Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов

Методические указания
МУ 4.2.1103—02

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2002

gost.e-ecolog.ru

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов

Методические указания
МУ 4.2.1103—02

ББК 51.1я8
П75

П75 **Приготовление** проб с имитаторами патогенных биологических агентов: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.—32 с.

ISBN 5—7508—0382—1

1. Разработаны Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Э. Ф. Опочинский, Ю. В. Мохов); Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом Минздрава России (В. С. Лесовой, А. В. Липницкий, В И. Илюхин, Н. П. Храпова); Омской медицинской академией и Омским научно-исследовательским институтом природно-очаговых инфекций Минздрава России (Н. В. Рудаков, А. А Матушенко); Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии РАМН (Ю. В. Вертиев, И. Д. Виноградова, Г. А. Угрюмова).

2 Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 27 января 2002 г.

3. Введены в действие с 1 апреля 2002 г.

4. Введены взамен методических рекомендаций «Приготовление проб с имитаторами биологических поражающих агентов (БПА)», утвержденных Минздравом РСФСР 27.11.90.

ББК 51.1я8

Редакторы Кожока Н. В., Максакова Е. И.
Технический редактор Смирнов В. В.

Подписано в печать 20.05.02

Формат 60x88/16 Печ. л. 2.0
Тираж 3000 экз. Заказ 23

ЛР № 021232 от 23 06.97 г

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Издательским отделом
Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11.
Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2002
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002

Содержание

1. Общие положения и область применения 4
2. Нормативные ссылки 5
3. Термины и определения 6
4. Требования по конструированию проб 7
5. Приготовление проб с имитаторами возбудителей сапа, мелиоидоза, глубоких микозов 15
6. Приготовление проб с риккетсиями и коксиеллами 17
7. Программа составления проб 18
8. Сопроводительная документация 21
Приложение 1. (вариант 1). Объем исходной суспензии, вносимый в пробу для получения необходимой концентрации микробных клеток 22
Приложение 1. (вариант 2). Объем исходной суспензии, вносимый в пробу для получения необходимой концентрации микробных клеток 23
Приложение 2. Направление материала для специфической индикации поражающих биологических агентов (форма А-1) 25
Приложение 3. Перечень некоторых вакцин и диагностических препаратов, используемых в качестве имитаторов ПБА 26
Приложение 4. Образец протокола внесения биологических агентов в пробы № № 1—24 (протокол 1) 28
Приложение 5. Образец протокола внесения биологических агентов в пробы (протокол 2) 30
Приложение 6. Образец протокола внесения биологических агентов в пробы (протокол 3) 31
Приложение 7. Образец журнала выборочного контроля приготовленных проб 32

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации – Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
МУ 4.2.1103—02
27 января 2002 г.
Дата введения: 1 апреля 2002 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов

Методические указания

1. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к приготовлению проб с применением имитаторов патогенных биологических агентов.

1.2. Методические указания предназначены для учреждений санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и других учреждений, проводящих в Системе наблюдения и лабораторного контроля индикацию патогенных биологических агентов и лабораторный контроль продовольствия на зараженность возбудителями опасных инфекционных заболеваний и токсинами с применением экспрессных и ускоренных методов исследования.

1.3. Методические указания разработаны с целью установления единого подхода к приготовлению проб с учетом требований по специфической индикации патогенных биологических агентов. Унификация методов приготовления проб наряду с едиными требованиями к проведению тренировочных учений по их индикации способствует разработке единого подхода к оценке полученных результатов.

2. Нормативные ссылки

2.1. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормированиии, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24.07.00 № 554.

2.2. Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 24.07.00 № 554.

2.3. СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности». Утверждены Госкомсанэпиднадзора России 04.05.94.

2.4. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IY групп патогенности». Утверждены Госкомсанэпиднадзора России 28.08.95.

2.5. СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IY группы патогенности и гельминтами». Утверждены Минздравом России 03.02.99.

2.6. Методическое пособие для врачей эпидемиологов и микробиологов. Бактериологическая разведка и индикация бактерийных (биологических) средств. Утверждены Минздравом СССР 16.04.70.

2.7. Дополнение к методическому пособию «Документация, используемая при проведении специфической индикации биологических поражающих агентов». Утверждено Минздравом СССР 26.08.81.

2.8. Инструкция по лабораторному контролю продовольствия на зараженность возбудителями опасных инфекционных заболеваний и токсинами. Утверждена Минздравом СССР, 1983.

2.9. Методические указания по подготовке и применению имитаторов биологических агентов с целью проверки готовности учреждений санэпидслужбы к работе по специфической индикации и лабораторному контролю. Утверждены Минздравом СССР 02.04.86.

2.10. Руководство по индикации и идентификации бактериальных (биологических) средств. Минобороны СССР, 1989.

2.11. Отраслевой стандарт 91500.05.001—00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. Утвержден Минздравом РФ 29.02.00 № 32.

2.12. Письмо Минздрава России от 24.02. 00 года № 1100/474—0—113.

3. Термины и определения *

3.1. ***Патогенные биологические агенты (ПБА)*** – патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, хламидии, риккетсии, простейшие, грибы, микоплазмы), генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы, яды биологического происхождения (токсины), гельминты, а также материал (включая кровь, другие биологические жидкости и экскреты организма), подозрительные на содержание перечисленных агентов (2.5).

3.2. ***Специфическая индикация*** – комплекс специальных мероприятий, проводимых для подтверждения факта применения бактериальных (биологических) средств, выявления и определения вида ПБА в исследуемых пробах (2.10).

3.3. ***Экспрессный метод исследования*** – непосредственное (без накопления) исследование нативного материала, проб (2.6).

3.4. ***Ускоренный метод исследования*** – исследование мазков, взвесей после предварительного биологического накопления на питательных средах, культуре клеток, биопробных животных, эмбрионах (2.6).

3.5. ***Медицинские иммунобиологические препараты (МИБП)*** – лекарственные средства, предназначенные для иммунологической профилактики, иммунологической диагностики и иммунологической терапии (2.11).

3.6. ***Вакцины*** – препараты, получаемые из живых аттенуированных штаммов или убитых культур микроорганизмов или их антигенов, предназначенные для активной иммунизации (2.11).

3.7. ***Диагностические иммунобиологические препараты*** – препараты, предназначенные для диагностики инфекционных заболеваний (2.11).

3.8. ***Коммерческие иммунобиологические препараты*** – МИБП, реализация которых в соответствии с требованиями письма Минздрава России (2.12) проводится при наличии документов:

- свидетельства о регистрации препарата;
- сертификата (паспорта) фирмы – изготовителя на данную серию;
- сертификата производства (прежнее название – сертификат качества) иммунобиологического препарата, выданного ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

---

* В скобках в конце определения указан номер нормативной ссылки, в которой имеется определение.

3.9. ***Имитаторы ПБА:***

• вакцинные штаммы некоторых возбудителей инфекционных заболеваний I—II группы патогенности;

• диагностикумы, содержащие корпускулярные и (или) растворимые антигены микроорганизмов;

• штаммы, которые обладают всеми признаками микроорганизмов II группы патогенности, но не имеют патогенных свойств, в связи с чем отнесены к III или IV группе (например – V. cholerae O1 нетоксигенный);

• безопасные в работе токсины.

