

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
13.06.2013
Регистрационный № 002-0213

**ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ВОДНЫМ И ПИЩЕВЫМ ПУТЯМИ ПЕРЕДАЧИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Т.В. Амвросьева, канд. биол. наук Н.В. Поклонская,
А.Н. Хило, П.И. Гринкевич, З.Ф. Богуш, О.Н. Казинец

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоклав.
2. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл.
3. Анализатор иммуноферментный или мультискан.
4. Вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз).
5. ДНК-маркер 50–1000 пар оснований.
6. Иономер (рН 121).
7. Источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
8. Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия).
9. Камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
10. Ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой.
11. Набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
12. Набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе.
13. Набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции.
14. Набор реагентов для амплификации кДНК ротавирусов.
15. Набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2 геногрупп.
16. Набор реагентов для амплификации кДНК астровирусов.
17. Набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов.
18. Набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов.
19. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой «RNAse, DNAse free» (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл).
20. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл с маркировкой «RNAse, DNAse free»).
21. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
22. Пипетки стеклянные на 1; 5; 10 мл.
23. Посуда лабораторная (колбы, пробирки).
24. Препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги).
25. Система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов).
26. Система для автоматической промывки планшетов.

27. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
28. Тест-система для выявления антигенов ротавирусов человека методом ИФА.
29. Тест-система для выявления антигенов норовирусов человека 1 и 2 геногрупп методом ИФА.
30. Тест-система для выявления антигенов астровирусов человека методом ИФА.
31. Тест-система для выявления антигенов аденовирусов 40 и 41 типов методом ИФА.
32. Тест-система для выявления антигенов энтеровирусов методом ИФА.
33. Термостат, регулируемый до $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
34. Термоциклер.
35. Твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»).
36. Трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофлуоресцентным учетом результатов).
37. Хлороформ (х ч) ТУ 2631-02-11291058-96.
38. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
39. Центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»).
40. Центрифуга-вортекс.
41. Холодильник-морозильник (-18 — -20 ; $+4$ — $+8^\circ\text{C}$).
42. Этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Задачи лабораторного контроля возбудителей вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи

Основными задачами лабораторного контроля возбудителей вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи являются:

- идентификация этиологического агента инфекции;
- идентификация источника заражения, путей и факторов передачи инфекции.

2. Планирование организации исследований

Лабораторные исследования клинического материала, проб воды и ПП на предмет выявления и идентификации вирусных патогенов проводят в плановом порядке, внепланово и в рамках производственного контроля, который осуществляют только для проб воды и ПП.

Плановые исследования проводят в течение определенного времени для получения информации о циркуляции возбудителей среди населения, включая среду его обитания, если предполагается, что эффективность эпидемиологического надзора на данной территории недостаточна (или требуются дополнительные данные) и группа населения, в отношении которой предпринимается надзор, находится в следующих условиях:

- имеются сведения о недавней циркуляции в обследуемой группе населения вируса, вызвавшего групповую или вспышечную заболеваемость;

- имеется риск заноса «новых» для данной территории высокопатогенных вирусов из других стран (территорий);

- есть необходимость в специальных исследованиях с научными целями.

Внеплановые вирусологические исследования материалов проводятся в случае непредвиденных изменений санитарно-эпидемиологической ситуации на определенной территории в условиях, когда можно предположить существование водного и/или пищевого путей передачи вирусных инфекций.

К таким условиям относятся подъем заболеваемости вирусными инфекциями с водным и пищевым путями передачи, возникновение очага групповой заболеваемости из 2 или более пациентов, при наличии информации о:

- употреблении заболевшими одних и тех же продуктов питания или питьевой воды из одного источника;

- контакте заболевших с водой из одних и тех же открытых водоемов, плавательных бассейнов и других водных объектов;

- генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных у заболевших пациентов и в пробах употребляемой воды или пищи;

- авариях или нарушениях в системах водоснабжения или канализации, в результате которых может произойти интенсивное биологическое загрязнение поверхностных и подземных водоисточников, а также питьевой воды;

- нарушениях в технологическом и производственном процессах при приготовлении ПП и воды, расфасованной в емкости.

