"МУК 4.2.2029-05. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-вирусологический контроль водных объектов. Методические указания"

(утв. Роспотребнадзором 18.11.2005)

www.bdmt.ru

Утверждаю
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей
и благополучия человека,
Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации
Г.Г.ОНИЩЕНКО
18 ноября 2005 года

Дата введения -
с момента утверждения

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4.2.2029-05**

www.bdmt.ru

1. Разработаны: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН (А.Е. Недачин, Р.А. Дмитриева, Т.В. Доскина, Д.В. Лаврова, А.Г. Санамян); ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (О.Е. Иванова, Т.П. Еремеева); ГУ Центральный НИИ эпидемиологии (Г.А. Шипулин, В.П. Чуланов, Е.Н. Родионова, А.Т. Подколзин); ГУ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (В.В. Малышев, М.А. Бичурина, Н.В. Железнова); Санкт-Петербургской Военно-медицинской академией им. С.М. Кирова (П.И. Огарков); Белорусским НИИ эпидемиологии и микробиологии (Т.В. Амвросьева).

В подготовке материалов принимали участие: ФГУЗ "Федеральный центр гигиены и эпидемиологии" Роспотребнадзора (Т.В. Воронцова); Аналитический Центр ЗАО "РОСА" (В.Б. Конторович); Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной (К.В. Блохин, М.И. Попкова); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве" (С.Г. Курибко, Г.М. Бабкина); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области" (И.Р. Лесников); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области" (О.Т. Агеева); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области" (В.О. Скворцов); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии во Владимирской области" (Н.И. Джакаридзе); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области" (Э.В. Маликова); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области" (Е.И. Косолапова); Территориальное управление Роспотребнадзора по Липецкой области (И.А. Ходякова); ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в г. Ростове-на-Дону" (Т.А. Зыкова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 6 октября 2005 года (протокол N 3).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 ноября 2005 года.

В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеются в виду Методические рекомендации от 7 апреля 1981 года, а не от 7 июня 1982 года.

---

4. С момента введения в действие методических указаний считать утратившими силу пункты 1.1 - 1.3; 3.1.1 - 3.1.3; 3.2; 4 методических рекомендаций "Методические рекомендации по санитарно-вирусологическому контролю объектов окружающей среды", утвержденных Начальником Главного Управления карантинных инфекций В.П. Сергиевым 7 июня 1982 года.

1. Область применения

1.1. Методические указания устанавливают методы санитарно-вирусологического контроля качества воды различного вида водопользования и степени загрязнения в отношении ее эпидемической безопасности по санитарно-вирусологическим показателям, регламентируемым СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества"; СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод"; СанПиН 2.1.4.1175-02 "Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников"; СанПиН 2.1.2.1188-03 "Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества"; СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества".

1.2. Методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за качеством питьевой воды, состоянием водоемов в местах водопользования населения, использованием сточных вод в системах промышленного оборотного водоснабжения и для орошения сельскохозяйственных угодий.

1.3. Методические указания также могут использоваться организациями, эксплуатирующими системы централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, системы канализования и осуществляющими производственный контроль.

2. Гигиенические и эпидемиологические показания к проведению санитарно-вирусологического контроля качества водных объектов

2.1. Виды санитарно-вирусологического контроля

В системе государственного санитарно-эпидемиологического надзора за загрязнением кишечными вирусами водных объектов используют следующие виды санитарно-вирусологического контроля:

- плановый;
- внеплановый;
- производственный.

Плановый санитарно-вирусологический контроль осуществляют в течение года в соответствии с разработанной программой для каждой системы водоснабжения на конкретной территории, согласованной с территориальными органами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В рабочую программу включают перечень контролируемых объектов, показателей, периодичность проведения исследований, перечень используемых методов, план точек отбора проб воды, количество контролируемых проб воды. При этом необходимо учитывать, что предварительную оценку возможного вирусного загрязнения водных объектов осуществляют с использованием косвенных показателей вирусного загрязнения - общей группы колифагов, а также обнаружением антигенов ротавирусов и (или) антигена ВГА методом ИФА.

При обнаружении колифагов либо вирусных антигенов (ВГА, ротавирусов) в исследуемых пробах необходимо исследовать воду на наличие энтеровирусов, а также РНК энтеровирусов, РВ и ВГА методом ОТ-ПЦР.

Внеплановый санитарно-вирусологический контроль предусматривает проведение исследований воды на наличие колифагов, антигенов ротавирусов и ВГА и энтеровирусов в случае внезапных или непредвиденных изменений санитарно-эпидемической ситуации на контролируемой территории:

- каких-либо аварий или нарушений в системах водоснабжения и канализации, в результате которых может произойти массивное микробное загрязнение поверхностных и подземных водоисточников, а также питьевой воды. В этот период все работы заинтересованных организаций, включая и санитарно-вирусологический контроль, координирует Чрезвычайная противоэпидемическая комиссия города, района, субъекта Российской Федерации;
- по санитарно-эпидемиологическим показаниям контроль осуществляют в случае наличия факторов-предшественников в санитарно-эпидемиологической ситуации на территории и последующего подъема заболеваемости населения кишечными вирусными инфекциями, которая превышает уровень круглогодичной заболеваемости, характерной для конкретной местности.

Санитарно-вирусологический контроль в период эпидемического риска предусматривает более

www.bdmt.ru

частые исследования по сравнению с установленными в программе текущего контроля, его утверждает главный государственный санитарный врач города, района, субъекта Российской Федерации либо его проводят по решению Чрезвычайной противоэпидемической комиссии города, района, субъекта Российской Федерации.

Производственный санитарно-вирусологический контроль проводят постоянно, он предусматривает исследования воды водных объектов в организациях водоснабжения: на этапах водоподготовки, выходе с водоочистных сооружений (после обеззараживания), в разводящей сети; в организациях по производству воды, расфасованной в емкости; при выборе водоисточника; при оценке эффективности работы обеззараживающих установок, режима их работы; при превышении нормативов уровня колифагов либо при обнаружении антигенов ВГА и (или) ротавирусов.

Определение энтеровирусов и (или) РНК РВ и ВГА проводят в санитарно-вирусологических лабораториях, обеспечивающих деятельность государственного санитарно-эпидемиологического надзора, профильных учреждений и других организаций, имеющих разрешение на данный вид деятельности в установленном законодательством Российской Федерации порядке.

2.2. Объекты исследования

Объектами исследования является вода различных водных объектов:

- сточная;
- сточная на этапах очистки и обеззараживания;
- пресных и морских поверхностных водоемов, используемых в рекреационных целях, а также в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения;
- плавательных бассейнов;
- подземных водоисточников;
- питьевая (водопроводная; вода, расфасованная в емкости и др.);
- из децентрализованных водоисточников.

2.2.1. Сточные воды.

Сточные воды, поступающие на очистные сооружения, исследуют с целью изучения спектра энтеровирусов, циркулирующих среди населения, и по эпидемическим показаниям.

Сточные воды на этапах очистки и обеззараживания исследуют для изучения эффективности работы очистных сооружений в отношении возбудителей кишечных вирусных инфекций в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод".

2.2.2. Вода поверхностных водоемов.

Воду пресных водоемов исследуют на наличие вирусного загрязнения с целью изучения процессов самоочищения, при выборе поверхностных водоемов в качестве водоисточников для централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, установления зон санитарной охраны, по эпидемическим показаниям.

Контроль воды морских и пресных водоемов за уровнем загрязнения осуществляют при использовании их в рекреационных целях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод", по эпидемическим показаниям.

2.2.3. Вода подземных водоисточников.

Воду подземных водоисточников исследуют на наличие вирусного загрязнения при выборе источника хозяйственно-питьевого водоснабжения, контроле ее качества в соответствии с ГОСТ 2761-84 "Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения", по эпидемическим показаниям.

2.2.4. Вода плавательных бассейнов и аквапарков.

Контроль за уровнем вирусного загрязнения воды плавательных бассейнов проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.2.1188-03 "Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества", СанПиН 2.1.2.1331-03 "Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству вод аквапарков", по эпидемическим показаниям.

2.2.5. Вода питьевая.

Питьевую воду исследуют на наличие вирусного загрязнения в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества",

www.bdmt.ru

СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества", в соответствии с программой исследования воды, утвержденной главным государственным санитарным врачом города, района, субъекта Российской Федерации, по эпидемическим показаниям.

2.2.6. Контроль воды децентрализованных источников.

Исследование воды децентрализованных источников проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами СанПиН 2.1.4.1175-02 "Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана водоисточников", по эпидемическим показаниям.