3.10. ***Проба с имитаторами ПБА*** (далее – *проба*) – образец материала для исследования, в который с учетом требований настоящего и других действующих документов добавлены имитаторы ПБА из числа перечисленных в п. 3.9, в целях проведения внешне- и внутрилабораторного контроля готовности учреждений (лабораторий) к проведению специфической индикации этих агентов и контроля продовольствия на зараженность возбудителями опасных инфекционных заболеваний и токсинами.

4. Требования по конструированию проб

4.1. Пробы могут содержать один и более различных агентов, в т. ч. и не относящихся к имитаторам ПБА в следующих сочетаниях:

• один имитатор ПБА;

• два и более имитаторов ПБА (миксты);

• один или более ПБА из группы имитаторов и один или более ПБА IV группы патогенности (условно патогенных микроорганизмов);

• один или более ПБА IV группы патогенности (*без имитаторов*).

Применение проб без ПБА (стерильных) нецелесообразно.

4.2. При осуществлении контроля за готовностью лабораторий к проведению специфической индикации ПБА или лабораторному контролю продовольствия на зараженность возбудителями опасных инфекционных заболеваний и токсинами в качестве имитаторов ПБА должны использоваться коммерческие вакцины, токсины и другие препараты, для индикации которых имеются коммерческие диагностические препараты. Для научно-исследовательских целей (отработка новых методов индикации ПБА и других), учебных и иных специальных задач могут использоваться имитаторы ПБА, не обязательно отвечающие требованиям, изложенным в п. 3.8. Пере-

чень некоторых препаратов, которые могут быть использованы в качестве имитаторов ПБА, представлен в прилож. 3, куда включено 16 препаратов. По мере увеличения выпуска коммерческих МИБП, в т. ч. диагностических препаратов для проведения иммуноферментного анализа, ДНК-диагностики и других методов исследования, перечень имитаторов ПБА может быть расширен.

4.3. Условно патогенные микроорганизмы в связи с отсутствием соответствующих коммерческих диагностических препаратов не подлежат идентификации в сроки, необходимые для проведения экспрессного и ускоренного анализа. Они являются «фоном» для имитаторов ПБА, имеющим большое значение, поскольку в реальности практически все пробы из объектов окружающей среды и многие пробы биологического материала, поступающие на исследование, содержат те или иные микроорганизмы (сапрофитные, условно патогенные и другие). В пробы, которые в нормальных условиях не должны содержать условно патогенные микроорганизмы или их антигены (кровь и некоторые другие биологические субстанции, консервированные пищевые продукты), эти микроорганизмы могут не добавляться.

4.4. В качестве «фона» можно использовать такие микроорганизмы, как E. coli, St. aureus, St. epidermidis, B. cereus, Y. enterocolitica, Ps. aeruginosa и другие. Выбранные штаммы этих микроорганизмов должны отвечать следующим требованиям:

- не проявлять антагонистического (например, колициногенного) действия по отношению к жизнеспособным микроорганизмам – имитаторам ПБА;
- формировать на простых питательных средах, не содержащих ингибиторы роста, зрелые колонии в течение 18—24 часов. Такие колонии служат в определенной степени ориентиром для обнаружения под микроскопом на поверхности пластинки агара мельчайших колоний микроорганизмов, обладающих замедленным ростом (возбудителя чумы, бруцелл и других);
- не иметь или иметь слабую и замедленную подвижность на простых питательных средах, не содержащих ингибиторы подвижного (ползучего) роста.

Не рекомендуется использовать в качестве «фона» культуру *Y. pseudotuberculosis* в пробах, содержащих в качестве имитатора вакцинный штамм *Y. pestis* в связи с трудностями их дифференциации экспрессными методами.

4.5. В качестве фона может рассматриваться и *V. cholerae* не О1 и не О139, т. к. коммерческие препараты для обнаружения возбудителя в МФА и РНГА не выпускаются. Однако данные микроорганизмы для отдельных задач можно считать имитатором ПБА, поскольку классический метод исследования с использованием сред накопления без ингибиторов роста (без теллурита калия) позволяет лабораториям, не имеющим возможности проводить экспрессное исследование, выдать тем не менее окончательный ответ о выделении культуры этого микроорганизма в сроки, необходимые для обнаружения других имитаторов ПБА.

4.6. Допускается использование в качестве «фона» смывов с каких-либо объектов окружающей среды, проверенных на содержание в них микроорганизмов. Смывы получают с нескольких участков поверхности, каждый раз ополаскивая тампон в физиологическом растворе до получения значительной мутности. На 5 мл пробы добавляют 2 капли такой взвеси. Т. к. объекты окружающей среды подвергаются многим внешним влияниям, смывы с них, несмотря на проверку, не гарантируют стабильности результатов. Поэтому более предпочтительным является дозированное внесение отобранных условно патогенных микроорганизмов из взвеси, приготовленной по стандартному образцу мутности 10 единиц (10^9 для кишечной палочки) или 5 единиц ($5 \cdot 10^8$). Фактическое количество микробных клеток в такой взвеси для мелких микроорганизмов может быть более высоким, а для крупных – меньшим, чем 10^9. Примерное содержание различных микроорганизмов во взвеси представлено в таблице на следующей странице.

Примерное содержание различных микроорганизмов, соответствующее стандарту мутности 5 и 10 единиц

№ п/п	Наименование микроорганизма	Соотношение размера с кишечной палочкой	Число микробных клеток по стандарту мутности	
			5 единиц	10 единиц
1	E. coli	X	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
2	St. aureus	1,0	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
3	Y. pestis	1,0	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
4	Bac. anthracis – споры	1,0	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
5	Bac. anthracis (вегетативная форма)	10,0	$5{,}0 \cdot 10^7$	10^8
6	Bac. cereus (вегетативная форма)	10,0	$5{,}0 \cdot 10^7$	10^8
7	V. cholerae	0,5	10^9	$2{,}0 \cdot 10^9$
8	Br. abortus	0,6	$8{,}0 \cdot 10^8$	$1{,}6 \cdot 10^9$
9	Fr. tularensis	0,2	$2{,}5 \cdot 10^9$	$5{,}0 \cdot 10^9$
10	R. prowazekii	0,8	$6{,}5 \cdot 10^8$	$1{,}3 \cdot 10^9$
11	C. burneti	0,15	$3{,}3 \cdot 10^9$	$6{,}6 \cdot 10^9$
12	B. mallei	1,0	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
13	B. pseudomallei	1,0	$5{,}0 \cdot 10^8$	10^9
14	C. immitis	200	$2{,}5 \cdot 10^6$	$5{,}0 \cdot 10^6$
15	H. capsulatum	100	$5{,}0 \cdot 10^6$	10^7

4.7. Живые вакцинные штаммы можно подготавливать для внесения в пробы в двух вариантах:

• с предварительным подращиванием на плотных питательных средах, что рекомендуется для чумной вакцины, сибиреязвенной вакцины, которую в вегетативной форме целесообразно вносить в биологические объекты. Подращивание проводят при 37 ± 0,5 °С в течение 1 суток (для штамма EV чумного микроба – 1 сутки при 28 ± 0,5 °С и 1 сутки при 37 ± 0,5 °С, что способствует обнаружению микроба за счет образования фракции F1, выявляемой при помощи МФА и РНГА). Более длительное выращивание биологических агентов нежелательно, т. к. оно приводит к увеличению числа отмерших микробных клеток и в суспензии, приготовленной по стандартному образцу мутности, будут присутствовать как живые, так и нежизнеспособные клетки;

• без подращивания, непосредственно после 3—6 часовой регидратации содержимого ампулы. В таком виде хорошо обнаруживаются методами экспрессного анализа вакцинные штаммы туляремийного, бруцеллезного микроба, споры сибиреязвенного микроба, которые целесообразно вносить в небиологические объекты окружающей среды. Этот способ может быть использован и в отношении чумной вакцины, но концентрация микробных клеток должна быть в 5—10 раз выше по сравнению с подрощенным штаммом, т. к. не все клетки обнаруживаются при экспрессном исследовании.

