефона, факса, электронной почты отправителя, адреса, телефона, факса, электронной почты получателя, условий транспортирования.

Перед отправкой материалов отправитель должен проинформировать получателя о планируемой отправке и её сроках. Недопустимо отправлять материалы без предварительной договорённости с получателем.

Транспортирование проб осуществляется в соответствии с требованиями нормативных и методических документов. Упаковка и материалы, которые использовались для транспортирования, могут быть контаминированы инфекционными агентами, поэтому первичная и вторичная упаковки должны быть уничтожены.

Органы и учреждения Роспотребнадзора обеспечивают выполнение всех необходимых требований по доставке проб в установленном порядке.

5. Порядок проведения вирусологических исследований

5.1. Получение и подготовка проб для исследования

5.1.1. Получение и регистрация проб

Немедленно после доставки материалов в лабораторию упаковочную коробку/термоконтейнер/термос распаковывают в отведённой для этого зоне, соблюдая при этом требования нормативных и методических документов.

В зоне, где происходит распаковка, должны иметься ёмкость для мусора, тампоны, смоченные 70 %-м раствором этилового спирта, биологическое защитное укрытие (далее – БЗУ) 2-го класса безопасности (или рабочий стол с покрытием, которое легко подвергается обработке лабораторными дезинфектантами). Распаковка и регистрация материалов осуществляется двумя сотрудниками – один регистрирует поступившие материалы в рабочем журнале, другой открывает упаковку, проверяет целость ёмкостей с материалом, отсутствие протечек, полноту сопроводительных документов. В этот момент фиксируется состояние присланных проб («хорошее» или «плохое»).

Проверяют соответствие сведений на этикетке присланной пробы и в направлении на исследование. В случае несовпадения или неполноты сведений, делают запрос в организацию, направившую материал для исследования. Каждой пробе присваивают идентификационный номер, под которым она регистрируется в лабораторном журнале. Этим номером помечают направление на исследование, а также все ёмкости (центрифужные пробирки, флаконы/пробирки с культурой клеток и пр.), относящиеся к данной пробе в процессе её исследования и хранения в данной лаборатории. Если исследование будет начато в течение 48 ч. пробы для выделения вируса помещают в холодильник (от 2 до 8 °С), если исследование будет начато позже, пробы хранят при температуре –20 °С.

Все процедуры во время получения, распаковки и регистрации материалов осуществляют в защитной одежде и резиновых перчатках. Все работы по подготовке проб фекалий, фекальных суспензий, секционных материалов для исследования проводятся в БЗУ 2-го класса безопасности.

Лаборатория может получать много проб из разных источников в течение рабочего дня, поэтому следует проявлять особую тщательность и осторожность при обращении с пробами не только для защиты персонала, но и для избежания перекрёстной контаминации между пробами.

5.1.2. Подготовка фекальных проб для исследования в культуре клеток

До приготовления фекальной суспензии присланную в лабораторию «исходную» пробу делят пополам, одну часть используют для приготовления суспензии, другую хранят при –20 °С (для отправки в НЦ, для повторного исследования пробы в случае необходимости).

Для исследования в культуре клеток фекальные пробы обрабатывают хлороформом для удаления бактерий, грибков, цитотоксических липидов, для разъединения вирусных аггрегатов.

Для приготовления 20 % фекальной суспензии устойчивые к хлороформу полиэтиленовые центрифужные пробирки ёмкостью 50 мл маркируют в соответствии с номером пробы. В каждую пробирку вносят 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) с антибиотиками (прилож. 3), 1 г стеклянных бусин и 1 мл хлороформа. В пробирку вносят 2 г фекальной пробы. Плотно закрывают центрифужную пробирку и тщательно встряхивают в течение 20 мин в механическом шейкере или вручную. Центрифугируют 20 мин при 1 500 g в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость каждой пробы переносят в два маркированных флакона с винтовой крышкой. Если жидкость непрозрачна, обработку хлороформом повторяют. Суспензию из одного флакона используют для исследования, второй флакон хранят при –20 °С для отправки в НЦ, если это будет необходимо.

Пробы, отобранные с помощью ректальных «соломинок», готовят для исследования так же, как и фекальные пробы.

5.1.3. Приготовление проб, отобранных с помощью ректального тампона

Ёмкость, содержащую ректальный тампон в транспортировочной среде, тщательно встряхивают в механическом шейкере или вручную для того, чтобы фекальный материал перешёл в жидкость. Стерильным пинцетом плотно прижимают тампон к стенке ёмкости, отжимают жидкость, которую переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 мин при 1 500 g в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жид-

кость осторожно переносят в два маркированных флакона и хранят при –20 °С.

5.1.4. Приготовление секционных проб

Из тканей ЦНС (головной мозг, продолговатый мозг, спинной мозг), помещённых в транспортировочную среду, готовят 10 % суспензию в ФСБ с антибиотиками. Гомогенизируют в измельчителе, переносят жидкость в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 мин при 1 500 g в центрифуге с охлаждением. Надосадочную жидкость осторожно переносят в два маркированных флакона и хранят при –20 °С.

Участок толстой кишки вместе с содержимым используют для приготовления 20 % суспензии и обрабатывают так же, как пробы фекалий.

5.2. Выделение и идентификация вирусов

5.2.1. Клеточные линии, рекомендуемые для выделения полиовирусов. Основные принципы работы

Для выделения полиовирусов из проб используют перевиваемые линии культур клеток RD и L20B.

Клетки рабдомиосаркомы человека – RD, чувствительны к полиовирусам, вирусам группы ECHO, некоторым вирусам группы Коксаки А (за исключением А1, А19, А22), энтеровирусам 68—71. Иногда вирусы группы Коксаки В проявляют цитопатический эффект (далее – ЦПЭ) на клетках RD. L20B – линия мышиных клеток (L-клеток), способная экспрессировать рецептор полиовируса. Клетки L20B избирательно чувствительны к полиовирусам, которые вызывают в них характерный ЦПЭ. Ряд вирусов – аденовирусы, реовирусы, некоторые НПЭВ (Коксаки А 2—6, 8, 10, 14) могут вызывать ЦПЭ в этих клетках, однако он значительно отличается от вызываемого полиовирусом. Использование комбинации этих двух клеточных линий обеспечивает высокую чувствительность и специфичность выявления полиовируса. Использование культуры клеток HEp-2 (Cincinnati), чувствительной к полиовирусам и вирусам группы Коксаки В, не является обязательным. Однако исключение их из работы может привести к потере НПЭВ, в частности Коксаки В.