Для плановых и внеплановых лабораторных исследований составляется план их проведения, который должен включать:

- продолжительность и сроки отбора проб;

- характеристику группы населения, в отношении которой предпринимается исследование (численность населения, состав и т. д.);

- распределение ответственности за сбор, обработку, исследование проб;

- нормативные и методические документы, материальное обеспечение для исследований, их протоколы;

- обученный персонал и контроль качества исследований;

- определение порядка отчетности о результатах исследования;

- определение возможностей для своевременной пересылки выделенных штаммов вирусов (или РНК-, ДНК-позитивных материалов) для подтверждения и дальнейшего изучения в установленном порядке.

Исследования проб воды и ПП в рамках *производственного контроля* проводятся по специально разработанной рабочей программе с целью санитарно-вирусологической оценки производственных (технологических) процессов в соответствии с действующими нормативными и инструктивно-методическими документами.

3. Объекты исследований

Объектами исследований являются:

- клинический материал (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал);

- пробы воды (питьевой, открытых водоемов, плавательных бассейнов и аквапарков, сточной);

- пробы ПП;
- вирусы (норовирусы I и II геногруппы, энтеро-, рота-, аденовирусы 40 и 41 типов, астровирусы, вирусы гепатита А).

4. Отбор проб для исследований, пробоподготовка, сортировка

4.1. Пробы клинического материала

Для идентификации этиологического агента острых кишечных инфекций (ОКИ) проводят исследования проб стула и/или рвотных масс, полученных от пациентов в течение 24–48 ч с момента появления клинических симптомов инфекции. Пробоподготовку осуществляют в соответствии с инструкцией «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» (рег. № 111-1210 от 24.12.2010, раздел 4).

При наличии у пациентов клинических симптомов энтеровирусной инфекции и соответствующих эпидемиологических данных отбор проб (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал) и их обработку проводят в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» (рег. № 133-1204 от 12.04.2005, разделы 3–5).

4.2. Пробы санитарно-вирусологического материала (ПП, вода)

Отбор проб производят в самые ранние, насколько это возможно, сроки на основании результатов предварительного эпидемиологического расследования при наличии указаний на водный/пищевой путь передачи инфекции. Их изучение чаще проводят после исследований клинического материала.

4.2.1. Пробы ПП

Вирусная контаминация продуктов питания может реализовываться 2 путями:

- через контаминированную вирусами воду (фрукты, овощи, морепродукты, молочные продукты, пищевой лед, бутилированная вода и напитки, мороженое и т. д.);
- через загрязненные руки вирусоносителя в процессе ее приготовления (салаты, бутерброды, торты, пирожные и т. д.).

При подозрении реализации пищевого пути распространения инфекций отбирают образцы именно тех продуктов, которые употребляли в пищу заболевшие. При отсутствии такой возможности отбирают образцы из той же партии ПП, контейнера и т. д.

Отбор проб ПП, их обработка для экстракции и концентрирования вирусов осуществляют в соответствии с требованиями, изложенными в инструкции по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателями» (рег. № 166-1208 от 11.06.2009, разделы 5.2.2, 5.2.3).

Пробы ПП транспортируют и хранят при температуре 4°C не более 24 ч. При необходимости хранения в течение более длительного времени они подвергаются замораживанию при -18°C. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов.

4.2.2. Пробы воды

Отбор проб воды разного вида пользования, улавливание вирусов и их концентрирование осуществляют в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005,

разделы 5.3.1, 6.6, 6.7) и инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (рег. № 112-1210 от 02.12.2010, раздел 4.3.1).

4.3. Сортировка проб

После пробоподготовки каждый образец клинического и санитарно-вирусологического материала делят на 2 равные аликвоты, одну из которых используют для идентификации содержащегося в нем этиологического агента инфекции, а другую хранят при -20°C для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах.

5. Лабораторная диагностики вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи

Диагностика вирусных инфекций носит комплексный характер и предусматривает оценку клиники заболевания совместно с данными эпидемиологического анамнеза и результатами лабораторных исследований

5.1. Диагноз ОКИ при спорадической заболеваемости устанавливается на основании клинических, эпидемиологических данных и обязательного лабораторного подтверждения.