2.3. Санитарно-вирусологические показатели качества водных объектов

Санитарно-вирусологический контроль воды водных объектов предусматривает исследования по следующим показателям:

- кишечные вирусы (энтеровирусы и аденовирусы в культурах ткани);
- антигены ротавирусов и вируса гепатита А в качестве маркеров вирусного загрязнения;
- РНК вирусов гепатита А, ротавирусов, энтеровирусов и ДНК аденовирусов методом полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) для РНК-содержащих вирусов;
- колифаги (исследования проводят бактериологические лаборатории) в качестве косвенных показателей вирусного загрязнения вод различного назначения в соответствии с нормативными и методическими документами.

Выбор показателей осуществляют в соответствии с нормативными и методическими документами или по рекомендациям эпидемиолога.

2.4. Оценка эпидемической безопасности водных объектов

Вода водных объектов и питьевая вода подлежат обязательному санитарно-вирусологическому контролю.

Основным принципом регламентирования вирусного загрязнения воды на настоящем этапе является отсутствие возбудителей кишечных вирусных инфекций в нормируемом объеме воды водных объектов и питьевой воде.

Критерием эпидемической безопасности воды водных объектов является отсутствие спорадической и вспышечной заболеваемости населения, обусловленной кишечными вирусами, распространяющимися водным путем.

Санитарно-вирусологический контроль воды осуществляют в соответствии с положениями раздела 2 с использованием санитарно-показательных микроорганизмов - колифагов, косвенных показателей вирусного загрязнения, что является экономичным и дает быстрый ответ о потенциальной эпидемической опасности водных объектов в отношении вирусного загрязнения и риска заболевания населения вирусными кишечными антропонозами.

В соответствии с результатами исследований воды на колифаги проводят обязательное прямое определение энтеровирусов и аденовирусов с использованием "культуральных" методов.

Для выявления в пробах воды труднокультивируемых в клеточных культурах вирусов (вирус гепатита А, ротавирусы) проводят анализ воды на наличие их антигенов с использованием методов ИФА, или ОТ-ПЦР - на наличие РНК вирусов. Положительный результат анализа пробы воды в ИФА после обеззараживания хлором или озоном, содержащей только антиген или РНК определенного вируса, оценивают как ориентировочный, свидетельствующий о циркуляции данного возбудителя на изучаемой территории и возможного водного пути передачи в реализации эпидемического процесса данной инфекции.

Наличие в анализируемой пробе помимо антигена или РНК вируса других форм микроорганизмов (общее микробное число - ОМЧ, колиформных бактерий, колифагов) свидетельствует о вирусном загрязнении воды.

Подтверждением этому является развитие соответствующей эпидемической ситуации на изучаемой территории, а также гомологичность РНК вирусов, выделенных из воды и из материалов от больных.

Для получения информации о степени гомологии штаммов вирусов, выделенных из воды и из материалов от больных на исследуемой территории, проводят ПЦР-амплификацию вариабельного фрагмента генома вируса с последующим секвенированием. Полная гомология данных фрагментов генома свидетельствует в пользу водного пути распространения возбудителя, тогда как наличие генетических отличий исключает роль водного фактора в возникновении данной эпидемической вспышки (эти

www.bsnt.ru

исследования выполняют в специализированных лабораториях, имеющих разрешение на данный вид деятельности в установленном законодательством Российской Федерации порядке).

3. Основные материалы, оборудование, питательные среды

Автоклав (паровой стерилизатор)	ГОСТ 19569
Вытяжной шкаф	
Ламинарный шкаф для культуры клеток (класс I)	
Ламинарный шкаф (класс II)	
Инвертированный микроскоп	
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104
pH-метр любой марки с набором электродов с погрешностью измерений +/- 0,1	
Термометры, 0 - 100 °C, цена деления 1 °C	ГОСТ 28498
Дистиллятор электрический ДЭ-4	
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50 °C, поддерживающие заданную температуру с погрешностью +/- 1 °C	
Центрифуга лабораторная рефрижераторная, например, типа ЦЛР-1МР	ТУ 42-2145
Ультрацентрифуга	
Встряхиватель	
Холодильники бытовые электрические с температурой в камере 4 - 6 °C	
Холодильники бытовые электрические низкотемпературные с температурой в камере -20 °C	
Морозильник с температурой в камере -70 °C	
Магнитная мешалка	
Аппарат фильтрационный, например, марки АФ-142 "Н" или марки АФ-142 "К"	
Макропористое стекло, например, марки МПС 1000 ВГХ	
Набор для концентрирования с помощью пакетов с адсорбентом	
Ионообменная смола (Анионит АВ-17-8; АВ-17-8-чс)	ГОСТ 20301-74
Набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод	
Флизелиновая ткань	
Мембрана микропористая капроновая (ММК - диаметр пор 0,2 мкм)	
Мембрана для концентрирования вирусов из воды типа ФМНЦ - 0,2 мкм или ФМПА - 0,2 мкм	
Стерилизующие насадки с фильтрами 0,22 мкм для стерилизации элюатов	
Бутыли Вульфа на 10 л	
Канистры полиэтиленовые на 5 и 10 л	
Воронки конические делительные ВД-1 - 1000 мл	
Колбы плоскодонные конические разной вместимости	ГОСТ 25336
Пипетки разной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 20292
Пробирки типов П1 и П2	ГОСТ 25336
Штативы для пробирок	
Штативы химические	
Цилиндры на 100 - 250 куб. см	ГОСТ 1770

www.bdmt.ru

Чашки Петри диаметром 90 - 100 мм	ГОСТ 25336
Посуда для культур клеток - стерильные культуральные флаконы, планшеты, пробирки, пипетки и пр.	
Твердотельный термостат для пробирок на 25 - 100 °С, например, типа "эппендорф"	
Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой	
Микроцентрифуга для пробирок до 16000 g, например, типа "эппендорф"	
Центрифуга-вортекс	
Амплификатор	
ПЦР-бокс с бактерицидной лампой	
Камера для горизонтального электрофореза	
Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей	
Одноразовые пробирки объемом 1,5; 0,5; 0,2 мл, например, типа "эппендорф"	
Автоматические пипетки объемом от 0,5 мкл до 1 мл	
Сменные одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами и без	
Иммуноферментный анализатор	
Прибор для промывки плашек	
Шейкер-термостат	
Автоматические пипетки-дозаторы различных объемов	
Биф-экстракт (мясной экстракт)	
Декстран Т40 ПЭГ 6000	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Калий фосфорнокислый однозамещенный, ч.д.а.	
Калий фосфорнокислый двузамещенный, ч.д.а.	
Магний хлористый кристаллический, ч.д.а.	
Натрий фосфорнокислый двузамещенный, ч.д.а.	
Натрий хлористый	ГОСТ 3118
Спирт этиловый ректификационный	ГОСТ 5962
Перекись водорода 33%	
Хлороформ	ГОСТ 22300
Фосфатно-солевой твинсодержащий буфер (pH 7,2)	
Раствор Версена	
Раствор трипсина 0,25%	
Среда 199 на растворе Хенкса	
Среда Игла, pH 7,2	
Среда Игла МЕМ, pH 7,2 с двойным набором аминокислот	
Стерильная эмбриональная сыворотка КРС	
Бензилпенициллат натрия	
Сульфат стрептомицина	
Перевиваемые линии клеток RD, HEP-2, BGM, L20B	
Набор диагностических сывороток для типирования полио- и энтеровирусов	
Набор для выделения РНК, например, типа "Рибозоль", "Амплисенс" и др.	
5х или 10х буфер для обратной транскрипции	
Обратная транскриптаза (вируса птичьего миелобластоза или вируса лейкемии, мышей Молони), например, типа "Амплисенс" и др.	
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (ДНТФ), например, типа "Амплисенс" и др.	
Ингибитор РНКаз	

www.bdmt.ru

Олигонуклеотиды (прямой праймер не менее 3 ОЕ/мл)
Свободная от РНКаз вода
Тест-система для определения РНК энтеровирусов
Тест-система для определения РНК вируса гепатита А
Тест-система для определения РНК ротавирусов
Тест-система для определения антигена вируса гепатита А
Тест-система для определения антигенов ротавирусов

Примечание. Могут использоваться материалы, оборудование, питательные среды, тест-системы с аналогичными характеристиками, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном законодательством порядке.