Культуры клеток должны быть получены по запросу из официальных источников (для НЦ – из лабораторий глобальной лабораторной сети по полиомиелиту ВОЗ, для РЦ – из НЦ). После получения клеток лаборатория создаёт банк клеток. Запас каждой линии культуры клеток должен составлять не менее 12 ампул, которые используются по мере необходимости для создания «рабочей» линии клеток. Для сохранения

чистоты, аутентичности и стабильности клеточных культур следует заменять «рабочую» линию после 3-х мес. или 15 пассажей культивирования в лаборатории. Все манипуляции с культурами клеток фиксируют в рабочем журнале, обозначая тип клеток, номер пассажа, дату посева и все смены среды.

Все работы с неинфицированными культурами клеток проводятся в отдельном боксированном помещении, расположенном в «неинфекционной зоне» лаборатории, в БЗУ 2-го класса безопасности. Для избежания перекрёстной контаминации между различными типами клеточных культур никогда не работают одновременно с несколькими культурами клеток. Все неинокулированные культуры клеток следует считать потенциально опасными, поэтому после окончания работы все культуральные жидкости и культуры обеззараживают автоклавированием.

При работе с культурами клеток, создании клеточных банков следует руководствоваться приёмами в соответствии с «Руководством по лабораторным исследованиям полиомиелита» (4-е изд., ВОЗ, 2005).

Для контроля чувствительности клеток к полиовирусам проводят ежеквартальное титрование вакцинных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3 (референс-штаммы) на каждой из культур клеток после 8—10 пассажей (прилож. 5, рис. 1). Если титр референс-штаммов не отличается от установленного ранее или отличается в пределах ± 0,5 lg, можно считать, что чувствительность клеток не понизилась. Превышение ожидаемого значения на 0,5 lg или более может быть связано с погрешностями в приготовлении разведений вируса. Снижение титра по сравнению с ожидаемым на 0,5 lg или более может указывать на снижение чувствительности клеток. В этом случае выполняют титрование новой порции референс-штамма. Одновременно проверяют возможные изменения в условиях культивирования клеток. Если низкий титр воспроизводится при титровании новой порции, а изменений в условиях культивирования клеток не выявлено, используемые клетки необходимо заменить на клетки из клеточного банка лаборатории (или получить по запросу в НЦ или РЦ).

5.2.2. Выделение полиовирусов, других (неполио) энтеровирусов

Микроскопируют культуры с недавно сформированным монослоем клеток RD и L20B, выращенные на поверхности пластиковых флаконов площадью 25 $см^2$ или пробирок (нормальный монослой формируется в течение 2—3 дней после посева клеток). Ростовую среду, содержащую

сыворотку, заменяют поддерживающей средой (8,0—10,0 мл на флакон, 1,0—1,5 мл на пробирку). Флаконы/пробирки маркируют, указывая номер пробы, дату инокуляции, номер пассажа. Для исследований одной пробы используют по 1 флакону каждой культуры или по 2 пробирки на один пассаж. По 1 флакону/пробирке с каждым типом клеток оставляют незаражёнными в качестве отрицательного контроля.

Флаконы/пробирки с клетками обеих линий инокулируют одновременно, внося заражающий материал из расчёта 0,4—0,6 мл во флакон или 0,2 мл в пробирку. Культуры инкубируют при 36 °С, ежедневно микроскопируют, наблюдая за появлением ЦПЭ.

Результаты наблюдений за инокулированными и контрольными культурами регистрируют в рабочем журнале: развитие ЦПЭ, охватывающего 25 % монослоя, обозначают как 1+, 25—50 % – 2+, 50—75 % – 3+, 75—100 % – 4+. Быстрая дегенерация клеток в течение одного-двух дней после инокуляции может быть вызвана неспецифической токсичностью пробы. Культуры, проявившие признаки неспецифической дегенерации, замораживают при –20 °С, оттаивают и пассируют на клетках того же типа. Если признаки токсичности проявляются снова, возвращаются к исходному экстракту пробы, разводят его 1 : 10 в ФСБ и повторяют процесс инокуляции как описано выше. В случае бактериальной контаминации среды, возвращаются к исходному экстракту пробы, вновь обрабатывают его хлороформом, повторяют процедуры инокуляции.

После появления характерного для энтеровирусов ЦПЭ, оцененного как 4+, прекращают инкубацию, культуру замораживают при –20 °С для последующего пассажа. При появлении ЦПЭ 4+ материал второго пассажа используют для идентификации вируса и проведения ВТД.

Если в первом пассаже ЦПЭ в течение 7 дней не проявился, проводят «слепой» пассаж и наблюдают культуры в течение 7 дней. Общий срок наблюдения за культурами с отрицательным результатом должен составлять не менее 14 дней, после чего их уничтожают, а результат исследования образца расценивается как «отрицательный».

При наличии ЦПЭ на клетках RD, но отсутствии на клетках L20B после 14 дней наблюдения, проводят пассирование культурального материала, полученного на уровне 2-го пассажа на клетках RD, культуре L20B.

Некоторые пробы фекалий содержат вирусы, вызывающие ЦПЭ в клетках L20B, но не относящиеся к энтеровирусам (например, отдельные рео- и аденовирусы). Во многих случаях вызываемый ими ЦПЭ чёт-

ко отличается от ЦПЭ, свойственного энтеровирусам. Присутствие такого агента в пробе регистрируется. Следует предпринять попытку идентифицировать агент, чтобы исключить присутствие полиовируса. При получении неопределённых или трудно интерпретируемых результатов выделенный агент следует отправить в НЦ.