5.2. В очагах регистрации групповой заболеваемости ОКИ лабораторное обследование для установления этиологии инфекции проводится:

- при регистрации очага в организованных группах до 15 заболевших — у всех лиц при количестве заболевших от 15 до 30 — не менее чем у 10 лиц, при большем количестве заболевших — не менее чем у 20% из них;

- при ограничении очага по территориальному принципу до 30 заболевших — у всех лиц при количестве заболевших от 30 до 100 — не менее чем у 30 лиц, при большем количестве заболевших — 20% из них.

5.3. Критерием установления роли возбудителя как основного этиологического агента в очаге групповой заболеваемости служит его выявление не менее чем у 30% обследованных в соответствии с п.5.2.

5.4. В очаге групповой заболеваемости (в соответствии с пп. 5.2 и 5.3) допускается установление диагноза у части пострадавших на основании клинико-эпидемиологического анамнеза без лабораторного подтверждения.

5.5. Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи проводится в отношении следующих возбудителей:

- норовирусы I и II геногруппы;
- энтеровирусы;
- ротавирусы;
- аденовирусы 40 и 41 типов;
- астровирусы;
- вирус гепатита А.

5.6. Порядок и очередность исследований в отношении различных возбудителей определяются на основании клинической картины заболевания. Изолированный синдром гастроэнтерита является показанием к клинической диагностике в отношении норо-, рота- и астровирусов. Наиболее часто

возбудителями вирусных инфекций с пищевым путем передачи являются норовирусы I и II геногруппы.

5.7. Методом выбора при лабораторной диагностике для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи является ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции. При невозможности организации исследований методом ПЦР для лабораторной диагностики могут быть использованы метод ИФА для выявления антигенов вирусов или хроматографический экспресс-тест.

5.8. Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи в клиническом материале проводится в соответствии с требованиями инструкции по применению «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» № 111-1210 от 24.12.2010 и «Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» № 133-1204 от 12.04.2005.

6. Индикация и идентификация вирусной контаминации воды и ПП

6.1. Исследования сконцентрированных проб санитарно-вирусологического материала (воды, ПП) проводят после установления этиологии возникшей инфекционной заболеваемости и осуществляют в отдельном боксовом помещении, в котором не проводились исследования клинического материала.

6.2. При наличии эпидемиологических или иных показаний на установление водного или пищевого пути передачи инфекции пробы воды или ПП анализируются на предмет выявления в них конкретного(ых) вирусного агента(тов), который(е) идентифицирован(ы) в качестве возбудителя(ей) возникшей инфекционной заболеваемости.

6.3. В зависимости от вида искомого вирусного патогена для выявления и идентификации вирусной контаминации воды и ПП могут быть использованы разные методы лабораторных исследований. Среди них наибольшее предпочтение отдается методам, основанным на амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР), в связи с их высокой чувствительностью, что обуславливает возможность детекции вирусных агентов при их традиционно низком содержании в воде и пище. Наиболее целесообразно использовать для исследования этих проб метод ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в связи с низким риском контаминации продуктами предыдущих реакций.

Использование других методов детекции вирусного материала в воде и ПП, например, ИФА и хроматографических тестов для выявления вирусных антигенов, является менее предпочтительным в связи с недостаточной чувствительностью этих методов.

Для хорошо культивируемых в системе *in vitro* вирусов, в частности, энтеровирусов, одним из методов выбора может быть их выделение и последующая идентификация в культурах чувствительных клеток.

6.4. Обнаружение и идентификацию вирусов в сконцентрированных пробах вод разного вида пользования и ПП осуществляют в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег. № 134-1204 от 12.04.2005, разделы 5.3.3–5.3.5, 6.7), инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (рег. № 112-1210 от

02.12.2010, разделы 4.3.2–4.3.5), инструкцией по применению «Методы контроля качества пищевых продуктов по вирусологическим показателями» (рег. № 166-1208 от 11.06.2009, разделы 5.2.4–2.7).

6.5. Все этапы лабораторных исследований для индикации идентификации вирусов-контаминантов воды и ПП проводят с использованием препаратов и диагностических тест-систем, зарегистрированных на территории Республики Беларусь и предназначенных для исследований внешнесредовых образцов.