4. Общие правила отбора проб из различных водных объектов

Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или стерильные емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не оказывающих инактивирующего действия на вирусы. Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги). Емкость открывают непосредственно перед отбором, удаляя пробку вместе со стерильным колпачком. Во время отбора пробка и края емкости не должны чего-либо касаться. Ополаскивать посуду не допускается. При исследовании воды из распределительных сетей отбор проб из крана производят после его предварительной стерилизации обжиганием и последующего спуска воды не менее 10 мин. при полностью открытом кране. При отборе пробы напор воды может быть уменьшен. Пробу отбирают непосредственно из крана без резиновых шлангов, водораспределительных сеток и других насадок. Если через пробоотборный кран вода течет постоянно, отбор проб производят без предварительного обжига, не изменяя напора воды и существующей конструкции (при наличии силиконовых или резиновых шлангов).

Если отбирают пробу после обеззараживания химическими реагентами, то для нейтрализации остаточного количества хлорсодержащих дезинфектантов в емкость, предназначенную для отбора проб, вносят до стерилизации натрий серноватистокислый в виде кристаллов или концентрированного раствора из расчета 10 мг на 500 мл воды. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой и колпачком. При отборе проб в одной и той же точке для различных целей, первыми отбирают пробы для бактериологических исследований.

Отобранную пробу маркируют и сопровождают актом отбора проб воды с указанием места, даты, времени отбора и другой необходимой информации.

К исследованию проб воды необходимо приступить сразу же после доставки проб в лабораторию.

5. Методы концентрирования вирусов из воды различного назначения

В данном разделе представлены современные методы концентрирования вирусов из воды, предназначенные для качественной или количественной оценки вирусного загрязнения. Перечень методов и область применения представлены в табл. 1.

Таблица 1

ОБЪЕМ ПРОБ, УСЛОВИЯ И ПЕРИОДИЧНОСТЬ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ НА ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

N п/п	Вид водного объекта	Объем исследуемой воды, показания к проведению и кратность анализа при контроле:				Методы концентрирования
		плановом	внеплано-	внеплано-	произ-	

www.bdnt.ru

			вом - по экстренным показаниям	вом - по санитарно-эпидемическим показаниям, по согласованию с ТУ Роспотребнадзора	водственном - в соответствии с рабочей программой	
1	Чистая вода: а) питьевая	10 л - 1 раз в квартал	10 - 50 л	10 и 1000 л	10 - 50 л	Ионообменная смола. Мембранная фильтрация. Двухэтапный метод. Ловушечное устройство
	б) подземных источников	10 л - 1 раз в квартал	10 - 50 л	10 и 1000 л	10 - 50 л	
	в) плавательных бассейнов	по согласованию с ТУ Роспотребнадзора	10 - 50 л	10 и 1000 л	10 - 50 л	
2	Вода поверхностных водоемов: а) источник водоснабжения	10 л - 1 раз в квартал	10 л	10 л	10 л	Адсорбционный метод (МПС). Ионообменная смола. Мембранная фильтрация. Двухэтапный метод
	б) рекреационные воды	1 раз в месяц с мая по сентябрь				
3	Сточные воды после очистки и обеззараживания	1 л - 1 раз в месяц в контрольном створе	1 - 5 л	1 - 5 л	1 - 5 л	Двухфазный метод. Адсорбционный метод (МПС). Ионообменная смола

www.bdmt.ru

Выбор того или иного метода в практике контроля вирусного загрязнения определяют эпидемической ситуацией в регионе, задачами региональных планов по снижению заболеваемости кишечными вирусными инфекциями, уровнем оснащенности лабораторий.

Все работы, связанные с концентрированием и выделением вирусов, проводят с соблюдением правил эпидемиологической безопасности, в соответствии с нормативными документами:

санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)", санитарными правилами СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности и гельминтами".

5.1. Метод концентрирования вирусов с использованием фильтрующих мембран

5.1.1. Область применения.

Метод используют для концентрирования вирусов из питьевой воды различных видов (водопроводной, бутылированной, из родников и др.), воды подземных водоисточников, воды из бассейнов и других чистых вод. Объем исследуемой воды составляет 10 л. При необходимости объем воды может быть увеличен. Время концентрирования данным методом из 10 л составляет в среднем 1,5 - 2,5 ч. Для концентрирования используют фильтрующие мембраны из нитроцеллюлозы типа ФМНЦ, ФМПА и мембраны микропористые капроновые (ММК) или другие, равные по эффективности.

5.1.2. Подготовка мембранных фильтров.

Фильтрующие мембраны должны быть подготовлены к анализу в соответствии с указаниями организации-изготовителя (листовка-аннотация, сопровождающая фильтры). Перед исследованием фильтрующие мембраны смачивают стерильной водопроводной водой в стерильной емкости.

5.1.3. Подготовка фильтровального аппарата.

Для фильтрования исследуемой воды используют установку, например, типа АФ-142 "К" или другую с аналогичными характеристиками, которая состоит из фильтродержателя, емкости на 10 и более литров для исследуемой воды и ее последующей фильтрации и устройства, нагнетающего жидкость.

Перед фильтрацией фильтродержатель протирают ватным тампоном, смоченным спиртом ректификованным 70%, и обжигают. После охлаждения на нижнюю часть фильтродержателя кладут стерильным пинцетом влажный мембранный фильтр, предварительно смоченный в стерильной водопроводной воде. Затем фильтр прижимают верхней частью фильтродержателя и закрепляют зажимами, равномерно завинчивая последние со всех сторон.

5.1.4. Фильтрование воды.

Исследуемый объем воды наливают в напорную емкость, крышку тщательно закрепляют зажимами, включают подачу давления (1,5 - 2,0 бара), после чего воду направляют в фильтродержатель со скоростью около 100 мл/мин. и фильтруют через мембрану. При использовании для концентрирования мембран, например, типа ФМНЦ, в исследуемую воду добавляют хлористый магний до конечной концентрации 0,05 М или хлористый алюминий до конечной концентрации 0,0005 М для увеличения сорбционной способности мембраны. При использовании фильтров ММК хлористый магний не добавляют.

5.1.5. Элюция сконцентрированных вирусных частиц.

Элюцию вирусов с мембран проводят 20 мл элюента с соблюдением всех правил эпидемической безопасности (перчатки, маска, спецодежда и т.д.) в ламинарном боксе. После окончания фильтрования откручивают зажимы и снимают верхнюю часть фильтродержателя. Мембрану осторожно приподнимают за край пинцетом, стерилизованным путем обжигания и переносят в стерильную емкость, соответствующую диаметру мембраны (может быть использована тарелка, чашка Петри диаметром не менее 142 мм и др.). Затем на поверхность мембраны наносят 10 мл элюента (3% бифэкстракт на трисбуфере с pH 9,1 - 9,5) и стерильной пипеткой с целым концом проводят механический смыв (соскабливанием и струей) вируса с поверхности мембраны в течение нескольких минут. К концу манипуляции мембрана должна приобрести первоначальный вид. Полученный элюат переносят в стерильный флакон. Затем на эту же мембрану наносят второй объем (10 мл) того же элюента и проводят вторичное смывание вирусов струей с обеих сторон мембраны, и вторую часть элюата помещают в тот же флакон, что и первую. Затем pH полученного элюата доводят до 7,0 - 7,5 1 N раствором соляной кислоты.

5.1.6. Обработка проб.

Для удаления бактериальной микрофлоры элюат подвергают обработке одним из двух методов: обработкой хлороформом или фильтрацией через стерилизующие мембраны.

5.1.6.1. При использовании хлороформа его добавляют в элюат (1 мл на 10 мл элюата), интенсивно встряхивают 10 мин. и центрифугируют 10 мин. при 2000 об./мин. для разделения фаз. Водную фазу (верхнюю) аккуратно отбирают пипеткой в стерильный флакон, добавляют 100 МЕ/мл пенициллина и 10,0 мг/мл стрептомицина.

5.1.6.2. При использовании стерилизующих насадок с фильтрами 0,22 мкм элюат пробы переносят в стерильный шприц объемом 5 - 20 мл с установленной фильтрующей насадкой и поршнем шприца продавливают в стерильный флакон. Этот способ позволяет избежать использования антибиотиков,

www.bdmf.ru

токсичного хлороформа и связанных с этим мер безопасности, не требует длительного встряхивания и центрифугирования.

5.1.7. Хранение проб.

Стерильные элюаты хранят до испытания при 4 °С не более 24 ч. При температуре -20 °С их можно хранить в течение 1 года. При необходимости многократного исследования элюат делят на несколько порций, чтобы избежать повторного замораживания.

5.2. Метод концентрирования вирусов с использованием ионообменных смол

5.2.1. Область применения.