4.8. Концентрация микробных клеток в ампулах с живыми вакцинами может колебаться в зависимости от серии препарата. Определить ее с помощью стандартного образца мутности не всегда представляется возможным из-за цветовых различий жидкости в разведенной вакцине и стандарте. В этом случае определение концентрации клеток для их дозированного внесения в пробы возможно двумя способами:

• содержимое ампулы регидратируют до первоначального объема дистиллированной водой, выдерживают несколько часов, готовят ряд промежуточных разведений и проводят непосредственный подсчет микробных клеток одного из разведений в камере Горяева. Концентрацию клеток вычисляют математически с учетом разведения;

• содержимое ампулы разводят как указано выше и концентрацию клеток рассчитывают математически, исходя из того, что одна прививочная доза вакцины должна содержать определенное количество микробных клеток, обеспечивающих необходимый иммунный ответ. Число прививочных доз указано на ампуле, что позволяет к определенному объему разведенной вакцины (0,1 мл) добавить рассчетное количество физраствора для получения необходимой концентрации микробных клеток. Расчеты для некоторых вакцин представлены ниже.

Наименование вакцины	Количество м. к. в прививочной дозе	Количество физраствора на одну прививочную дозу (мл)	Получаемая концентрация м. к. в 1 мл
Чумная – накожная	$3{,}0 \cdot 10^9$	0,3	10^9
Чумная – подкожная	$3{,}0 \cdot 10^8$	0,03	10^9
Бруцеллезная	$1{,}33 \cdot 10^{10}$	1,33	10^9
Сибиреязвенная	$4{,}0 \cdot 10^8$	0,4	10^8
Туляремийная	$2{,}0 \cdot 10^8$	0.2	10^8

Пример: в ампуле содержится 7 доз бруцеллезной вакцины в 1 мл. Для получения суспензии 1 млрд (10^9) м. к./мл необходимо после регидратации вакцины в 1 мл дистиллированной воды отобрать из ампулы 0,1 мл суспензии и добавить физраствор в количестве 1,33 х 7 ≈ 9,3 мл.

4.9. Инактивированная холерная корпускулярная вакцина Эль-Тор выпускается с содержанием $8 \cdot 10^{10}$ и $1{,}6 \cdot 10^{11}$ м. к./мл. Для получения суспензии 10^9 м. к./мл содержимое ампулы регидратируют соответственно в 1,0 или в 2,0 мл дистиллированной воды и к 0,1 мл суспензии добавляют 7,9 мл физраствора.

4.10. Сибиреязвенная вакцина из штамма СТИ как после регидратации, так и после подращивания содержит конгломераты споровых или переплетенные цепочки вегетативных клеток. В связи с этим при внесении небольших количеств имитатора в пробу может оказаться, что при микроскопии мазка во многих полях зрения светящиеся клетки не будут обнаружены, а в каком-нибудь одном поле встретится конгломерат из многих клеток. Предупредить такое явление могло бы тщательное разбивание хлопьев на единичные клетки. Однако без специальной обработки (например ультразвуковой или добавления поверхностно активных веществ) сделать это затруднительно. Крупные хлопья частично можно разбить тщательным пипетированием через узкий кончик пастеровской пипетки или шприцом с тонкой иглой, но мелкие комочки остаются. В таких случаях избежать ложных отрицательных результатов микроскопического исследования можно за счет предварительного просмотра мазков с объективами х20, х40, позволяющими увеличить размер полей зрения.

4.11. Выбор материала для внесения ПБА и самих агентов не должны противоречить условиям «легенды». Нерационально, например, готовить токсиносодержащую пробу на мембранном фильтре или в «соскоб с карбункула» вносить холерный вибрион. Некоторые из возможных сочетаний наименований проб по легенде с фактическим материалом представлены в таблице на стр. 13. Используемый материал перед внесением биологических агентов должен быть или проверен на содержание микроорганизмов (почва, трава, листья, кровь, сыворотка крови, кал) или быть стерильным (физраствор, тампоны, мембранные фильтры, почва, кал, зерно, сено и др.).

Некоторые материалы, используемые для приготовления проб

Объекты	Наименование пробы по легенде	Используемый материал	
		Проба	Объем, вес
Окружающая среда	Смыв с поверхности	физраствор	5; 10 мл
		тампон	
		мембранный фильтр	
	Фураж	зерно	2—5 г
	Подстилочный материал	сено, солома	2—5 г
	Растения	трава, листья, хвоя	3—5 г
	Воздух	физраствор	5; 10 мл
		мембранный фильтр	
	Вода	вода	500 мл
		мембранный фильтр	
	Осколок боеприпаса	физраствор	5 мл
		тампон	
	Почва	почва, песок	10 г
Биологические	Пунктат бубона	физраствор	1 мл
	Смыв (соскоб) карбункула	физраствор	1 мл
	Смыв с судна (с рвотными массами и пр.)	физраствор	5; 10 мл
		тампон	
	Смыв с носоглотки	физраствор	5; 10 мл
		тампон	
	Кровь	кровь, сыворотка крови	2—5 мл
	Раневое отделяемое	физраствор	1 мл
		тампон	
	Кал	кал в физрастворе	1 г; 5 мл
		тампон	

4.12. При внесении в сухие пробы биологических агентов в малом объеме жидкости происходит быстрое ее высыхание, что приводит к отмиранию микроорганизмов. Зерно в месте попадания жидкости после ее высыхания склеивается в плотный комок, требующий тщательного растирания. При необходимости сохранить биологические агенты в жидкой фазе достаточно длительное время целесообразно добавлять физиологический раствор или вносить ПБА из менее концентрированных исходных суспензий.

4.13. Рекомендуется добавлять жидкие компоненты в пробы в следующей очередности:

- физиологический раствор в сухие пробы;
- диагностикумы, токсины и инактивированные вакцинные штаммы;
- условно-патогенные микроорганизмы;
- живые вакцинные штаммы неспорообразующих микроорганизмов;
- живые вакцинные штаммы спорообразующих микроорганизмов.

Живые микроорганизмы одного вида можно вносить одной пипеткой (одним наконечником), начиная с меньших концентраций.

4.14. Имитаторы различных бактериальных агентов удобно вносить в пробы из исходных концентраций от 10^5 до 10^9 м. к./мл, а условно-патогенные микроорганизмы – из концентраций 10^4—10^5 м. к./мл. В самой пробе объемом 5 или 10 мл происходит уменьшение концентрации клеток (разбавление суспензии) соответственно в 5 и 10 раз, а при усреднении пробы до 20 мл происходит дополнительное разбавление суспензии соответственно в 4 и в 2 раза. Все это следует учитывать для расчета количества микробных клеток не только при подготовке, но и при дальнейшем исследовании проб. Так, например, если исходная концентрация кишечной палочки составляет 10^5 м. к./мл (100 тыс.) и в пробу вносится 50 мкл такой суспензии ($5{,}0 \cdot 10^3$) на 5 мл, то в 1 мл пробы теоретически будет содержаться 10^3 м. к./мл, а в посевной дозе (0,1 мл) – 10^2 или 100 клеток. Исходную суспензию можно вносить в пробу каплями, исходя из предположения, что одна капля на конце тонкой пипетки Пастера равна 25 мкл. Этот метод является более грубым, т. к. размер капли в зависимости от густоты суспензии может меняться. Применение современных механических и электронных пипеток и пипеточных дозаторов позволяет проводить дозирование быстрее и точнее, чем капельное. Объемы исходной суспензии, которые необходимо добавить в пробы для получения требуемой концентрации микробных клеток, указаны в прилож. 1, которое дано в двух вариантах (1.1 и 1.2).