5.2.3. Идентификация выделенных полиовирусов

Идентификацию выделенных штаммов полиовирусов проводят в реакции нейтрализации инфекционности на культуре клеток микрометодом. В основе реакции нейтрализации лежит взаимодействие исследуемого вируса с гомологичной антисывороткой (или смесью антисывороток), которая нейтрализует вирус, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток. В опыте по нейтрализации вирусную суспензию, содержащую 100 $ТЦД_{50}$, смешивают в равном объёме с диагностическими сыворотками в лунках планшета для микронейтрализации, инкубируют 1 ч при 36 °С, добавляют суспензию клеток, помещают в термостат, проводят ежедневное микроскопирование до получения окончательного результата идентификации (как правило, в течение 5 сут.).

Для идентификации используют сыворотки к полиовирусам типа 1, 2 и 3, которые распространяются ВОЗ для лабораторий, включённых в глобальную лабораторную сеть по диагностике полиомиелита. Могут быть использованы сыворотки к полиовирусам типа 1, 2 и 3, зарегистрированные и разрешённые в Российской Федерации к применению в установленном порядке. Подготовку рабочих разведений сывороток/смесей сывороток проводят в соответствии с инструкциями производителя.

Проведение теста микронейтрализации, интерпретацию результатов выполняют в соответствии с «Руководством по лабораторным исследованиям полиомиелита» (4-е изд., ВОЗ, 2005).

Типирование выделенного вируса проводят на той культуре, на которой он выделен. Если вирус выделен и на клетках RD, и на клетках L20B, проводят идентификацию на обеих культурах, при этом в первую очередь исследуют штамм, выделенный на L20B, для быстрого получения наиболее важного результата.

Выделенные штаммы полиовирусов (и исходные образцы фекалий, из которых они были выделены) в течение 7 дней после идентификации направляют в НЦ для проведения ВТД. Если при проведении идентификации на разных культурах клеток были получены одинаковые результаты, то в НЦ отправляют изолят, выделенный на какой-то одной куль-

туре (предпочтение отдаётся культуре RD). При выявлении смеси полиовирусов в НЦ отправляют неразделённую смесь или разделённые штаммы для подтверждения результатов и ВТД.

5.2.4. Идентификация выделенных других (неполио) энтеровирусов

Идентификацию выделенных штаммов НПЭВ проводят в реакции нейтрализации инфекционности на культуре клеток микрометодом.

Используют смеси иммунных к энтеровирусам сывороток, которые распространяются ВОЗ для лабораторий, включённых в Глобальную лабораторную сеть по диагностике полиомиелита, позволяющие определить принадлежность выделенного вируса к полиовирусу, группе вирусов Коксаки В1-6, идентифицировать 20 серотипов вирусов ECHO и вирус Коксаки А9. Могут быть использованы антисыворотки к НПЭВ, зарегистрированные и разрешённые в Российской Федерации к применению в установленном порядке. Подготовку рабочих разведений сывороток/смесей сывороток проводят в соответствии с инструкциями производителя.

Проведение теста микронейтрализации, интерпретацию результатов выполняют в соответствии с «Руководством по лабораторным исследованиям полиомиелита» (4-е изд., ВОЗ, 2005).

Типирование выделенного вируса проводят на той культуре, на которой он выделен.

Выделенные штаммы НПЭВ и исходные образцы фекалий, из которых они были выделены, в течение 7 дней после идентификации направляют в НЦ для проведения подтверждающих исследований. При выявлении смеси полиовируса и НПЭВ в НЦ отправляют неразделённую смесь или разделённые штаммы для подтверждения результатов и ВТД полиовируса.

5.3. Внутритиповая дифференциация полиовирусов

ВТД полиовирусов выполняет НЦ, используя для этого два метода, рекомендованные и поддерживаемые реагентами ВОЗ:

1) метод иммуноферментного анализа с использованием перекрёстно адсорбированных антисывороток;

2) *метод диагностической ПЦР.*

ВТД должна быть проведена в течение 14 дней от момента получения из РЦ или выделения и идентификации штамма в НЦ. Каждый штамм должен быть исследован двумя методами ВТД.

Проведение и интерпретация результатов тестов выполняется в соответствии с «Руководством по лабораторным исследованиям полиомиелита» (4-е изд., ВОЗ, 2005). В случае получения противоречивых результатов двух методов ВТД, указывающих на принадлежность штамма полиовируса к дикому, вакцинородственному, присутствие в пробе смеси дикого и вакцинного вируса одного типа, НЦ в течение 7 дней от момента получения результатов должен начать проведение частичного секвенирования участка генома VP1 этого штамма полиовируса.

5.4. Сроки хранения материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом ОВП, а также от лиц, общавшихся с ними

Все образцы фекалий от больных ПОЛИО/ОВП, а также от лиц общавшихся с ними, хранят при температуре –20 °С в течение 12 мес. от момента поступления в лабораторию.

Экстракты образцов фекалий хранят при температуре –20 °С в течение 3 мес. от момента подтверждения результата исследования в НЦ.

Изоляты полиовирусов/НПЭВ хранят при температуре –20 °С в течение 3 мес. от момента подтверждения результата исследования в НЦ и получения результатов ВТД.

После истечения срока хранения материалы уничтожаются автоклавированием в установленном порядке.

5.5. Выявление и титрование нейтрализующих антител к полиовирусу

Выявление специфических антител к полиовирусу в сыворотках больных ПОЛИО/ОВП проводят с диагностическими целями в реакции нейтрализации инфекционности микрометодом. Порядок отбора, хранения, направления для исследования парных сывороток изложен в п.п. 3 и 4 настоящих МУК.

В основе определения титров антител с помощью реакции нейтрализации лежит принцип взаимодействия известного вируса с гомологичными антителами, присутствующими в сыворотке, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток.

Для реакции нейтрализации с целью выявления антител к полиовирусу используют клетки HEp-2 (Cincinnati).