Метод рекомендуется для концентрирования вирусов из чистых вод, воды поверхностных водоемов и сточных вод. Объем проб для исследования определенного вида воды представлен в табл. 1.

5.2.2. Подготовка ионообменной смолы.

Подготовку ионообменных смол (аниониты АВ-17-8, АВ-17-8-чс) осуществляют следующим образом: сухую смолу замачивают в течение 2 - 3-х суток в дистиллированной воде. Затем воду сливают и смолу обрабатывают смесью равных объемов свежеприготовленных растворов 2% соляной кислоты и 10% хлорида натрия из расчета 1 л смеси на 100 г смолы. Продолжительность контакта 24 ч. После этого смолу отмывают дистиллированной водой до нейтрального pH 7,0.

5.2.3. Концентрирования вирусов из проб воды.

Перед концентрированием pH исследуемой пробы воды доводят до значений 5,5 - 6,0 путем добавления концентрированной соляной кислоты.

Для осуществления концентрирования стеклянную бюретку (колонку) диаметром 1,2 - 1,5 см, к нижнему концу которой присоединен резиновый шланг с завинчивающимся зажимом, устанавливают в штативе строго вертикально. На дно колонки помещают небольшой слой стекловаты для удержания смолы. В колонку вносят суспензию смолы, удаляя через нижний резиновый шланг избыток воды. Заполнение колонки следует проводить тщательно, избегая образования пузырьков воздуха в столбике смолы. Высота столбика смолы должна быть 10 - 12 см.

Емкость с пробой воды располагают выше колонок, в нее опускают стерильный резиновый шланг с битой пипеткой на конце. С другой стороны шланга должна быть резиновая пробка с отверстием для прохождения воды. Через резиновый шланг с пробкой на конце воду подают в колонку, закрывая ее пробкой. Винтовым зажимом на нижнем шланге регулируют подачу воды через смолу, создавая скорость 10 - 12 мл в минуту.

5.2.4. Элюция вирусов с ионообменной смолы

После окончания концентрирования (примерно через 16 - 18 ч, при исследовании 10 л) осуществляют элюцию вирусов со смолы 0,5 М раствором фосфатного буфера с pH 8,2. Для этого в колонку вносят 10 мл фосфатного буфера, интенсивно встряхивают и оставляют в горизонтальном положении в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем элюат переносят в стерильный флакон и доводят до pH 7,2 1 М раствором соляной кислоты.

Приготовление 0,5 М фосфатного буфера с pH 8,2.

Готовят навески солей: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - 89,0 г (раствор А) и KH_2PO_4 - 68,06 г (раствор В). Каждую навеску вносят в отдельную мерную колбу, добавляют дистиллированную воду до объема 1 л и растворяют соли. Для получения буфера с pH 8,2 смешивают 96,9 мл раствора А и 3,1 мл раствора В и одним из этих растворов доводят pH буфера до 8,2.

5.2.5. Обработка проб (см. п. 5.1.6).

5.2.6. Хранение проб (см. п. 5.1.7).

5.3. Двухэтапный метод концентрирования вирусов (сорбция на ионообменной смоле и осаждение с помощью сульфата аммония)

5.3.1. Область применения.

Метод рекомендуется для концентрирования вируса гепатита А и энтеровирусов из проб питьевой воды и воды водоисточников. Объем проб может колебаться от 10 до 50 л.

5.3.2. I этап. Концентрирование и элюция вируса гепатита А и энтеровирусов из проб воды при помощи сорбции на ионообменной смоле.

www.bdmt.ru

В качестве сорбента используют смесь, состоящую из ионообменной смолы АВ-17-8 (подготовленной в соответствии с п. 5.2.2) и гидроксида алюминия, которой заполняют стеклянную бюретку (колонку) диаметром 36 - 38 мм и длиной 250 - 300 мм. Колонка должна иметь в нижней части впаянную перегородку из пористого стекла (стеклянный фильтр Шотта N 2) и резиновый шланг, присоединенный к нижнему концу колонки. После установки колонки в штативе в нее вносят ионообменную смолу (высота столбика смолы должна составлять не менее 30 - 40 мм) и навеску гидроксида алюминия (8 - 10 г).

Исследуемую пробу воды в бутылях или канистре подкисляют с помощью соляной кислоты до pH 3,0 - 4,5, располагают выше колонки и через резиновую трубку с пробкой для колонки подают воду в колонку, регулируя скорость прохождения с помощью винта на резиновой трубке, присоединенной к нижнему концу колонки. Скорость прохождения воды через колонку должна составлять 10 - 15 мл/мин.

После прохождения исследуемой воды через колонку нижний резиновый шланг перекрывают и осуществляют элюцию вируса с адсорбента при помощи 0,05 М глицинового буфера с pH 11,5, который вносят в колонку в объеме 100 мл. Адсорбент в колонке и элюент тщательно перемешивают и выдерживают в течение 10 - 15 мин. Затем элюат удаляют из колонки через нижний резиновый шланг и с помощью глицинового буфера с pH 1,5 устанавливают pH элюата на уровне 7,0 - 8,0.

Приготовление глицинового буфера с pH 11,5.

Навеску 0,385 г аминоуксусной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды и получают глицин. К 50 мл глицина добавляют 50 мл 0,1 N раствора гидроксида натрия и получают глициновый буфер с pH 11,5.

Для приготовления глицинового буфера (pH 1,5 - 1,6) к 38 мл глицина добавляют 62 мл 0,1 N раствора соляной кислоты.

5.3.3. II этап. Вторичное концентрирование антигена и энтеровирусов - осаждение с помощью сульфата аммония.

Вторичное концентрирование (осаждение) вирусов проводят на холоде. Для этого к элюату дробно (в течение 20 - 30 мин.) добавляют 1/2 объема насыщенного раствора сульфата аммония ($(NH_4)_2SO_4$), тщательно перемешивают и оставляют на ночь. Утром смесь центрифугируют в течение 1 ч при 5 - 6 тыс. об./мин. Супернатант сливают, а осадок растворяют в 1 - 2 мл физиологического раствора с pH 7,2 - 7,4.

При необходимости концентрат делят на 2 части, одну из которых исследуют на наличие антигена ВГА, другую подвергают антибактериальной обработке в соответствии с п. 5.1.6 и используют для заражения тканевых культур с целью выделения энтеровирусов.

Приготовление насыщенного раствора сульфата аммония.

В 1 л теплой стерильной дистиллированной воды (30 - 35 °C) растворяют 800 г сульфата аммония ($(NH_4)_2SO_4$). Полученный раствор фильтруют, доводят до pH 7,2 и охлаждают в холодильнике.

5.3.4. Хранение проб (см. п. 5.1.7).

5.4. Метод концентрирования вирусов с использованием двухфазного разделения

Метод рекомендован Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) "Рекомендации по надзору за вирусом полиомиелита в окружающей среде", ВОЗ, 2003.

5.4.1. Область применения.

Метод концентрирования двухфазным разделением используют для индикации вирусов из 1 л очищенных и неочищенных сточных вод.

5.4.2. Подготовка реактивов (для 2-х проб по 1 л).

5.4.2.1. 22% декстран (по весу) - 40 г декстрана Т 40, 142 мл стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 недели при 4 °C.

5.4.2.2. 29% ПЭГ 6000 (по весу) - 363 г ПЭГ 6000 и 888 мл стерильной дистиллированной воды. Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 недели при 4 °C. Раствор можно автоклавировать (15 мин. при 45 °C).

5.4.2.3. 150 мл (примерно) 5 М NaCl.

5.4.2.4. 1 N NaOH и 1 N HCL для установки pH.

www.bdmt.ru

5.4.3. Концентрирование пробы по 0,5 л.

5.4.3.1. Пробу центрифугируют в течение 10 мин. при 1000 g. Надосадочную жидкость переносят из пробирок в колбу Эрленмейра емкостью 1 л, осадок хранят при 4 °С.

5.4.3.2. Доводят pH надосадочной жидкости до нейтрального уровня (7,0 - 7,5) 1 N раствором NaOH и измеряют конечный объем надосадочной жидкости.

5.4.3.3. К 500 мл надосадочной жидкости добавляют 39,5 мл 22% раствора декстрана, 287 мл 29% раствора ПЭГ 6000 и 35 мл 5 N раствора NaCl. Тщательно перемешивают и выдерживают 1 ч при температуре 4 °С при непрерывном встряхивании или перемешивании, используя прибор горизонтального встряхивания или магнитную мешалку.