4.15. В качестве имитатора ботулотоксина используют стандартный препарат токсического комплекса ботулинического токсина типа С (прилож. 3, № 16). Случаи пищевого отравления токсином типа С не отмечены, однако работа с препаратом требует соблюдения правил личной гигиены. Целесообразно сначала приготовить

промежуточное разведение, для чего к содержимому ампулы (0,1 мл – 2000 dlm) добавляют 4,9 мл физраствора, получая концентрацию 400 dlm/мл. Пробу готовят из расчета добавления 50 мкл (20 dlm) разведенного токсина на 1 мл. Таким образом, в пробу, конечный объем которой составит 20 мл, необходимо добавление 1 мл разведенного токсина (400 dlm). В этой концентрации наглядную гибель белой мыши на 2—3 день (не позже 4 дня) вызывает инокуляция 0,5 мл пробы (10 dlm).

4.16. В качестве имитатора вируса оспы используют коммерческую живую вакцину против оспы (осповакцину). Работа с препаратом должна проводиться при строгом соблюдении правил противоэпидемического режима, особенно не привитыми лицами. Вакцина содержит около 10^6 оспообразующих единиц (ООЕ) вируса в одной прививочной дозе. В ампулу вносят по 100 мкл дистиллированной воды или физраствора на 1 дозу, а затем вакцину дополнительно разводят в 10 и 100 раз, получая 3 различных концентрации вакцины: цельную (10 °) с содержанием вируса 10^7 ООЕ/мл, 1 : 10 (10^{-1}) с содержанием вируса 10^6 ООЕ/мл и 1 : 100 (10^{-2}) с содержанием вируса 10^5 ООЕ/мл. В пробу вносят по 10 мкл вакцины из того или иного разведения на 1 мл пробы с учетом конечного объема пробы (см. п. 4.14). При этом обычно вирус из разведения 10^0 вызывает заражение большого числа клеток VERO, HEP-2, RK-13 и других в первые сутки; из разведения 10^{-1} – гнездное заражение клеток в течение 30—40 часов, а из разведения 10^{-2} – заражение отдельных клеток позднее 40 часов. Указанный эффект должен быть предварительно проверен, т. к. он зависит от серии вакцины, условий ее хранения, чувствительности клеток.

4.17. Приготовление проб с имитаторами ПБА проводят с учетом санитарных правил (п. 2.5).

5. Приготовление проб с имитаторами возбудителей сапа, мелиоидоза, глубоких микозов

5.1. Имитатор возбудителя сапа (Burkholderia mallei) представляет собой смешанную взвесь бактерий B. mallei 10230, P-1 и 712, выращенных при 37 °С в течение 1—2 суток на МПА с 5 % глицерина; имитатор возбудителя мелиоидоза (Burkholderia pseudomallei) – взвесь трех штаммов B. pseudomallei С 141, 101 и 111 (из различных эндемичных регионов мира), выращенных при 37 ± 0,5 °С в течение 1 суток на МПА с 5 % глицерина. Взвеси обеззаражены формалином

в конечной концентрации 1 %, что определяет возможность проведения только экспрессного анализа.

5.2. Ввиду антигенного родства обоих микроорганизмов, их обнаружение и идентификацию проводят с помощью как групповых, так и видоспецифических иммунодиагностических препаратов. Диагностикум эритроцитарный иммуноглобулиновый сапной взаимодействует с растворимыми и клеточными антигенами возбудителей и сапа, и мелиоидоза. При использовании в МФА группоспецифических люминесцирующих иммуноглобулинов, окрашивающих клетки и B. pseudomallei, и B. mallei, дифференциация их по морфологии клеток практически невозможна. Для видовой дифференциации предназначены видоспецифические препараты.

5.3. Оба имитатора расфасованы в ампулы по 1 мл с содержанием $1,0 \cdot 10^9$ микробных клеток по оптическому стандарту (ОСО) мутности 10 ед. Чувствительность МФА составляет $1,0 \cdot 10^5$ м. к., а РНГА – $5,0 \cdot 10^5$ м. к. Дозы имитаторов, вносимые в образцы проб окружающей среды, зависят от характера исследуемых объектов, от их сорбционных свойств. В пробы воздуха, воды, смывов с гладких поверхностей в расчете на 20 мл пробы добавляют 100—200 мкл ($1,0 \cdot 10^8$—$2,0 \cdot 10^8$ м. к.) имитатора, в пробу почвы – 100 мкл.

5.4. Для приготовления имитатора возбудителя кокцидиоидомикоза используется взвесь мицелиальной фазы C. immitis 36s (штамм Сильвейра), а имитатора возбудителей гистоплазмоза – типичный штамм H. capsulatum 6650. Возбудители выращивают 28 суток при 28 °С на агаре Сабуро с 1,5 % дрожжевого экстракта и обезвреживают добавлением формалина до конечной концентрации 0,5 %. Это определяет возможность проведения только экспрессного исследования.

5.5. Ввиду наличия общих антигенных связей между возбудителями особо опасных глубоких микозов используются как группо-, так и видоспецифические диагностические препараты. Препараты на основе антител к H. capsulatum могут выявлять имитатор как этого гриба (причем и мицелиальную фазу, и дрожжеподобные формы), так и C. immitis. Кокцидиоидозные люминесцирующие антитела и эритроцитарные иммуноглобулиновые диагностикумы предназначены для видоспецифической идентификации C. immitis. Особенность МФА состоит не только в степени люминесценции взвеси гриба, но и в выявлении специфически окрашенных характерных для данного вида морфологических элементов (артроконi-

дий с «усиками»). В РНГА выявляется комплекс растворимых антигенов гриба, преимущественно полисахаридной природы.

5.6. Концентрация микробных клеток в ампуле, рассчитанная по ОСО 10 ед. отличается от фактического количества грибных клеток при подсчете в камере Горяева (коэффициент пересчета, как показано в таблице п. 4.6. на стр. 10, составляет для C. immitis 1 : 200, для H.capsulatum – 1 : 100). Концентрация клеток и чувствительность МФА и РНГА при исследовании чистых культур представлены ниже.

Вид возбудителя	Содержание в ампуле (м. к./мл)		Чувствительность метода (м. к./мл)	
	ОСО 10 ед.	фактическое	ОСО 10 ед.	фактическое
C. mmitis	1×10^9	5×10^6	2×10^5— 2×10^6	1×10^3— 1×10^4
H.capsulatum	1×10^9— 5×10^9	1×10^7— 5×10^7	6×10^5— 6×10^6	6×10^3— 6×10^4

5.7. Дозы имитаторов, вносимые в образцы проб окружающей среды, зависят от характера исследуемых объектов, от их сорбционных свойств. Рекомендуемые дозы для проб с конечным объемом 20 мл представлены в таблице.