7. Получение лабораторных доказательств в пользу водного или пищевого пути передачи вирусных инфекций

7.1. Использование биоинформационных методов анализа для доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, обнаруженных в клиническом материале пациентов и в пробах воды и ПП

7.1.1. Получение фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов, и в пробах окружающей среды

Первым этапом биоинформационного анализа является получение фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов, и вирусов-контаминантов воды и ПП. Получение фрагментов нуклеотидной последовательности проводят методом секвенирования. Для этого аликвоты проб клинического и санитарно-вирусологического материалов, хранившиеся после сортировки при -20°C , передают в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Транспортировку образцов осуществляют, используя холодовую цепь при температуре $4-8^{\circ}\text{C}$. В сопроводительных документах должно быть указаны следующие данные:

- вид клинического/санитарно-вирусологического материала;
- дата отбора проб;
- вид пробоподготовки;
- тип идентифицированного вирусного агента.

Результаты секвенирования получают в течение 3–14 сут, пересылают затем по электронной почте в организацию, из которой поступили образцы для секвенирования в виде файлов в формате *.txt, каждый из которых содержит фрагмент нуклеотидной последовательности вируса, обнаруженного в 1 исследуемой пробе.

7.1.2. Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей

После получения результата секвенирования проводят сравнение полученных последовательностей между собой и с нуклеотидными последовательностями вирусов того же типа, выделенных в тот же период времени на территории Республики Беларусь и в других странах (референсные нуклеотидные последовательности). Целью этого исследования является получение информации о степени сходства и близкородственности вирусов, содержащихся в исследуемых пробах. Анализ проводят программой MEGA (версия 5.0 и выше). Эту программу скачивают с сайта <http://www.megasoftware.net> (программа является бесплатной для некоммерческого использования) и устанавливают на рабочий компьютер. Далее осуществляют выравнивание исследуемых последовательностей вирусов, полученных от пациентов, из проб окружающей среды (вода, пища) и

последовательностей вирусов того же типа, выделенных в тот же период времени на территории Республики Беларусь и в других странах. Для этого следует:

1. Запустить программу MEGA.
 2. Выбрать пункт меню «Alignment», в открывшемся списке выбрать «Alignment Explorer/Clustal».
 3. В открывшемся диалоговом окне M4: Alignment Editor выбрать пункт «Create a new alignment» и нажать ОК.
 4. В результате появляется диалоговое окно «Confirm», в котором предлагается выбрать тип выравниваемой последовательности («Are you building a DNA [Yes] sequence alignment (otherwise choose [No] for Protein»)? Следует нажать кнопку «Yes».
 5. Появляется окно программы M5: Alignment Explorer.
 6. В меню выбрать пункт «Edit» и в открывшемся списке команд выбрать «Insert Sequence From File».
 7. Вставить последовательности из соответствующих файлов, содержащих исследуемые последовательности и последовательности вирусов, выбранных для сравнения.
 8. Выбрать пункт меню «Edit», в открывшемся списке команд выбрать «Select All».
 9. Выбрать пункт меню «Alignment», в открывшемся списке команд выбрать «Align by ClustalW».
 10. В открывшемся диалоговом окне «M5: ClustalW parameters» нажать кнопку «ОК» (настройки параметров выравнивания установлены по умолчанию).
- В результате все исследуемые последовательности будут выровнены между собой. После этого удаляют неперекрывающиеся участки выровненных последовательностей, как показано на рисунке.
11. Для сохранения полученного выравнивания выбрать пункт меню «Data», в открывшемся списке команд выбрать «Export alignment» и «MEGA format». В результате выравнивание будет сохранено в файл *.meg.