5.4.3.4. Для каждой пробы подготавливают стерильную коническую делительную воронку и закрепляют ее в штативе. Смазывают скользящие поверхности кранов, но так, чтобы не закрыть в них отверстие. Проверяют плотность кранов небольшим количеством воды. Смесь, приготовленную по п. 5.4.3.3, переливают в воронку и оставляют на ночь при 4 °С.

5.4.3.5. Утром осторожно открывают кран воронки, медленно выпускают жидкость и собирают нижний ее слой и промежуточную фазу в стерильную пробирку (обычно 5 - 10 мл от каждой пробы объемом 0,5 л.).

5.4.3.6. В полученную жидкость (п. 5.4.3.5) вносят осадок (п. 5.4.3.1), добавляют хлороформ (20% от объема образовавшейся взвеси) и встряхивают в течение 1 мин. Центрифугируют, отбирают верхнюю водную фазу в стерильную пробирку и добавляют антибиотики (пенициллин G или отечественный аналог и стрептомицин до конечной концентрации 100 МЕ/мл и 100 мг/мл соответственно).

5.4.3.7. Помещают 1 мл полученного концентрата в холодильник с температурой -20 или -70 °С для сохранения (при необходимости дальнейшего исследования). Остаток концентрата исследуют на наличие вирусов на культурах тканей, РНК-методом ОТ-ПЦР и антигена - методом ИФА.

5.5. Метод концентрирования вирусов с помощью флизелиновых пакетов с макропористым стеклом

5.5.1. Область применения.

Метод (качественный) используют для концентрирования вирусов из воды поверхностных водоемов, сточной воды. Время концентрирования вирусов должно составлять 3 - 7 суток.

5.5.2. Подготовка макропористого стекла (МПС) <*>.

<*> Можно использовать готовые стандартные наборы, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном законодательством порядке.

Для повышения сорбционных свойств макропористого стекла, представляющего собой белый порошок, его обрабатывают следующим образом: один объем стекла заливают в колбе одним объемом смеси (1:1) 3% раствора H_2O_2 и 6 М раствора HCl и кипятят в вытяжном шкафу в течение 1 ч без пробки, соблюдая меры предосторожности. Отмывают большим количеством дистиллированной воды до нейтрального значения pH и высушивают при 100 °С.

В пакет из флизелина размером 5 x 7 см помещают 3,0 см подготовленного сорбента.

5.5.3. Концентрирование вирусов.

Пакет с сорбентом закрепляют с помощью лески за неподвижный предмет так, чтобы он оказался в токе воды. После экспозиции в течение 3 - 7 суток пакет вынимают, помещают в отдельный новый полиэтиленовый мешочек или стерильный флакон и доставляют в лабораторию в сумке-холодильнике в максимально короткий срок (не более 6 ч). Каждую пробу маркируют с указанием точки отбора, датой установки и времени экспозиции пакета. До обработки пробы можно хранить не более суток при 4 °С.

5.5.4. Элюция вирусов с МПС.

Пакет с сорбентом извлекают из транспортировочной емкости и помещают в стерильную чашку Петри. Обрезают край пакета, вымывают стекло дистиллированной водой (5 мл) с помощью пипетки в эту же чашку Петри и переносят пипеткой или через воронку в колонку объемом 5 - 10 мл. Вирусы элюируют ступенчато тремя растворами по 3 мл каждый, собирая фракции в отдельные пенициллиновые флаконы. Исследованию подвергают каждую фракцию в отдельности (всего 3 фракции). В качестве элюирующих растворов используют: 1) 0,05 М трис-HC1 pH 9,1; 2) 0,05 М трис-HCl pH 9,1 и 0,5 М NaCl; 3) 3% мясной экстракт на 0,05 М трис-HCl pH 9,1.

5.5.5. Обработка проб (см. п. 5.1.6).

www.bdmt.ru

5.5.6. Хранение проб (см. п. 5.1.7).

5.6. Метод концентрирования вирусов с использованием набора для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства.

Ловушечное устройство состоит из насадки на водопроводный кран, к которой с помощью синтетической трубки прикреплен держатель. В держатель, состоящий из двух свинчивающихся частей с резьбой, вставляется специальная ловушка, внутри которой находится адсорбент, сорбирующий вирусы из воды. Применяемая ловушка является одноразовой, а само устройство может использоваться после стерилизации многократно в соответствии с прилагаемой инструкцией.

5.6.1. Область применения.

Метод используют для концентрирования вирусов из водопроводной воды.

5.6.2. Подготовка ловушечного устройства и фильтрование воды.

Перед использованием в ловушечное устройство вставляют ловушку, после чего его заворачивают в бумагу для стерилизации и стерилизуют сухим жаром при температуре 80 °С 45 мин. Ловушечное устройство с вставленной ловушкой доставляют на место отбора в стерильной упаковке. После трехкратного обжигания водопроводного крана и спуска воды в течение 15 мин. устанавливают необходимую скорость ее протекания - 1 л за ~ 1,5 мин., что составляет 40 - 45 л/ч. Ловушечное устройство извлекают из стерильной упаковки и устанавливают его на кран. Объем пропускаемой воды должен составить 1000 л, что достигается при скорости тока воды 40 - 45 л/ч в течение 24 ч. Спустя 24 ч ловушечное устройство снимают с крана и помещают в стерильный пакет, который доставляют в вирусологическую лабораторию. После извлечения ловушки использованное ловушечное устройство подвергают обеззараживанию в 3% растворе перекиси водорода в течение 12 ч, затем многократно (не менее 10 раз) промывают в проточной воде и высушивают для последующей стерилизации и повторного использования.

5.6.3. Элюция сконцентрированных вирусных частиц.

Ловушку с адсорбентом в стерильных условиях извлекают из ловушечного устройства и помещают в чашку Петри. С помощью ножниц ловушку вскрывают, содержащийся внутри адсорбент вымывают в чашку Петри стерильной дистиллированной водой в объеме 5 - 10 мл. Полученную взвесь адсорбента в дистиллированной воде переносят с помощью пипетки с отпиленным концом в стеклянную колонку. Вытекающую из колонки воду собирают в стерильный пенициллиновый флакон. Элюцию вирусов осуществляют с помощью специального элюента, содержащегося в наборе. Для получения рабочего раствора концентрат разводят стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:10 (объем элюента/объем воды). Вирус элюируют путем пропускания 3 мл элюента через адсорбент в колонке. Полученную фракцию (элюат) собирают в стерильный пенициллиновый флакон.

Использованный адсорбент заливают 3% раствором перекиси водорода для обеззараживания на 12 ч.

С целью увеличения эффективности обнаружения вирусов в элюатах проб воды при исследовании методом ПЦР (обнаружение РНК энтеровирусов) и ИФА (обнаружение антигенов энтеровирусов) проводят дополнительное концентрирование элюатов с помощью ультрацентрифугирования либо обрабатывают элюаты полиэтиленгликолем 6000 (ПЭГ 6000).

5.6.3.1. Ультрацентрифугирование элюата.

Ультрацентрифугирование проводят при 40000 - 50000 g в течение 2 ч с использованием угловых или бакет-роторов. В стерильную центрифужную пробирку наливают вируссодержащий элюат, а затем с помощью шприца на дно пробирки наслаивают 10 - 20% раствор сахарозы так, чтобы она занимала 5 - 10% от объема пробирки. После центрифугирования супернатант удаляют. Осадок ресуспендируют в 0,5 мл стерильной дистиллированной воды для ПЦР-исследований или в фосфатно-солевом твинсодержащем буфере (pH 7,2) для ИФА.

5.6.3.2. Обработка элюата полиэтиленгликолем 6000 (ПЭГ 6000).

В элюат добавляют ПЭГ 6000 и хлористый натрий, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 М соответственно. Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 10 - 12 ч при 4 °С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 10000 g в течение 1 ч или при 6000 g в течение 2 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0,5 мл стерильной дистиллированной воды для ПЦР-исследований или в фосфатно-солевом твинсодержащем буфере (pH 7) - для ИФА.

5.6.4. Обработка проб (п. 5.1.6).

www.bdmt.ru

5.6.5. Хранение проб (п. 5.1.7).

6. Методы выделения энтеровирусов в культурах клеток

Исследование полученных элюатов на энтеровирусы проводят в культуре ткани в соответствии с документом "Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита", рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения (1998). При этом следует отметить, что для выделения вирусов используют максимально возможный полученный элюат (кроме 1 мл, заложенного на хранение, и объема, используемого для исследования в ИФА и ПЦР). Для выделения вирусов используют следующие культуры тканей: RD, Hep-2, BGM и другие чувствительные к энтеровирусам линии клеток.