В качестве известного вируса с известным титром используют только вакцинные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3

(референс-штаммы). Предварительно готовят рабочие запасы референс-штаммов, используя для пассажа штаммы, полученные в НЦ (выполняют не более 3-х последовательных пассажей на культуре клеток НЕр-2 при температуре 36 °С). Рабочие запасы референс-штаммов разливают на аликвоты, достаточные для проведения одного опыта, в пластиковые флаконы с завинчивающейся крышкой, тщательно маркируют и хранят при температуре от –20 до –70 °С. До постановки опыта нейтрализации определяют титр референс-штаммов (прилож. 5), исходя из которого рассчитывают рабочее разведение вируса каждого типа так, чтобы в 50 мкл вируссодержащей жидкости содержалось 100 $ТЦД_{50}$ (допускаются колебания в интервале 50—200 $ТЦД_{50}$).

В каждый опыт включают контрольное титрование лабораторной референс-сыворотки, т. е. сыворотки с известным уровнем нейтрализующей активности. Такая сыворотка обычно представляет собой смесь сывороток взрослых людей, недавно иммунизированных бустер-дозой оральной полиовирусной вакцины. Сыворотку разливают на аликвоты, которые хранят при температуре –20 °С.

Работают с сыворотками в резиновых перчатках в БЗУ 2-го класса безопасности.

Проведение реакции нейтрализации для выявления антител к полиовирусу изложено в прилож. 6, рис. 2.

6. Обеспечение биологической безопасности при проведении вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича

В постсертификационный период, во избежание попадания дикого полиовируса в человеческую популяцию из лаборатории, для предупреждения внутрилабораторной контаминации необходимо обеспечить биологическую безопасность работы и хранения полиовируса и потенциально инфицированных им материалов. Для этого все работы должны выполняться в соответствии с требованиями нормативных и методических документов. Лаборатории, которые проводят исследования материалов от больных ПОЛИО/ОВП, должны иметь разрешение на работу с микроорганизмами III—IV групп патогенности. При работе выполняются требования качественной микробиологической техники («Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита», 4-е изд. ВОЗ, 2005).

1) Доступ посторонних лиц в лабораторию ограничен. К работе допускаются только сотрудники полностью иммунизированные против полиомиелита.

2) Работа в лаборатории проводится в лабораторной защитной одежде и лабораторной обуви с закрытыми носками.

3) Все перечисленные работы проводятся с полным соблюдением мер безопасности: регистрация проб, обработка проб, работа с пипетками, отделение сыворотки крови от сгустка, использование центрифуг, гомогенизаторов, встряхивателей, ультразвуковых и механических измельчителей ткани, холодильников, хранение инфекционных материалов, вскрытие ампул с инфекционным материалом, пересылка и транспортирование клинических проб и проб с инфекционным материалом.

4) В лаборатории запрещается приём пищи и питья, курение. В лабораторных помещениях и в каких-либо хранилищах, где могут находиться инфекционные материалы, запрещается хранение пищи и питья.

5) Первичная обработка материала, заражение культур клеток, работы, связанные с использованием выделенных штаммов вирусов, серологические исследования проводят в резиновых перчатках в БЗУ 2-го класса безопасности.

6) В каждом вирусологическом боксе должны быть инструкции по проведению каждого вида работ. Все приборы – центрифуги, БЗУ 2-го класса защиты и пр., должны иметь инструкции по работе с ними.

7) Контейнеры из-под первичного материала, использованная одноразовая посуда, наконечники микропипеток, микротитровальные планшеты, пипетки и пр. во время проведения работ собирают в пластиковые пакеты, предназначенные для автоклавирования. После окончания работ – обеззараживают автоклавированием. Стеклянную посуду помещают в 6 %-й раствор перекиси водорода.

8) Обеззараживание рабочих поверхностей, оборудования проводят дезинфицирующими средствами с вирулицидной активностью, не содержащими хлора, и последующей обработкой ультрафиолетом в течение 30—60 мин.

9) Потенциальные источники дикого полиовируса для снижения риска случайного инфицирования сведены к минимуму следующим образом:

• использование дикого полиовируса прекращается во всех случаях, где ту же задачу можно выполнить при помощи аттенуированных вакцинных штаммов, инактивированных антигенов или НПЭВ;

• во всех случаях, когда нет программной или научной необходимости хранения полиовирусов, все запасы таких вирусов и потенциально инфицированных ими материалов следует уничтожить автоклавированием или сжиганием.

10) Лаборатории, сохраняющие дикие полиовирусы, должны выполнять следующие требования:

• если дикие полиовирусы необходимы для проведения исследований, то используют только штаммы, которые могут быть легко идентифицированы молекулярными методами;

• все виды работ с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными дикими полиовирусами, проводят в БЗУ 2-го класса безопасности;

• холодильники/морозильники, в которых хранят дикие полиовирусы, запираются (доступ к ключам ограничен), чётко маркируются (указывается цель использования);

• инвентарные списки материалов, инфицированных или потенциально инфицированных дикими полиовирусами, должны быть полными, включать сведения о происхождении материала, источнике, дате сбора, количестве, расположении в холодильнике;

• материалы, инфицированные или потенциально инфицированные дикими полиовирусами, хранят в пластиковых пробирках с завинчивающимися крышками и непротекающих прочных контейнерах, переносят из холодильника в холодильник в непротекающих прочных вторичных контейнерах.

Приложение 1

Нормативные ссылки

1. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан от 22 июля 1993 г. № 5487-1.

2. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3. Положение о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322.

4. Положение об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации. Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569.

5. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании. Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 июля 2000 г. № 554.

6. СП 3.1.3.2.1379—03 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных болезней».

7 СП 1.1.1058—01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

8. СП 1.1.2193—07 Изменения и дополнения 1 к СП 1.1.1058—01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

9. СП 3.5.1378—03 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям и осуществлению дезинфекционной деятельности».

10. ОСТ 42-21—85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы».

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

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

13. СП 1.3.1325—03 «Безопасность работы с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными диким полиовирусом».

14. СП 3.1.2260—07 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования материалов, инфицированных или потенциально инфицированных диким полиовирусом».

15. Приказ Минздрава России от 17 июля 2002 г. № 228 «О порядке проведения мероприятий по контролю при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора».

16. Приказ Минздравсоцразвития России от 19.04.07 № 283 «Критерии оценки эффективности работы врача-педиатра, участкового».