Вид возбудителя	Воздух, вода, смывы с гладких поверхностей			Почва		
	объем (в мкл)	содержание микробных клеток		объем (в мкл)	содержание микробных клеток	
		по ОСО 10 ед.	фактическое		по ОСО 10 ед.	фактическое
C. immitis	40	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	200	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^7$
H. capsulatum	40	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$	200	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^7$

6. Приготовление проб с риккетсиями и коксиеллами

6.1. Для приготовления проб используются коммерческие препараты, представленные в прилож. 3 (№№ 7, 12—15). Растворимые антигены в препаратах, предназначенных для постановки реакции связывания комплемента, хорошо выявляются с помощью реакции пассивной гемагглютинации, а корпускулярные антигены – в МФА. При этом возможно проведение только экспрессной диагностики. В целях ускоренной диагностики и проверки режима работы с микроорганизмами используется вакцина Е сыпнотифозная комбиниро-

ванная живая сухая. Работа с ней требует строгого соблюдения противоэпидемического режима и сопряжена с необходимостью проведения 3—4-кратного пассажа штамма на куриных эмбрионах. Интенсивность роста риккетсий контролируют микроскопией мазков-отпечатков стенок желточного мешка с помощью МФА.

6.2. Оптимальной вносимой в пробу дозой диагностикума Провачека или Сибирика, выпускаемых для целей исследования материала в РСК, является доза с концентрацией антигена, дающей положительный результат в РПГА не менее чем в трех последовательных разведениях. Такая концентрация обеспечивается при использовании 1 ампулы диагностикума для приготовления одной имитированной пробы объемом 20 мл. Недостаточное количество антигена в пробе приводит к получению ложноотрицательного результата РПГА, а его избыточная концентрация – к перерасходу сыворотки для торможения РПГА (РТПГА).

6.3. Диагностикумы разводят согласно указанию на ампуле и выдерживают 3 ч при комнатной температуре для полной регидратации. Корпускулярный антиген после разведения тщательно диспендируют шприцом с тонкой иглой, или пипеткой с тонко оттянутым концом, как это было уже указано в п. 4.10, титруют и приготовляют мазки на предметном стекле (антигенные пятна). Мазки подсушивают, фиксируют 30 мин в ацетоне или в 96°-ном этаноле и окрашивают люминесцирующей сывороткой. Оптимальным считается наличие 5—10 корпускул в поле зрения. Выбранную концентрацию увеличивают в несколько раз с учетом последующего усреднения пробы. Для корпускулярного Ку-риккетсиозного диагностикума, разведенного в объеме 1 мл, ориентировочной дозой является 15 мкл суспензии на 1 мл пробы. Количество корпускул в пробе для каждой серии диагностикума должно быть проверено указанным выше способом.

6.4. В пробу целесообразно вносить и растворимый, и корпускулярный антигены.

7. Программа составления проб

7.1. При подготовке значительного количества проб для одной или нескольких лабораторий целесообразно заранее составлять программу добавления биологических агентов, которая позволяла бы предвидеть конечный результат специфической индикации ПБА. В программе для каждой пробы указывается «легенда», число микробных клеток в исходной суспензии, объем суспензии и содержащееся в нем число микробных клеток (антигена или количества ток-

сина), добавляемых в пробу и т. д. Программа оформляется в виде протокола внесения патогенных агентов в пробы. Образец такого протокола представлен в прилож. 4. Данный образец содержит 17 различных разновидностей биологических агентов (имитаторы ПБА и условно-патогенные микроорганизмы), расположенных в порядке внесения в пробы согласно п. 4.13. Так как некоторые биологические агенты вносятся в пробы из разных разведений, то всего в образце протокола представлено внесение этих 17 БА в 29 различных вариантах. Эти варианты могут быть использованы для приготовления большого количества разнообразных проб. В графе 9 протокола указаны ПБА, внесенные в пробы №№ 1—24, а последующие всевозможные номера отмечены точками.

7.2. Подготовка имитаторов в разных разведениях позволяет готовить пробы с различными концентрациями имитатора: высокой, средней и низкой. Высокая концентрация обнаруживается достаточно уверенно, а низкая выявляется только при хорошем уровне подготовки лаборатории, после предварительной концентрации проб или заведомо рассчитана на обнаружение ПБА после подращивания микроорганизмов.

7.3. Поскольку экспрессное исследование проводится из пробы объемом 3—5 мл, то теоретически рассчитанное количество БА, указанное в графе 6 прилож. 4, можно заранее сопоставить с чувствительностью МФА и РНГА. В графе 8 указано теоретическое количество микробных клеток, которое можно ожидать при высевах на плотные питательные среды.

7.4. Протокол внесения патогенных биологических агентов может быть подготовлен в варианте, когда ПБА указаны для каждой пробы индивидуально. Такой вариант для двух лабораторий (для проб №№ 1—24) представлен в прилож. 5.

7.5. Протокол внесения биологических агентов может быть подготовлен также с указанием ожидаемых результатов (прилож. 6). В этом виде протокол можно использовать в ходе проведения специфической индикации. Ожидаемое время получения первого положительного ответа в соответствии с п. 7.3 ориентировано на использование МФА и РНГА. При добавлении «подпороговых» количеств имитатора время ожидаемого первого ответа, как отмечено выше, составляет до 24 ч. Однако при использовании лабораторией дополнительных высокочувствительных методов исследования, таких как ИФА и (или) ПЦР, ответ может быть получен уже при экспрессном исследовании.

7.6. V. cholerae не O1 в протоколе 3 отнесен к имитаторам ПБА (см. п. 4.5), в связи с чем указан результат исследования и возможное время выдачи ответа. Направление должно содержать указание на проведение соответствующих исследований, т. к. в противном случае поиск может ограничиться только теми ПБА, обнаружение которых возможно при экспрессном анализе.

7.7. Содержание БА в пробах №№ 1—24 всех трех протоколов одинаковое. При передаче проб в исследовательскую лабораторию можно использовать один, два или все три протокола, т. к. они не дублируют друг друга. Каждый из них, как видно из таблицы, имеет определенное назначение.

Варианты использования протоколов внесения имитаторов

Показатель	№ протокола		
	1	2	3
Возможность перемены посредником номеров проб (шифрования проб)		•	•
Целесообразность использования при внесении БА	•		
Наличие информации о содержащемся в пробе количестве внесенных биологических агентов	•		
Наличие «легенды»		•	•
Удобство использования лабораторией для анализа полученных ею результатов	•		
Удобство использования посредником		•	•
Возможность использования посредником – не микробиологом			•
Возможность применения протокола в ходе проведения специфической индикации			•

7.8. В пробах, содержащих живые микроорганизмы, при хранении и транспортировании может происходить частичное отмирание клеток, зависящее от влияния «фоновой» среды, антагонизма клеток, температуры хранения и других, не всегда предсказуемых факторов, что приводит в ряде случаев к появлению ложных отрицательных результатов. Из этого вытекает необходимость контроля качества проб, который может осуществляться путем непосредственного наблюдения за ходом проведения исследования в проверяемой лаборатории. При отсутствии такой возможности целесообразно отбирать небольшое количество содержимого проб с низкими концентрациями имитаторов ПБА. Эти контрольные образцы начинают исследовать примерно в одно время с наиболее удаленной

из проверяемых лабораторий. Результаты контроля фиксируются в журнале. Полученные в процессе индикации результаты целесообразно сопоставлять не только со сведениями, находящимися у посредника и отражающими состояние проб непосредственно в момент приготовления, но и с контрольными результатами, что особенно важно при наличии расхождений в результатах исследований.