Перевиваемые культуры клеток RD, Hep-2 (Cincinnatti), BGM наиболее пригодны для проведения лабораторных исследований и позволяют выделять достаточно широкий спектр энтеровирусов, которые могут присутствовать в водных объектах окружающей среды.

Культура клеток RD, происходящая из человеческой рабдомиосаркомы, обладает высокой чувствительностью к вирусам полиомиелита, многим типам вируса ECHO, некоторым вирусам Коксаки А. Вирусы полиомиелита и вирусы Коксаки В хорошо размножаются в культуре клеток Hep-2, полученной из эпидермоидной карциномы человека. Культура клеток BGM - перевиваемая культура клеток почек африканской зеленой мартышки - чувствительна к вирусам полиомиелита и вирусам Коксаки В. Использование, по крайней мере, двух культур позволяет выявлять, возможно, больший спектр вирусов, а комбинация клеток, обладающих различной чувствительностью к различным энтеровирусам, может помочь при идентификации выделенного цитопатогенного агента. Чрезвычайно полезным является поддержание и использование в лабораторных исследованиях культуры клеток L20B. Эта культура клеток создана на основе мышиной линии L-клеток, в которую экспрессированы человеческие рецепторы к полиовирусу. Она позволяет селективно выделять только полиовирусы, что делает ее незаменимой культурой при идентификации выделенных цитопатогенных агентов для разделения смесей вирусов. Чувствительность культур клеток к различным энтеровирусам представлена в табл. 2.

Таблица 2

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК
К РАЗЛИЧНЫМ ЭНТЕРОВИРУСАМ

Вирусы	Проявление цитопатогенного эффекта на культуре клеток			
	RD	Hep-2	BGM	L20B
Полиомиелита 1 - 3	+	+	+	+
ECHO	+	-	+/- +	-
Коксаки А	+/-, за исключением A1, A19, A22	-	-	+/- (Коксаки А 2 - 6, 8, 10, 14)
Коксаки В	-	+	+	-
Энтеровирусы 68 - 71	+/-	-	-	-
+ - наличие цитопатогенного эффекта; - - отсутствие его; +/- - может быть.				

Культуры клеток для лабораторного исследования следует получать из аттестованного источника, например, из лаборатории, обладающей банком клеток. Необходимо периодически контролировать чувствительность используемых в лаборатории клеток. Для этого после каждых 8 - 10 пассажей клеток на них проводят титрование референс-штаммов вакцинного вируса полиомиелита. После 15 - 20

www.bdmt.ru

последовательных пассажей следует перейти на свежую линию из банка клеточных культур или получить ее в референс-лаборатории. Эта процедура позволяет сохранять высокую чувствительность клеток и снижает риск контаминации клеток микоплазмами.

Для исследования одной пробы используют не менее двух культур клеток площадью не менее 75 кв. см. Это соответствует трем флаконам емкостью 50,0 мл (поверхность каждого флакона составляет 25 кв. см). Два из этих флаконов должны быть с культурой клеток RD, один - с любой другой из рекомендованных культур. Флаконы со свежеобразованным монослоем клеток микроскопируют для того, чтобы убедиться в здоровом состоянии клеток. Монослой клеток, подходящий для заражения, обычно формируется в течение 2 - 3 дней после "посадки" клеток на флаконы при концентрации клеток 1 x 10^6 мл ростовой среды. После замены ростовой среды на 4,5 мл поддерживающей среды (без сыворотки) флаконы маркируют (указывают номер пробы, дату заражения, номер пассажа). В каждый флакон вносят по 0,5 мл обработанной исследуемой пробы воды. Все используемые клеточные линии следует инокулировать одновременно. Обязательно оставляют по 1 незараженному контрольному флакону каждой культуры. Флаконы инкубируют в термостате при температуре 36 °С. Ежедневно, обычно в течение 5 - 7 дней, проверяют культуры на наличие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Все признаки ЦПЭ, токсичности, контаминации посторонними микроорганизмами регистрируют в лабораторном журнале. При появлении ЦПЭ (при охвате изменениями 75% клеточного монослоя) прекращают инкубацию флаконов и сохраняют культуральную жидкость при 20 °С для следующего пассажа на той же культуре клеток. Содержимое каждого флакона с культурой клеток пассируют индивидуально, флаконы никогда не объединяют. Для пассажа могут быть использованы культуры, выращенные в пробирках. Если при первичном заражении не наблюдали ЦПЭ, то делают так называемый "слепой" пассаж. Культуры, в которых не проявлялся ЦПЭ, инкубируют и наблюдают в течение не менее 14 дней. При отсутствии ЦПЭ в течение этого срока культуры отбрасывают как негативные.

www.bdmt.ru

При хорошем состоянии культуры клеток первичное заражение и один пассаж вместе составляют период наблюдения 14 дней. В ряде случаев (например, при выделении агента с низкой цитопатогенной активностью, или при наличии в пробе вируса в небольшом количестве) необходимо сделать последующие пассажи. При этом следует помнить, что каждый последующий пассаж увеличивает риск перекрестной контаминации.

При выделении вирусов из проб воды различного происхождения в культуре клеток можно столкнуться с рядом нежелательных явлений. Если при первичном заражении в культуре клеток развивается быстрая (в течение 1 - 2 дней после внесения исследуемого субстрата) дегенерация клеток, то, скорее всего, это связано с неспецифической токсичностью пробы. Такие культуры нужно заморозить при -20 °С, оттаять и выполнить пассаж. Если признаки токсичности обнаружатся вновь, то следует вернуться к исходной пробе, развести ее ФСБ 1:10 и повторить заражение. Бактериальная контаминация, которая проявляется в виде помутнения среды, приводит к гибели клеток и делает выявление вирусного ЦПЭ затруднительным или невозможным. В этом случае следует вернуться к исходной пробе, обработать ее хлороформом и повторить процедуры заражения.

Особое внимание следует уделять предупреждению перекрестной вирусной контаминации во время процедур заражения и пассирования. Нельзя сливать среду через край флакона или пробирки, в которые вносилась исследуемая проба, даже если ЦПЭ отсутствует. Удаление среды производят пипеткой, которую меняют после каждой процедуры. При заражении с помощью автоматических микропипеток используют только наконечники с фильтрами. Следует избегать процедур, при которых образуются аэрозоли (например, энергичное пипетирование); по возможности не рекомендуется использование посуды с резиновыми пробками, которые помещаются внутрь горлышка флакона или пробирки, целесообразно использовать посуду с внешней резьбой на горлышке, которая закрывается завинчивающимися крышками.

Известно, что в пробах воды присутствуют смеси вирусов, с чем могут быть связаны затруднения при идентификации выделенных изолятов. Для разделения смесей и правильной идентификации выделенных вирусов, а также для того, чтобы избежать потери вирусов полиомиелита, все изоляты, "положительные" на культуре клеток RD, следует пассировать на клетки L20B. Наличие выраженного ЦПЭ указывает на присутствие в пробе вируса полиомиелита. Некоторые реовирусы, аденовирусы, а также неполио-энтеровирусы могут проявлять ЦПЭ на клетках L20B и затруднять идентификацию выделенных изолятов и интерпретацию результатов исследования. Такие изоляты следует направить в соответствующую референс-лабораторию для заключительного исследования.

В лабораторной практике часто используют метод адсорбции исследуемого материала на клеточном монослое. При использовании этого метода из флакона/пробирки удаляют ростовую среду, ополаскивают монослой стерильным ФСБ, вносят исследуемую пробу и инкубируют флакон при температуре 36 °С в течение 1 ч. Таким образом, создают лучшие условия для адсорбции вируса клетками, если он присутствует в пробе. После истечения срока инкубации в каждый флакон/пробирку вносят необходимое количество поддерживающей среды. Применение этого метода может способствовать выявлению вируса при его незначительных количествах в исследуемом материале, а также ускорить проявление ЦПЭ, по крайней мере, на 1 сутки. Следует иметь ввиду, что при использовании этого метода, в результате дополнительных открываний крышек, во много раз возрастает вероятность контаминации (перекрестной вирусной или бактериальной). Его рекомендуется проводить в ламинарном шкафу. Ввиду высокого риска контаминации этот метод не следует использовать для пассирования или инокуляции изолятов вирусов.