17. МУ 3.1.1.1760—03 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против «управляемых» инфекций (дифтерия, столбняк, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит)».

18. МУ 3.1.1.2130—06 «Энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика».

19. МР № 0100-8607-07-34 «Организация контроля за уровнем квалификации персонала вирусологических лабораторий по вопросам безопасности лабораторного хранения материала, инфицированного или потенциально инфицированного диким полиовирусом» от 23.08.07.

20. МУ № 287-113 «Дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизации изделий медицинского назначения» от 30.12.03.

21. МУ 1516-5 «Контроль работы паровых и воздушных стерилизаторов» от 28.02.91.

22. МР 02.007—06 «Использование электромагнитного излучения сверхвысокой частоты для обеззараживания инфекционных медицинских отходов».

23. МУ № 11-16/03—06 по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях, утв. Минздравмедпромом России 28.02.95.

24. Инструкция по эксплуатации и контролю эффективности вентиляционных устройств на объектах здравоохранения, утв. Минздравом СССР 20.03.75.

25. МУ 1.3.1888—04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III—IV групп патогенности».

26. МР «Организация работы по обеспечению безопасного лабораторного хранения диких полиовирусов» от 12.11.01.

27. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. —4-е изд. ВОЗ, Женева, 2005.

28. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. ВОЗ, Женева, 2005.

29. Глобальный план действий для обеспечения безопасного лабораторного хранения диких полиовирусов. ВОЗ, Женева, 2000.

30. Рекомендации по обеспечению безопасного лабораторного хранения дикого полиовируса. ВОЗ, Женева, 2000.

31. Руководство по лабораторной безопасности.—3-е изд. ВОЗ, Женева, 2004.

32. Национальный план действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации. Утвержден Минздравсоцразвитием 17.03.06.

Приложение 2

Определение приоритетного («горячего») случая острого вялого паралича

Для оперативного реагирования в случае завоза дикого полиовируса в Российской Федерации действует определение приоритетного («горячего») случая острого вялого паралича (ОВП). К «горячему» случаю ОВП относятся:

- дети с явлениями ОВП, не имеющие сведений о профилактических прививках против полиомиелита;
- дети с явлениями ОВП, не имеющие полного курса вакцинации против полиомиелита (менее 3 вакцинаций);
- дети с явлениями ОВП, прибывшие из неблагополучных (эндемичных) по полиомиелиту стран (территорий);
- дети с явлениями ОВП из семей беженцев, вынужденных переселенцев, кочующих групп населения, а также прибывших из неблагополучных (эндемичных) по полиомиелиту стран (территорий);
- дети с явлениями ОВП, общавшиеся с беженцами, вынужденными переселенцами, кочующими группами населения, прибывшими из неблагополучных (эндемичных) по полиомиелиту стран (территорий);
- лица с подозрением на полиомиелит независимо от возраста.

Приложение 3

Приготовление сред и растворов

1. Фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2—7,4 (ФСБ)

Неполный раствор ФСБ, несодержащий ионы кальция или магния, может использоваться для отмывания клеток. Полный раствор ФСБ используется для приготовления экстрактов проб и для разведения вирусов, присутствие ионов кальция и магния стабилизирует вирусы, особенно полиовирус и другие энтеровирусы.

Раствор А (неполный раствор ФСБ):

NaCl	8,0 г
KCl	0,2 г
Na_2HPO_4	1,15 г
KH_2PO_4	0,2 г

Растворяют в дистиллированной воде, добавляют 2,0 мл 0,4 % фенолового красного – индикатора pH, доводят до 800 мл и автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 мин.

Раствор В:

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,10 г

Растворяют в 100 мл дистиллированной воды, автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 мин.

Раствор С:

$CaCl_2$	0,10 г

Растворяют в 100 мл дистиллированной воды, автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 мин.

Рабочий раствор полного ФСБ:

К 8 частям раствора А добавляют 1 часть раствора В и 1 часть раствора С.

2. Среда для транспортирования вирусов

Состоит из основного солевого раствора Хэнкса, доведённого до pH 7,4 буфером HEPES с 0,2 % бычьего альбумина. В среду добавляют антибиотики – пенициллин и стрептомицин (или гентамицин) и феноловый красный в качестве индикатора. Среду разливают по 2,5 мл в надёжно закрытые флаконы, хранят при температуре от 0 до 8 °С.

Приложение 4

Направление на лабораторное исследование

Раздел 1 должен быть заполнен лицом, отправляющим материалы.

Эта форма должна прилагаться к образцам фекалий, посылаемым в лабораторию.

Раздел 1			
Ф., И., О. больного Эпид. №			
Адрес			
Район Область			
	День	Месяц	Год
Дата рождения <*>			
Дата начала паралича			
Дата взятия первого образца фекалий			
Дата взятия второго образца фекалий			
Дата отправки образцов <**>			
Сведения о прививках Количество прививок (ИПВ или ОПВ, полученных при плановой иммунизации) указать даты, серии ОПВ			
Дата последней прививки ОПВ			
Предварительный клинический диагноз Образцы направлены Название организации, отправившей образцы Ф., И., О., должность лица, отправившего материал Телефон Факс E-mail По адресу Тел. №			
<*> Если неизвестна, укажите возраст в месяцах. <**> Если образцы отправляются в разные дни, заполните форму на каждый образец отдельно			

Раздел 2 должен быть заполнен вирусологом в лаборатории.

Копию заполненной формы необходимо направить должностному лицу, ответственному за полиомиелит на территории и отправителю материала. Одна копия формы должна оставаться в лаборатории.