8. Сопроводительная документация

8.1. Приготовление и выдача проб сопровождается следующей документацией:

- сопроводительное письмо, в котором делается отметка об отсутствии опасности или наличии особых требований при транспортировании проб;
- акт приема-передачи проб в двух экземплярах, один из которых передается посреднику, а другой остается в лаборатории, приготовившей пробы;
- протокол(ы) приготовления проб;
- направления на пробы для каждого проверяемого учреждения в двух экземплярах по утвержденной Минздравом СССР форме А-1 (см. нормативную ссылку № 2.7). На втором экземпляре, возвращаемом посреднику, делается отметка исследовательской лаборатории о дате и времени приема проб. В прилож. 2 представлен образец направления на пробы №№ 1—16 в лабораторию одного из центров госсанэпиднадзора. «Легенда» в напправлении составлена в соответствии с протоколами 2 и 3 (прилож. 5 и 6).

Приложение 1
(вариант 1)

Объем исходной суспензии, вносимый в пробу для получения необходимой концентрации микробных клеток

Количество микробных клеток		Объем исходной суспензии, вносимый в пробу мерно (мкл) и каплями (шт.)							
Исходная суспензия м. к./мл	Требуемое количество м. к./мл	в пробу 5 мл		в пробу 10 мл		в пробу 15 мл		в пробу 20 мл	
		мкл	шт	мкл	шт	мкл	шт	мкл	шт
10^9	10^8	500	–	1000	–	1500	–	2000	–
	10^7	50	2	100	4	150	6	200	8
	$5 \cdot 10^6$	25	1	50	2	75	3	100	4
	$2 \cdot 10^6$	10	–	20	1	30	1	40	2
$5 \cdot 10^8$	10^7	100	4	200	8	300	12	400	–
	$5 \cdot 10^6$	50	2	100	4	150	6	200	8
	$2 \cdot 10^6$	20	1	40	2	60	2	80	3
	10^6	10	–	20	1	30	1	40	2
10^8	10^7	500	–	1000	–	1500		2000	–
	$5 \cdot 10^6$	250	10	500	–	750	–	1000	–
	$2 \cdot 10^6$	100	4	200	8	300	12	400	–
	10^6	50	2	100	4	150	6	200	8
	$5 \cdot 10^5$	25	1	50	2	75	3	100	4
$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	500	–	1000	–	1500	–	2000	–
	$2 \cdot 10^6$	200	8	400	–	600	–	800	–
	10^6	100	4	200	8	300	12	400	–
	$5 \cdot 10^5$	50	2	100	4	150	6	200	8
	$2{,}5 \cdot 10^5$	25	1	50	2	75	3	100	4
10^7	10^6	500	–	1000		1500	–	2000	–
	$5 \cdot 10^5$	250	10	500	–	750	–	1000	–
	$2{,}5 \cdot 10^5$	125	5	250	10	375	–	500	–
	10^5	50	2	100	4	150	6	200	8
10^6	10^5	500	–	1000	–	1500	–	2000	–
	$5 \cdot 10^4$	250	10	500	–	750	–	1000	–
	$2{,}5 \cdot 10^4$	125	5	250	10	375	–	500	–
	10^4	50	2	100	4	150	6	200	8
10^5	$2 \cdot 10^3$	100	4	200	8	300	–	400	–
	10^3	50	2	100	4	150	6	200	8
	$5 \cdot 10^2$	25	1	50	1	75	3	100	4
10^4	$5 \cdot 10^2$	250	10	500	–	750	–	1000	–
	$2 \cdot 10^2$	100	4	200	8	300	–	400	–
	10^2	50	2	100	4	150	6	200	8

Приложение 1
(вариант 2)

Объем исходной суспензии, вносимый в пробу для получения необходимой концентрации микробных клеток

Исходная суспензия (м. к./мл)	Объем пробы (мл)	Требуемая концентрация (м. к./мл)							
		10^8	10^7	$5{,}0 \cdot 10^6$	$2{,}0 \cdot 10^6$	10^6	$5{,}0 \cdot 10^5$	$2{,}5 \cdot 10^5$	10^5
		Объем исходной суспензии (мкл), вносимый в пробу							
10^9	5	500	50	25	10	5			
	10	1000	100	50	20	10			
	15	1500	150	75	30	15			
	20	2000	200	100	40	20			
$5 \cdot 10^8$	5		100	50	20	10	5		
	10		200	100	40	20	10		
	15		300	150	60	30	15		
	20		400	200	80	40	20		
10^8	5		500	250	100	50	25	13	5
	10		1000	500	200	100	50	25	10
	15		1500	750	300	150	75	38	15
	20		2000	1000	400	200	100	50	20
$5 \cdot 10^7$	5			500	200	100	50	25	10
	10			1000	400	200	100	50	20
	15			1500	600	300	150	75	30
	20			2000	800	400	200	100	40
10^7	5					500	250	125	50
	10					1000	500	250	100
	15					1500	750	375	150
	20					2000	100	500	200

Продолжение прилож. 1.2

Исходная суспензия (м. к./мл)	Объем пробы (мл)	Требуемая концентрация (м. к./мл)								
		10^5	$5{,}0 \cdot 10^4$	$2{,}5 \cdot 10^4$	10^4	$2{,}0 \cdot 10^3$	10^3	$5{,}0 \cdot 10^2$	$2{,}0 \cdot 10^2$	10^2
		Объем исходной суспензии (мкл), вносимый в пробу								
10^6	5	500	250	125	50	10	5			
	10	1000	500	250	100	20	10			
	15	1500	750	375	150	30	15			
	20	2000	1000	500	200	40	20			
10^5	5				500	100	50	25	10	5
	10				1000	200	100	50	20	10
	15				1500	300	150	75	30	15
	20				2000	400	200	100	40	20
10^4	5						500	250	100	50
	10						1000	500	200	100
	15						1500	750	300	150
	20						2000	1000	400	200

Приложение 2

Форма А-1

Направление материала для специфической индикации поражающих биологических агентов

1. Куда направляются пробы _____
2. Район взятия проб _____
3. Время взятия проб: дата _____ часы _____ минуты _____
4. Общее количество проб – шестнадцать на индикацию неизвестного ПБА
5. Материал, объем (вес) и место взятия каждой пробы (по №№):

Номер пробы	Наименование пробы	Материал	Объем (мл) вес (гр)
	Смыв с поверхности	жидкость	5
	Фураж	зерно	2
	Смыв с судна	жидкость	5
	Смыв с поверхности	жидкость	5
	Пунктат бубона	жидкость	1
	Смыв с носоглотки	жидкость	5
	Смыв с носоглотки	жидкость	5
	Воздух	жидкость	5
	Фураж	зерно	2
	Соскоб с кожи	жидкость	5
	Соскоб с кожи	жидкость	5
	Смыв с поверхности	жидкость	5
	Смыв с поверхности	жидкость	5
	Смыв с носоглотки	жидкость	5
	Смыв с поверхности	жидкость	5
	Подстилочный материал	солома	2

Предполагаемый способ, время (дата, часы) и имеющиеся признаки применения противником ПБА

7. Метеоусловия при отборе проб _____
(примерная температура, сила ветра

_____
и направление, характер погоды: солнце, туман, пасмурно, дождь)

8. Должность, фамилия лица, проводившего отбор проб

Дата _____ Подпись _____

Примечание: *указать для воды источник, для продуктов – место изъятия и характер тары, для смывов – с какого объекта они сделаны.*

Приложение 3

Перечень некоторых вакцин и диагностических препаратов, используемых в качестве имитаторов ПБА