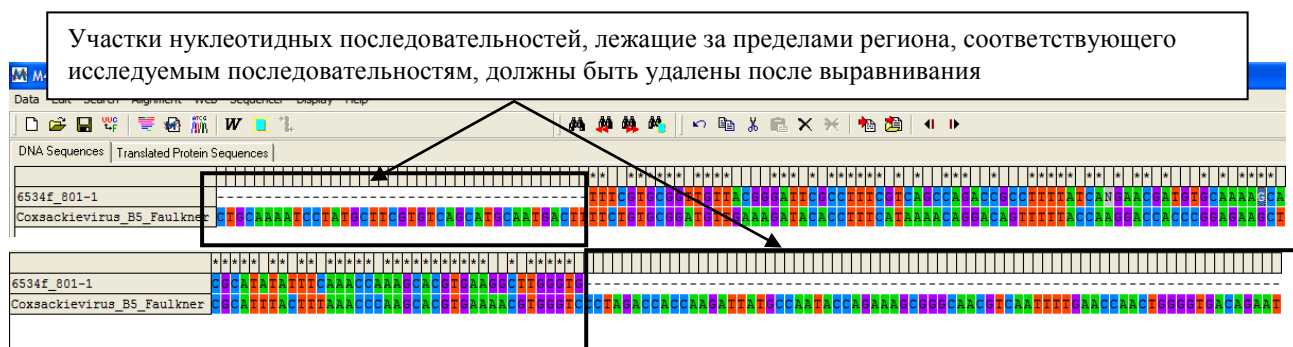


Рисунок — Удаление неперекрывающихся участков в выровненных последовательностях

12. Закрывать программу M5: Alignment Explorer. После этого появится окно с вопросом, надо ли открыть сохраненный файл в MEGA. После утвердительного ответа сохраненный файл автоматически открывается программой MEGA и доступен для дальнейшего анализа.

13. Для установления доли нуклеотидных различий между последовательностями выбрать пункт меню «Distances». В открывшемся списке команд выбрать «Compute Pairwise...».

19. Для подсчета доли различий между последовательностями необходимо выбрать следующие настройки:

- Estimate variance:

Variance estimation method: Analytical method;

- Substitution model:

Substitution type: nucleotide;

Model/Method: p-distance;

Substitution to include: d:Transitions+Transversions;

- Rate and patterns:

Rate among Sites: Uniform Rate;

Pattern among Lineages: Same (Homogeneous);

- Data subset to use:

Gap/Missing Data: Complete Deletion;

Codon Positions: 1st+2nd+3rd+noncoding.

20. Запустить программу подсчета, нажав кнопку «Compute» внизу экрана.

21. Результат появляется в новом окне в виде таблицы. Данные таблицы разделены по диагонали так, что в нижнем левом углу содержатся данные о долях нуклеотидных различий между последовательностями, а в правом верхнем — значения стандартной ошибки доли. Для удобства анализа все значения переводят в процентный формат, умножив их на 100%.

7.1.3. Анализ и интерпретация полученных результатов

Подтверждением пищевого/водного пути распространения вирусов является достоверно меньшая доля нуклеотидных различий между исследуемыми вирусами, обнаруженными у пациентов и в пробах воды и ПП, при сравнении их между собой, чем с референсными нуклеотидными последовательностями.

Пример: между нуклеотидной последовательностью А (норовирус выделен от пациента с гастроэнтеритом) и нуклеотидной последовательностью В (норовирус выделен из образца салата, который употреблял в пищу заболевший) доля нуклеотидных различий составляет $0,4 \pm 0,4\%$, тогда как при сравнении А и В с другими норовирусами того же генотипа, циркулировавшими в это же время в Республике Беларусь, минимальная доля различий составляет $3,2 \pm 1,2\%$. Так как $0,4 \pm 0,4\%$ достоверно меньше, чем $3,2 \pm 1,2\%$, то полученный результат служит доказательством пищевого пути передачи норовируса, а источником инфекции являлся контаминированный вирусами салат. Таким образом, с помощью методов биоинформационного анализа удастся получить доказательства реализации пищевого/водного пути распространения инфекций и идентифицировать источник заражения.

7.1.4. Возможные проблемы при использовании биоинформационных методов анализа для установления водного/пищевого путей передачи вирусных инфекций

Наиболее частая проблема, препятствующая использованию биоинформационных методов анализа, — низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить

достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования. В такой ситуации, если вирусы-контаминанты являются культивируемыми (адено-, энтеровирусы), рекомендуется провести 3 пассажа исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса. Если вирусы-контаминанты относят к некультивируемым, или плохо культивируемым (рота-, коро-, астровирусы), низкое содержание вируса в пробах объектов окружающей среды является непреодолимым препятствием для их секвенирования. В таком случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации объектов окружающей среды в совокупности с данными эпидемиологического расследования могут рассматриваться в качестве достаточных доказательств для установления водного/пищевого путей передачи вирусных инфекций.