<table>
<tr><td colspan="8">Раздел 2</td></tr>
<tr><td colspan="3"></td><td>День</td><td colspan="2">Месяц</td><td colspan="2">Год</td></tr>
<tr><td colspan="3">Дата поступления в лабораторию первого образца</td><td></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="3">Дата поступления в лабораторию второго образца</td><td></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="3">Состояние первого образца при поступлении в лабораторию <*></td><td>Хорошее</td><td colspan="2">Плохое</td><td colspan="2">Не изв.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Состояние второго образца при поступлении в лабораторию <*></td><td>Хорошее</td><td colspan="2">Плохое</td><td colspan="2">Не изв.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Результаты исследования первого образца направлены должностному лицу, ответственному за полиомиелит на территории</td><td>День</td><td colspan="2">Месяц</td><td colspan="2">Год</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 1</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл.</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 2</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл.</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 3</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Неполиоэнтеровирусы</td><td>Да</td><td>Нет</td><td>Не иссл.</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="4">Результаты исследования второго образца направлены должностному лицу, ответственному за полиомиелит на территории</td><td>День</td><td>Месяц</td><td colspan="2">Год</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 1</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 2</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл.</td></tr>
<tr><td>Изолирован полио тип 3</td><td>Да, дикий</td><td>Да, вакц.</td><td>Да, в работе <**></td><td>Смесь <***></td><td>Нет</td><td colspan="2">Не иссл.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Неполиоэнтеровирусы</td><td>Да</td><td>Нет</td><td>Не иссл.</td><td colspan="3"></td></tr>
<tr><td colspan="8">Подпись вирусолога</td></tr>
<tr><td colspan="8"><*> Критерии «хорошего» состояния образцов: достаточный объем, не протекают и не высохшие, индикатор или наличие льда указывают на то, что соблюдена обратная «холодовая цепь».
<**> Выделен полиовирус, проводится внутритиповая дифференциация.
<***> Смесь «дикого» и вакцинного (Себин подобный) вирусов одного и того же типа</td></tr>
</table>

Сопроводительный документ
(заполняется на бланке организации)

ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в _____
(наименование субъекта Российской Федерации) направляет материал для исследования на полиомиелит в Региональный центр эпиднадзора за ПОЛИО/ОВП.

Поезд (рейс, автобус и т. д.) _____ вагон _____
Дата отправления _____ время отправления _____
Пункт назначения _____ время прибытия _____

Главный врач ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии»

Ф., И., О.

Занимаемая должность сопровождающего лица

Приложение 5

Приготовление и титрование референс-штаммов (вакцинных штаммов Сэбина) вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3

Вакцинные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3 получают в НЦ и используют для приготовления рабочих запасов референс-штаммов.

А. Приготовление рабочих запасов референс-штаммов

Все процедуры выполняют в БЗУ 2-го класса защиты, одновременно работают только с вирусом одного типа. Оптимальным является работа с вирусом каждого типа в отдельные дни.

1) Готовят флакон площадью 25 $см^2$ с культурой клеток HEp-2 (Cincinnati), сформировавшей сливной здоровый монослой в течение 2—3-х дней. Маркируют флакон.

2) Сливают ростовую среду и ополаскивают клеточный слой ФСБ.

3) Вносят во флакон 0,2 мл вируссодержащей жидкости из пробирки с прототипным референс-штаммом, полученным в НЦ. Оставшееся количество прототипного референс-штамма хранят при –20 °С.

4) Инкубируют культуру при 36 °С в течение 1 ч, периодически осторожно покачивая флакон для лучшей адсорбции вируса.

5) Добавляют поддерживающую среду (около 10 мл), содержащую 5 % сыворотки плодов коровы. Флакон помещают в термостат при 36 °С.

6) Культуру просматривают ежедневно. После распространения ЦПЭ на 75—100 % клеточного монослоя, флакон трижды замораживают и оттаивают для разрушения клеток.

7) Содержимое флакона переносят в центрифужную пробирку, центрифугируют при 1 500 g 20 мин. Надосадочную жидкость по 0,5 мл переносят в пробирки, предназначенные для хранения референс-штамма, с этикетками, на которых чётко указаны тип клеток, вирусный штамм, дата приготовления. Приготовленные таким образом лабораторные референс-штаммы хранят при –20 °С.

8) Определяют титр референс-штамма (пункт Б).

9) Эти запасы вируса могут быть использованы для приготовления нужных объёмов для проведения исследований, для проведения процедуры контроля чувствительности клеточных культур и пр. Не следует пассировать вирус в культуре НЕр-2 более 3-х раз.

Б. Определение титра референс-штаммов

1) Готовят разведение 10^{-1} исследуемого вируса: 0,1 мл вируса вносят в пробирку, содержащую 0,9 мл среды.

2) Готовят ряд последовательных разведений от 10^{-2} до 10^{-8}. В маркированные соответствующим образом пробирки разливают по 9,0 мл среды, в первую вносят 1,0 мл разведения 10^{-1} исследуемого вируса. Новой пипеткой перемешивают содержимое пробирки, переносят 1,0 мл в следующую, меняют пипетку, вновь перемешивают и переносят 1,0 мл, и т. д.

3) Переносят по 100 мкл разведения вируса из пробирок в лунки рядов А–Н колонок 1—10 панели для микротитрования (рис. 1а). Для получения статистически достоверных результатов определения титра референс-штамма используют разведения 10^{-5}—10^{-8}, каждое разведение вносят в 20 лунок.

4) Вносят по 100 мкл поддерживающей среды в лунки колонок А—Н рядов 11—12 для контроля клеток.

5) Готовят суспензию клеток в концентрации 1—2 х 10^5 клеток/1,0 мл, вносят по 100 мкл во все лунки панели. Заклеивают панель плёнкой и помещают в инкубатор при температуре 36 °С.

6) Ежедневно микроскопируют панель, наблюдая за появлением ЦПЭ, окончательно учитывают результаты на 5—7-й день. Тест считают

действительным при образовании в лунках контроля сплошного монослоя нормальных клеток.

7. Рассчитывают титр вируса по формуле Кербера:

$$\lg ТЦД_{50} = L - d(S - 0,5), \text{ где}$$

L = lg наименьшего разведения сыворотки в опыте;

d = разница между lg последовательных разведений;

S = сумма пропорций тест-объектов (лунок с культурой клеток), давших положительный результат (ЦПЭ) в каждом разведении.