Вакцины						
№ п/п	Наименование вакцинного препарата	Объем фасовки в мл	Способ применения	Концентрация микробных клеток в 1 дозе	Производители	Направления исследования
1	Чумная живая сухая из штамма EV	2,0	подкожный накожный	$(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^8$ $(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^9$	НИИЭМ МО, г. Киров НПО «Пульс» (Ставропольский НИПЧИ)	Экспрессное Ускоренное
2	Сибиреязвенная живая сухая из штамма СТИ	2,0	подкожный	$(5,0 \pm 1,0) \cdot 10^6$	НИИЭМ МО, г. Киров	Экспрессное Ускоренное
3	Бруцеллезная живая сухая из штамма Br. abortus 19 BA	1,0	подкожный	$(4 \pm 0,6) \cdot 10^8$	Предприятие по производству бакпрепаратов, г. Омск	Экспрессное Ускоренное
4	Туляремийная живая сухая	1,0	накожный	$(2 \pm 0,5) \cdot 10^8$	Предприятие по производству бакпрепаратов, Омск	Экспрессное Ускоренное
5	Холерная Эль-Тор инактивированная	1,0 2,0	подкожный	$8 \cdot 10^{10}$ $1,6 \cdot 10^{11}$	Иркутский НИПЧИ	Экспрессное
6	Оспенная живая сухая – осповакцина	2,0 (20 доз)	накожный	10^6 ООЕ	НПО «Вирион», г. Томск	Ускоренное
7	Сыпнотифозная Е комбинированная сухая: • живая • после инактивации при 56 ° 30 мин	5,0 (20 доз)	подкожный	X	НПО «Биомед», г. Пермь	Экспрессное Ускоренное Экспрессное

Диагностические препараты					
№ п/п	Наименование	Объем фасовки в мл	Концентрация микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности 10 ед.	Производители	Направления исследования
8	Взвесь микробных клеток возбудителей сапа жидкая инактивированная	1,0	$1 \cdot 10^9$	Волгоградский НИПЧИ	Экспрессное
9	Взвесь микробных клеток возбудителей мелиоидоза жидкая инактивированная	1,0	$1 \cdot 10^9$	Волгоградский НИПЧИ	Экспрессное
10	Взвесь микробны. клеток возбудителей кокцидиоидомикоза жидкая инактивированная	1,0	$1 \cdot 10^9$	Волгоградский НИПЧИ	Экспрессное
11	Взвесь микробных клеток возбудителей гистоплазмоза жидкая инактивированная	1,0	$1 \cdot 10^9$—$5 \cdot 10^9$	Волгоградский НИПЧИ	Экспрессное
12	Диагностикум риккетсий Провачека сухой для РНГА	0,5	X	НПО «Биомед», г. Пермь	Экспрессное
13	Диагностикум риккетсий Провачека корпускулярный сухой для РА	0,5	X	НПО «Биомед», г. Пермь	Экспрессное
14	Диагностикум риккетсиозный Провачека сухой для РСК	0,5	X	НПО «Биомед», г. Пермь	Экспрессное
15	Диагностикум риккетсиозный Сибирика сухой для РСК	1,0	X	НПО «Биомед», г. Пермь	Экспрессное
Токсины					
№ п/п	Наименование	Объем фасовки в мл	Концентрация в ампуле	Производители	Направления исследования
16	Ботулинический токсин типа С	0,1	2000 DLM	НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи (по заказу)	Экспрессное Биологическое

Примечание: *препараты №№ 8, 9, 10, 11 и 16 не имеют в настоящий момент государственной регистрации и в зависимости от целей проверки могут применяться в качестве имитаторов по усмотрению лаборатории, подготавливающей пробы. Обращение с препаратами №№ 6 и 8 требуют строгого соблюдения мер личной безопасности.*

Приложение 4

Образец протокола внесения биологических агентов в пробы №№ 1—24 (протокол 1)

№ ПБА	Патогенный биологический агент (ПБА)		Внесено в пробу объемом 5 мл		Кол-во БА в 1 мл пробы до усреднения	Кол-во БА в 1 мл после усреднения пробы до 20 мл	Кол-во БА в 0,1 мл (посев на плотные среды)	Номера проб, в которые внесены биологические агенты
	Наименование	Исходное количество	Объем (мкл)	Количество				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	V. cholerae O1 нетоксигенный	$2 \cdot 10^8$ м. к./мл	100	$2 \cdot 10^7$ м. к.	$4 \cdot 10^6$ м. к.	10^6 м. к.	X	3, 22
2	V. cholerae O1 нетоксигенный	10^8 м. к./мл	50	$5 \cdot 10^6$ м. к.	10^6 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	X	в №№ 1—24 не внесено
3	B. mallei	10^8 м. к./мл	100	10^7 м. к.	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	X	1; 19
4	B. pseudomallei	10^8 м. к./мл	50	$5 \cdot 10^6$ м. к.	10^6 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	X	20
5	C. immitis	10^9 м. к./мл	200	$2 \cdot 10^8$ м. к.	$4 \cdot 10^7$ м. к.	10^7 м. к.	X	12
6	H. capsulatum	10^9 м. к./мл	200	$2 \cdot 10^8$ м. к.	$4 \cdot 10^7$ м. к.	10^7 м. к.	X	в №№ 1—24 нет
7	Ботулинический токсин	400 dlm/мл	1000	400 dlm		20 dlm	X	7
8	R. prowazekii – диагностикум для РСК (сухой)	24 АЕ в ампуле (6 мл)	6000 (1амп)	24 АЕ	X	1,0—1,2 АЕ	X	14
9	R.prowazekii–диагностикум для РА	Количество, эмпирически выбранное и рассчитанное в соответствии с п. 6.3						14
10	E. coli	10^5	50	$5 \cdot 10^3$ м. к.	10^3 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^2$ м. к.	25 м. к.	2, 5, 6, 18
11	E. coli	10^6	50	$5 \cdot 10^4$ м. к.	10^4 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^3$ м. к.	250 м. к.	3, 9, 13, 16, 19
12	St. epidermidis	10^5	50	$5 \cdot 10^3$ м. к.	10^3 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^2$ м. к.	25 м. к.	1, 10, 20, 22, 23
13	St. aureus	10^6	50	$5 \cdot 10^4$ м. к.	10^4 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^3$ м. к.	250 м. к.	4, 7, 14, 21
14	Bac. cereus	10^5	50	$5 \cdot 10^3$ м. к.	10^3 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^2$ м. к.	25 м. к.	8, 12, 17
15	Bac. cereus	10^6	50	$5 \cdot 10^4$ м. к.	10^4 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^3$ м. к.	250 м. к.	2, 11, 21, 24
16	V. cholerae не O1	$2 \cdot 10^7$ м. к./мл	100	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$4 \cdot 10^5$ м. к.	10^5 м. к.	10^4 м. к.	3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
17	Осповакцина	10^5 ООЕ./мл	200	$2 \cdot 10^4$ ООЕ	$4 \cdot 10^3$ ООЕ	10^3 ООЕ.	–	13
18	Осповакцина	10^7 ООЕ./мл	200	$2 \cdot 10^6$ ООЕ	$4 \cdot 10^5$ ООЕ	10^5 ООЕ.	–	14
19	Осповакцина	10^6 ООЕ./мл	200	$2 \cdot 10^5$ ООЕ	$4 \cdot 10^4$ ООЕ	10^4 ООЕ.	–	в №№ 1—24 нет
20	Br. abortus штамм 19 ВА	10^8 м. к./мл	50	$5 \cdot 10^6$ м. к.	10^6 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	$2{,}5 \cdot 10^4$ м. к.	16
21	Br. abortus штамм 19 ВА	10^9 м. к./мл	25	$2{,}5 \cdot 10^7$ м. к.	$5 \cdot 10^6$ м. к.	10^6 м. к.	10^5 м. к.	8
22	Fr. tularensis	10^8 м. к./мл	500	$5 \cdot 10^7$ м. к.	10^7 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^6$ м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	17
23	Fr. tularensis	10^8 м. к./мл	100	10^7 м. к.	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	5, 18
24	Fr. tularensis – после подращивания	10^7 м. к./мл	100	10^6 м. к.	$2 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	$5 \cdot 10^3$ м. к.	6, 15
25	Y. pestis штамм EV (после подращивания)	10^8 м. к./мл	100	10^7 м. к.	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	4
26	Bac. anthracis штамм СТИ вегетативная форма	$5 \cdot 10^6$ м. к./мл	50	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	10^4 м. к.	10^3 м. к.	в № № 1—24 не внесено
27	Bac. anthracis штамм СТИ вегетативная форма	10^7 м. к./мл	100	10^6 м. к.	$2 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	$5 \cdot 10^3$ м. к.	11
28	Bac. anthracis штамм СТИ вегетативная форма	10^8 м. к./мл	100	10^7 м. к.	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	10, 24
29	Bac. anthracis штамм СТИ споровая форма	10^8 м. к./мл	100	10^7 м. к.	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	9, 23