7. Идентификация цитопатических агентов, выделенных в реакции нейтрализации

В основе идентификации выделенных цитопатических агентов (ЦПА) в реакции нейтрализации лежит взаимодействие исследуемого вируса с гомологичной антисывороткой (или смесью антисывороток), которая нейтрализует вирус, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток. Обычно в опыте нейтрализации вирусную суспензию, содержащую 100 $ТЦД_{50}$, смешивают с диатностическими сыворотками. После инкубации в течение 1 - 2 ч при 37 °С эту смесь соединяют с культурой клеток. Опыт ежедневно просматривают под микроскопом в течение не менее 3 дней. Иммунная сыворотка, которая предотвращает развитие ЦПЭ, указывает тип вируса.

При постановке реакции нейтрализации необходимо соблюдать несколько важнейших положений.

Для идентификации ЦПА всегда используют ту культуру клеток, на которой они были выделены. Если ЦПА был выделен в нескольких культурах клеток, то следует провести идентификацию каждого штамма. Это связано с тем, что в пробах воды могут содержаться смеси энтеровирусов, а чувствительность клеточных культур к различным энтеровирусам различна.

В опыте необходимо использовать разведение испытуемого изолята, содержащее 100 $ТЦД_{50}$. Для того чтобы определить необходимое разведение, проводят предварительное титрование выделенного ЦПА. Опытные лаборатории, использующие культуры клеток со стабильной чувствительностью, могут избежать этой процедуры. Известно, что суспензия вируса, полученная на культуре, где цитопатогенные изменения поражают 75 - 100% клеточного монослоя, содержит примерно 10^{6} $ТЦД_{50}$. Поэтому в опыте используют разведения 10^{-3} и 10^{-4}. Это экономит время исследования и материалы, необходимые для предварительного титрования. Однако контрольное титрование исследуемого изолята рекомендуется включать в каждый

www.bdmt.ru

опыт по идентификации. Это позволяет рассчитать титр вируса в условиях данного опыта.

Реакцию нейтрализации проводят в панелях для культуры клеток с плоским дном (микрометод). Микрометод позволяет экономить все компоненты, необходимые для постановки опыта, однако при недостаточном опыте возникает опасность перекрестной лабораторной контаминации.

Титрование вирусов, а также постановку реакции нейтрализации выполняют в соответствии с документом "Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита".

8. Выявление РНК кишечных вирусов (вируса гепатита А, ротавирусов, энтеровирусов) методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции

Организация и постановка полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) для выявления РНК энтеровирусов, ротавирусов и вируса гепатита А из концентратов проб воды поверхностных, подземных источников, питьевой и сточных вод может быть осуществлена в лабораториях, оснащенных необходимым оборудованием.

8.1. Меры предосторожности и правила работы при постановке полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции

Организацию работы в ПЦР-лаборатории осуществляют в соответствии с документом "Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции", утв. Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации 22 июня 1995 года.

8.1.1. Лабораторию разделяют на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики.

Следует иметь не менее двух комнат:

- пре-ПЦР-помещение, где проводят обработку образцов из объектов окружающей среды (элюаты), выделение нуклеиновых кислот, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановку ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном отдельном помещении). В этих помещениях не допускается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, другие диагностические тесты и т.д.), ПЦР-диагностику которых проводят в данной лаборатории;
- пост-ПЦР-помещение, где проводят детекцию продуктов амплификации. В пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

8.1.2. Помещение для детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) располагают как можно дальше от пре-ПЦР-помещений,

8.1.3. Работу в лаборатории организовывают в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещению.

8.1.4. При исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I - IV групп, работу проводят в соответствии с нормативно-методическими документами.

8.1.5. Используют одноразовую пластиковую посуду.

8.1.6. Работают в одноразовых перчатках.

8.1.7. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую.

8.1.8. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводят постановку ПЦР, до начала и после окончания работ обеззараживают ультрафиолетовым излучением.

8.1.9. Для работы в ПЦР-лаборатории допускается персонал, прошедший специальную подготовку.

8.2. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Все реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией подвергают специальной обработке.

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и один объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4 - 6 ч. Добавляют

www.bdmt.ru

один объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

8.3. Контроль полимеразной цепной реакции

Положительный (ПКО) и отрицательный (ОКО) контрольные образцы используют для контроля специфичности ПЦР. В качестве ПКО используют любой штамм энтеровирусов, ротавирусов и вируса гепатита А для выявления соответствующих возбудителей. В качестве ОКО используют стерильную воду, не содержащую вирусной РНК.

8.4. Выявление РНК ротавирусов и вируса гепатита А

Метод ОТ-ПЦР используют для выявления РНК вирусных агентов в исследуемых пробах воды. Исследованию подлежат элюаты проб питьевой воды, воды подземных водоисточников, речной и сточных вод. Для выделения РНК из концентратов проб питьевой воды и воды подземных водоисточников применяют метод афинной сорбции РНК на частицах силикагеля в соответствии с документом "Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции", утв. Госкомсанэпиднадзором 22 июня 1995 года (для выделения РНК рекомендуется использовать готовые комплекты, например, типа "Амплисенс" и др.).

Для выделения РНК из концентратов проб воды поверхностных водоисточников и сточных вод необходимо применять метод двустадийного выделения <*>:

- фенол-хлороформная экстракция;
- сорбция РНК на частицы силикагеля.

<*> Проводят в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1888-04 "Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами 3 - 4 группы патогенности".

8.5. Постановка реакции обратной транскрипции, проведение полимеразной цепной реакции и электрофоретический анализ продуктов полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции-амплификации (ОТ-ПЦР-амплификации)

Рекомендуется использовать ПЦР-тест-системы на вирус гепатита А и ротавирусы с электрофорезом в агарозном геле (кат. N V4-50-R0,5; V4-50-R0,2; V15-50-R0,5; 15-50-R0,2), разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном законодательством порядке.

8.6. Обнаружение энтеровирусов методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) с использованием культуры ткани для выявления репликативной "минус" нити РНК энтеровирусов

Для подтверждения инфекционности выделенных энтеровирусов проводят первичное заражение элюатом культуры клеток, через двое суток после культивирования зараженных клеток проводят ОТ-ПЦР с культуральной жидкостью при наличии ЦПД или с лизатом клеток культур тканей при отсутствии ЦПД. Суть методики состоит в выявлении с помощью ПЦР негативной минус цепи ("-" цепи) РНК энтеровирусов после их культивирования в культуре ткани. Негативная цепь является промежуточным продуктом репликации вируса, и ее обнаружение служит косвенным доказательством потенциальной инфекционности вируса.

8.6.1. Заражение культур клеток и их последующая обработка.

Для проведения ОТ-ПЦР следует использовать не менее двух культур клеток, учитывая их чувствительность к различным типам энтеровирусов. Рекомендуется использовать следующие сочетания клеточных культур: BGM и Hep-2 или Hep-2 и RD. В пробирках (пенициллиновых флаконах) с хорошо сформированным клеточным монослоем заменяют ростовую среду на поддерживающую с 1 - 2% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота и добавлением антибиотиков: пенициллина в дозе до 1000 МЕ/мл и стрептомицина в дозе до 200 мкг/мл. При культивировании клеток в инкубаторе без содержания CO_2, рекомендуется для стабилизации pH в синтетические среды добавлять Hepes (25 мМ).

Маркируют пробирки (по 2 на каждую исследуемую пробу), вносят в каждую по 0,1 мл элюата и

www.bdmt.ru

помещают в термостат (36,5 - 37,0 °С). Для контроля оставляют по несколько пробирок с незараженной культурой (со сменой и без смены среды).

Инкубируют зараженные клетки в течение 5 суток, микроскопируя их ежедневно для контроля начала цитопатического действия. При первых признаках деградации культуры (но не позднее 5-х суток) пробирки извлекают из термостата, удаляют из них культуральную среду и промывают физраствором (или раствором Хенкса). После промывки тщательно (пипеткой) удаляют из пробирок остатки промывной жидкости.

Перед началом процедуры выделения РНК пробирки с культурой ткани, освобожденной от промывной жидкости, трижды подвергают замораживанию при -20 °С и размораживанию при 37 °С, что обеспечивает выход энтеровирусов из клеток культуры, после чего переходят к выделению РНК.

8.6.2. Выделение РНК.

Выделение РНК можно осуществлять с использованием стандартных наборов в соответствии с инструкцией производителя, например, типа "Рибозоль", "Рибосорб" и др. РНК можно хранить в течение 1 месяца в изопропаноле при -20 °С. Для длительного хранения к раствору РНК добавляют два объема 70% этанола и помещают для хранения в морозильную камеру (при -70 °С).