В данном примере (рис. 1б):

$lg\ ТЦД_{50} = -5 - 1(2,1—0,5) = -6,6$

Титр вируса = $10^{6,6}$ $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

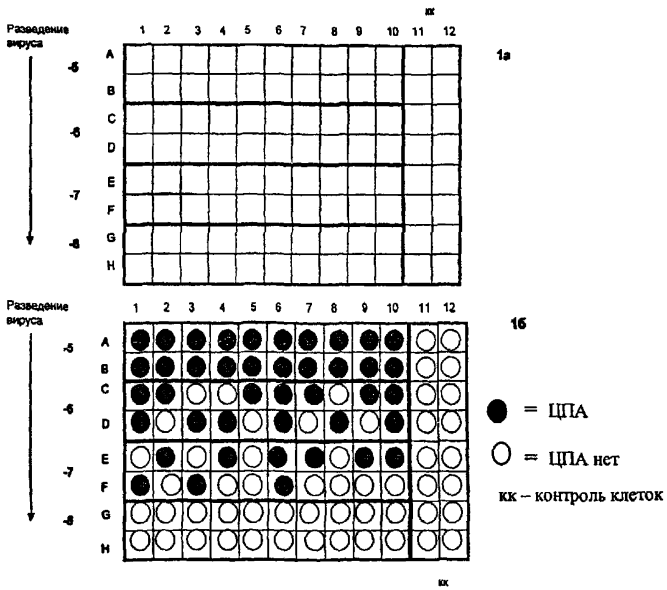


Рис. 1. Определение титра референс-тамма

Приложение 6

Проведение реакции нейтрализации для определения титра нейтрализующих антител к полиовирусу

1. Готовят панели для микротитрования из расчёта 1 панель на каждый тип вируса, маркируют их, обозначая номер исследуемой сыворотки, тип вируса, дату постановки опыта.

2. Вносят 50 мкл питательной среды во все лунки панели, кроме лунок, предназначенных для контроля культуры клеток (ряды А—Н, колонки 11—12). В эти лунки вносят 100 мкл среды (рис. 2а).

3. Необходимый объем сыворотки, приготовленной для исследования, инактивируют в течение 30 мин при 56 °С.

4. Готовят разведение 1 : 4 каждой исследуемой сыворотки, а также референс-сыворотки в поддерживающей среде с добавлением 2 % сыворотки плодов коровы. Необходимо иметь как минимум 600 мкл разведения 1 : 4 каждой сыворотки.

5. Вносят 50 мкл разведения 1 : 4 каждой сыворотки в соответствующие лунки колонок 1 и 2 в каждую из трёх панелей (рис. 2а).

6. Используя микропипетку с одноразовым наконечником, аккуратно перемешивают содержимое лунки 2 ряда А, отбирают 50 мкл, переносят в лунку 3, вновь перемешивают, отбирают 50 мкл, переносят в лунку 4 и т. д., включая лунку 10. Из лунки 10, соответствующей разведению 1 : 2 048, после перемешивания 50 мкл содержимого отбрасывают (рис. 2б).

Повторяют вышеописанные процедуры для ряда В, используя новый наконечник. Таким образом получены двукратные разведения от 1 : 8 до 1 : 2 048 сыворотки 1. Лунки колонки 1 рядов А и В служат для контроля токсичности сыворотки, в них не добавляют вирус.

7. Аналогично вышеописанному готовят последовательные разведения второй исследуемой сыворотки и референс-сыворотки. Таким образом, лунки рядов А—F колонок с 1 по 10 предназначены для исследования сывороток.

При титровании сывороток можно использовать многоканальные микропипетки. Следует убедиться, что они хорошо откалиброваны, наконечники соответствуют типу пипетки, в противном случае возможны значительные ошибки опыта.

8. Готовят суспензию нейтрализуемого полиовируса каждого типа с известным заранее титром в поддерживающей среде в количестве, достаточном для исследования намеченного числа сывороток. Разводят каждый вирус так, чтобы в 50 мкл вируссодержащей жидкости содержалось 100 $ТЦД_{50}$. Для одной панели необходимо примерно 4,0 мл вируса.

8.1. Пример определения рабочего титра вируса.

При предварительном титровании референс-штаммов на культуре клеток Нер-2 был установлен их титр (конечная точка титрования):

полиовирус типа 1 – 9,02 lg/мл;

полиовирус типа 2 – 8,44 lg/мл;

полиовирус типа 3 – 8,66 lg/мл.

Разведение, которое даёт концентрацию 100 $ТЦД_{50}$/мл – это в 100 раз меньшее разведение, чем конечная точка титрования. Так как в лунку вносят 50 мкл разведения вируса, то его рабочее разведение должно быть в 20 раз (или на 1,3 lg) меньше. Таким образом рабочее разведение референс-штаммов будет следующим:

полиовирус типа 1 – 5,72 lg/мл (можно использовать разведение – 6);

полиовирус типа 2 – 5,14 lg/мл (можно использовать разведение – 5);

полиовирус типа 3 – 5,36 lg/мл (можно использовать разведение – 5).

8.2. Пример приготовления ряда последовательных разведений референс-штаммов.

Разведения	Объём среды для разведения, мл	Объём вирусной суспензии, мл
10^{-1}	0,9	0,1
10^{-2}	0,9	0,1
10^{-3}	0,9	0,1
10^{-4}	0,9	0,1
10^{-5} – рабочее разведение для полиовирусов типов 2 и 3	3,6	0,4
10^{-6} – рабочее разведение для полиовируса типа 1	3,6	0,4
10^{-7}	0,9	0,1
10^{-8}	0,9	0,1

9. Вносят 50 мкл рабочего разведения вируса определённого типа в лунки рядов А2—А10 – F2—F10 соответствующей типу вируса панели. В лунки колонок 1, 11, 12 , а также рядов G и H вирус не добавляют (рис. 2в).

Ряды G и H предназначены для титрования референс-вируса для контроля рабочей дозы. Вносят 50 мкл последовательных разведений вируса, начиная с наибольшего (от 9 до 5).

10. Панели заклеивают специальной пластиковой плёнкой, закрывают крышкой, крайне осторожно постукивают пальцем по краю панели для лучшего смешивания ингредиентов в лунках и помещают на 3 ч в термостат при температуре 36 °С.

11. Готовят суспензию клеток Нер-2 в ростовой среде в концентрации 1—2 х 10^4 клеток в 100 мкл.