Пробы в количестве 24 приготовлены в соответствии с МУ 4.2.1103—02 «Приготовление проб с имиторами патогенных биологических агентов», утвержденными Минздравом России 27.01.02.

Дата приготовления «...» 20... г. в ...час. Ответственный за приготовление _____ тел._____

Приложение 5

Образец протокола внесения биологических агентов в пробы (протокол 2)

(Указаны те же номера ПБА, что в графе 1 протокола 1)

Учреждение, лаборатория	Наименование пробы	Материал	Объем (мл) Вес (гр)	Номер пробы		Номера биологических агентов															
				При изготовлении	После шифрования	V. cholerae O1 (неток-ный)	B. mallei	B. pseudomallei	C. immitis	H. capsulatum	Ботулотоксин	R.prowazekii	E. coli	St. epidermidis	St. aureus	Bac. cereus	V. cholerae не O1	Осповакцина	Br. abortus 19 BA	Fr. tularensis	Y. pestis штамм EV	Bac. anthracis штамм СТИ вегетативный
ЦГСЭН в _____	Смыв с поверхности	жидкость	5	1			3							12								
	Фураж	зерно	2	2									10			15						
	Смыв с судна	жидкость	5	3		1							11				16					
	Смыв с поверхности	жидкость	5	4											13						25	
	Пунктат бубона	жидкость	1	5									10							23		
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	6									10							24		
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	7							7				13							
	Воздух	жидкость	5	8												14			21			
	Фураж	зерно	2	9									11									29
	Соскоб с кожи	жидкость	5	10										12								28
	Соскоб с кожи	жидкость	5	11												15						27
	Смыв с поверхности	жидкость	5	12					5							14						
	Смыв с поверхности	жидкость	5	13									11					17				
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	14								89			13			18				
	Смыв с поверхности	жидкость	5	15																24		
	Подстилочный материал	солома	2	16									11						20			
Ветеринарная лаборатория	Воздух	жидкость	5	17												14				22		
	Смыв с поверхности	жидкость	5	18									10							23		
	Воздух	жидкость	5	19			3						11									
	Смыв с туши	жидкость	5	20				4						12								
	Смыв с поверхности	жидкость	5	21											13	15						
	Смыв с поверхности	жидкость	5	22		1								12								
	Фураж	зерно	2	23										12								29
	Смыв с туши	жидкость	5	24												15						28

Образец протокола внесения биологических агентов в пробы (протокол 3)

Учреждение, лаборатория	Наименование пробы	Материал	Объем (мл) Вес (гр)	Номер пробы		Результат специфической индикации				
						ожидаемый		фактически полученный		
				при изготовлении	после шифрования	ПБА	время первого ответа (часы)	ПБА обнаружен в течение (часов)	ПБА не обнаружен	обнаружен дополнительный агент (наименование)
ЦГСЭН в _____	Смыв с поверхности	жидкость	5	1		*B. mallei*	8			
	Фураж	зерно	2	2		ПБА не обнаружены	-			
	Смыв с судна	жидкость	5	3		*V. cholerae*	8			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	4		Y. pestis EV	8			
	Пунктат бубона	жидкость	1	5		Fr. tularensis	8			
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	6		Fr. tularensis	24			
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	7		Ботулинический токсин	48			
	Воздух	жидкость	5	8		Br. abortus	8			
	Фураж	зерно	2	9		Bac. anthracis СТИ	8			
	Соскоб с кожи	жидкость	5	10		Bac. anthracis СТИ	24			
	Соскоб с кожи	жидкость	5	11		Bac. anthracis СТИ	24			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	12		*C. immitis*	8			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	13		осповакцина	72			
	Смыв с носоглотки	жидкость	5	14		осповакцина R. prowazekii	24 8			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	15		Fr. tularensis	24			
	Подстилочный материал	солома	2	16		Br. abortus 19 BA	8			
Ветеринарная лаборатория	Воздух	жидкость	5	17		Fr. tularensis	8			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	18		Fr. tularensis	8			
	Воздух	жидкость	5	19		*B. mallei*	8			
	Смыв с туши	жидкость	5	20		B. pseudomallei	8			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	21		ПБА не обнаружены	–			
	Смыв с поверхности	жидкость	5	22		*V. cholerae*	8			
	Фураж	зерно	2	23		Bac. anthracis СТИ	8			
	Смыв с туши	жидкость	5	24		Bac. anthracis СТИ	24			

Посредник _____ Дата _____

Приложение 7

Образец журнала выборочного контроля приготовленных проб

№ пробы*	Дата		Наименование биоагентов	Расчетное количество БА			Результат контроля через					
				в 1 мл пробы		в посеве на питательную среду, культуру тканей и т д.	6—8 часов			24 часа	48 часов	72 часа
	приготовления проб	проведения контроля		до усреднения	после усреднения		МФА	РПГА	ИФА			
16	08.02	09.02	E. coli	10^4 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^3$ м к.	250 м. к.	X	X	X	32 колонии	–	–
			Br abortus 19 BA	10^6 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м к.	$2{,}5 \cdot 10^4$ м. к.	2—4 в поле зрения	X	X	густой рост мелких колоний	типичный рост	–
20	08.02	09.02	B pseudomallei	10^6 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^5$ м. к.	X	то же	++++	–	X	X	X
			St. epidermidis	10^3 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^2$ м. к.	25 м. к.	X	X	X	6 колоний	–	–
24	08.02	09.02	Bac. cereus	10^4 м. к.	$2{,}5 \cdot 10^3$ м. к.	250 м. к.	X	X	X	единичные колонии	–	–
			Bac. anthracis (вегетативная форма)	$2 \cdot 10^6$ м. к.	$5 \cdot 10^5$ м. к.	$5 \cdot 10^4$ м. к.	1—2 цепочки в поле зрения	++++	положительный	густой рост	–	–

* указан тот же состав проб, что и в прилож. 5.

gost.e-ecolog.ru