8.6.3. Обратная транскрипция.

8.6.3.1. Праймерные последовательности.

Праймерные последовательности можно синтезировать под заказ в организациях-производителях. Для постановки ИКК-ПЦР необходимо специально синтезировать 1 энтеровирусспецифический праймер, используемый на стадии обратной транскрипции (последовательность указана в табл. 3).

Таблица 3

На каком этапе используется	Название	Последовательность
Обратная транс-крипция	НП1 (прямой)	5'-CGCCTGTTTTATACCCCCTCCCCCAA-3'

www.bdmt.ru

Праймеры, необходимые для проведения ПЦР, входят в состав готовой стандартной тест-системы.

8.6.3.2. Расчет рабочих концентраций праймеров.

Поставку праймеров производителем осуществляют в количествах, измеряющихся в оптических единицах (ОЕ) на мл. Для расчета рабочих концентраций праймеров необходимо перевести ОЕ в мкМ. Для праймера длиной А пар нуклеотидов (п.н.), поставляемом в количестве В ОЕ, пересчет осуществляют следующим образом:

- определяют молекулярную массу (ММ) одноцепочечной ДНК (оцДНК) по формуле:

$$ММ = 330 \text{ дальтон (ММ 1 п.н.)} \times А;$$

- определяют концентрацию праймера, исходя из того, что 1 ОЕ оцДНК соответствует концентрации 37 мкг/мл, соответственно В ОЕ соответствуют концентрации 37 х В мкг/мл;

- определяют концентрацию праймера С в мкМ:

$$C = (37 \times B \times 1000) / (330 \times A) \text{ (мкМ)}.$$

Ряд организаций - производителей обратной транскриптазы в инструкциях по постановке реакции обратной транскрипции указывают не концентрацию праймеров в мкМ, а количество праймера, добавляемое в реакцию (в pmol). В этом случае пересчет ОЕ в pmol следует производить по формуле:

$$D = B / (0,01 \times A),$$

где D - количество праймера (в pmol), содержащееся в 1 мкл раствора.

8.6.3.3. Постановка реакции обратной транскрипции.

Для обратной транскрипции можно использовать готовые стандартные наборы реагентов, разрешенные к применению для этих целей в Российской Федерации в установленном порядке. В состав наборов входят буферный раствор и фермент - обратная транскриптаза (ревертаза) различного

происхождения. Ингибитор РНКаз и смесь ДНТФ некоторые производители поставляют отдельно. Все компоненты реакционной смеси для обратной транскрипции можно приобретать по отдельности.

Постановка:

- в 0,2 мл (или 0,5 мл) пробирки вносят: 10,0 - 14,5 мкл РНК пробы, 10 - 20 pmol прямого праймера НП1;

- смесь аккуратно перемешивают, осаждают центрифугированием (5 с при 5000 об./мин. или с использованием вортекса) и помещают в термоциклер на 70 °С 10 мин.;

- по истечении времени нагревания пробирки достают и помещают на лед;

- в пробы добавляют: 5х или 10х буфер для обратной транскрипции (конечная концентрация - 1х), 1 мкл ДНТФ (100 - 200 мкМ), обратную транскриптазу (100 - 200 ед.), ингибитор РНКаз (20 ед.). Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Объем реакционной смеси при необходимости доводят с помощью свободной от РНКаз воды;

- смесь перемешивают, осаждают центрифугированием и выдерживают при комнатной температуре 10 - 15 мин.;

- пробирки помещают в термоциклер и выдерживают 50 мин. при 37 - 42 °С (время и температуру, необходимые для работы фермента, указывают в инструкции производителя).

После синтеза кДНК на РНК матрице пробы используют для ПЦР-амплификации.

8.6.3.4. Полимеразная цепная реакция.

Амплификацию полученной в реакции обратной транскрипции кДНК осуществляют с использованием тест-системы для амплификации участка кДНК энтеровирусов длиной 207 п.н. (кат. N V-16-100-R0,5 или кат. N V-16-100-R0,2) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

8.6.4. Анализ амплифицированной ДНК, учет результатов.

Для анализа амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез. Для постановки электрофореза можно использовать комплект стандартных реагентов для электрофореза в агарозном геле (кат. N К5-200) в соответствии с инструкцией производителя.

Учет результатов проводят визуально с помощью трансиллюминатора. При этом агарозный гель либо достают из кюветы и помещают на стекло трансиллюминатора, либо используют емкости из УФ-проницаемых материалов.

При постановке ОТ-ПЦР для выявления в пробе "минус" цепи РНК энтеровирусов, положительные образцы должны содержать полосу ДНК размером 207 п.н. Размер полосы определяют по соотношению с положительным контролем и ДНК-маркером. Результаты можно документировать посредством фотографирования или видеосъемки геля с использованием ультрафиолетовых фильтров.

8.6.5. Интерпретация результатов, полученных с использованием культур тканей методом ОТ-ПЦР.

Выявление негативной РНК ("минус" цепи РНК) энтеровирусов в пробе исследуемой воды с помощью ОТ-ПЦР зараженных культур клеток свидетельствует о присутствии в ней инфекционных энтеровирусов и интерпретируется как положительный результат молекулярного теста на инфекционность энтеровирусов.

9. Определение вирусных антигенов ротавирусов и вирусного гепатита А в иммуноферментном анализе

Элюаты, полученные после концентрирования исследуемых объемов воды, анализируют методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к готовому стандартному диагностическому набору.

10. Библиографические данные

1. Закон Российской Федерации от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".

КонсультантПлюс: примечание.

В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду Закон "Об охране окружающей среды" от 10.01.2002 N 7-ФЗ.

2. Закон Российской Федерации от 19 декабря 1991 г. N 96-ФЗ "Об охране окружающей среды".

www.bonit.ru

3. Водный кодекс Российской Федерации от 16 ноября 1995 г. N 167-ФЗ.
4. "Положение о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека", утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. N 322.
5. СанПиН 2.1.5.980-00 "Гигиенические требования к охране поверхностных вод".
6. СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества".
7. СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества".
8. СанПиН 2.1.4.1175-02 "Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников".
9. СанПиН 2.1.2.1188-03 "Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества".
10. СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)".
11. МУ 2.1.5.800-99 "Организация госсанэпиднадзора за обеззараживанием сточных вод".
12. "Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции", утверждены Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации 22 июня 1995 года.
13. МУ 1.3.1888-04 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III - IV групп патогенности".
14. "Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактерийных токсинов, ядов биологического происхождения". М., 1980.
15. ГОСТ 2761-84 "Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения".
16. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита. М., 1998.
17. Рекомендации по надзору за вирусом полиомиелита в окружающей среде. Женева, 2003.
18. Инструкция по использованию полимеразной цепной реакции для выявления энтеровирусного загрязнения воды. Минск, 2001.
19. Методики по санитарно-вирусологическому контролю питьевой воды и оценке ее эпидемической безопасности от 18.05.99 N 136-9811, Минск.
20. Инструкция по осуществлению санитарно-вирусологического мониторинга питьевых вод в Республике Беларусь от 11.11.00 N 138-0010, Минск.
21. Boom R., C.J.A. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheimvan Dillen, and J. Van der Noordaa. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. Clin. Microbiol. 28:495-503.
22. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Eds. J. Sambrook, P. MacCallum D. Russell. CSHL Press, London: 2001, 2344 p.

www.bsnt.ru

Список сокращений

БОЕ - бляшкообразующая единица;
ВГА - вирус гепатита А;
ВГА Аг - антиген вируса гепатита А;
ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения;
ИФА - иммуноферментный анализ;
МПС - макропористое стекло;
ОКВИ - острые кишечные вирусные инфекции;
ПЦР - полимеразная цепная реакция;
ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с этапом обратной транскрипции;
ПЭГ - полиэтиленгликоль;
РН - реакция нейтрализации;
РНК - рибонуклеиновая кислота;
РВ - ротавирусы;
Рота Аг - ротавирусные антигены;
ТЦД 50/мл - тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая ЦПЭ в 50% зараженных клеточных культур;
ЦПА - цитопатический агент;

ЦПЭ - цитопатический эффект;
ч.д.а. - чистый для анализа;
BGM - перевиваемые клетки почки африканской зеленой мартышки;
Hep-2 - перевиваемые клетки карциномы гортани человека;
RD - перевиваемые клетки рабдомиосаркомы человека;
L20B - перевиваемая мышиная линия L-клеток, в которую экспрессированы человеческие рецепторы к полиовирусу.

www.bdmt.ru