12. Добавляют по 100 мкл клеточной суспензии во все лунки всех панелей. Заклеивают панели, помещают в термостат при температуре 36 °С на 5 дней. Учёт результатов начинают на 3-й день, окончательный учёт – на 5-й день.

При учёте результатов обращают внимание на состояние контролей культуры, токсичность сыворотки, результаты контрольного титрования рабочих разведений референс-вирусов. Для контроля рабочей дозы каждого из использованных в опыте вирусов по формуле Кербера рассчитывают титр вируса (прилож. 5). Если рабочая доза выходит за пределы 50—200 $ТЦД_{50}$, результаты опыта не считают достоверными.

При учёте результатов обращают внимание на воспроизводимость уже известных титров референс-сыворотки. Если в опыте значения титров резко отличаются от ожидаемых, результаты опыта считают недействительными.

13. Рассчитывают конечную точку нейтрализации по формуле Кербера.

Логарифм 50 % нейтрализующего титра = L – d(S – 0,5), где:

L = log наименьшего разведения сыворотки в опыте;

d = разница между log последовательных разведений;

S = сумма пропорций тест-объектов (лунок с культурой клеток), давших положительный результат (ЦПЭ) во всех испытанных разведениях сыворотки. Переводят разведения сыворотки в логарифмические значения (разведение 1 : 4 = 2, 1 : 8 = 3, 1 : 16 = 4 и т. д.). Титром антител в сыворотке считается её наибольшее разведение, защищающее 50 % тест-культур от действия 100 $ТЦД_{50}$ вируса. Титр вируса часто выражают величиной, обратной разведению (т. е. при разведении 1 : 256 титр антител выражается как 256).

13.1. Пример расчёта титра сыворотки (рис. 2г, сыворотка 1).

Разведение сыворотки (log)		Пропорции тест объектов
1 : 8	3	0/2 = 0
1 : 16	4	0/2 = 0
1 : 32	5	0/2 = 0
1 : 64	6	1/2 = 0,5
1 : 128	7	2/2 = 1
1 : 256	8	2/2 = 1
1 : 512	9	2/2 = 1
1 : 1 024	10	2/2 = 1
1 : 2 048	11	2/2 = 1
		S = 5,5
$lg\ ТЦД_{50}$ = L – d(S – 0,5) = 11 – 1(5,5 – 0,5) = 6 (1 : 64)		

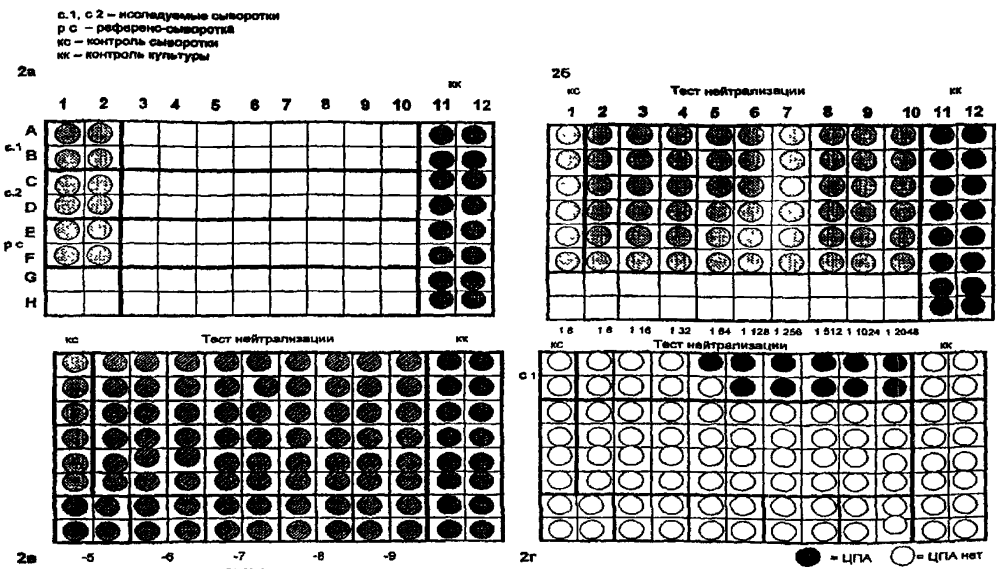


Рис. 2. Ход выполнения реакции нейтрализации для определения титра нейтрализующих антител к полиовирусу

Приложение 7

Список лабораторий Российской Федерации, осуществляющих вирусологические исследования материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича

№ п/п	Лаборатория	Адрес	Телефон	Факс	Электронный адрес
1	2	3	4	5	6
1	Национальный центр по лабораторной диагностике полиомиелита (ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН)	142782, Московская обл., п/о Института полиомиелита	(495) 439 90 54	(495) 439 93 21 (495) 549 67 60	poliom@ aha.ru
2	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве», Роспотребнадзора)	129626, г. Москва, Графский переулок, 4/9	(495) 687 36 16	(495) 687 40 39	poliolab@mos sanepid.ru
3	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области», Роспотребнадзора)	644116, г. Омск, 27-я Северная, 42а	(3812) 68 08 37	(3812) 68 08 37	poliom@ mail.ru
4	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», Роспотребнадзора)	620219, г. Екатеринбург, Отдельный пер., 3	(343) 374 35 96	(343) 374 47 03	polioekb@ ocsen.utk.ru
5	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае» Роспотребнадзора)	355008, г. Ставрополь, ул. Фадеева, 4	(865) 294 65 93	(865) 294 68 54	poliost@ avn.skiftel.ru

Продолжение прилож. 7

1	2	3	4	5	6
6	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП («Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае» Роспотребнадзора)	680009, г. Хабаровск, ул. К. Маркса, 109б	(421) 227 47 72	(421) 227 47 81	poliokhv@ mail.redcom.ru
7	Региональный центр эпидемиологического надзора за ПОЛИО/ОВП (ФГУН НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Роспотребнадзора)	197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, 14	(812) 233 21 56	(812) 232 92 17	poliospb@ nr3854.spb.edu

gost.e-ecolog.ru