

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Начальник отдела
науки и внедрения

Н.И. Доста



18 мая 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель
министра здравоохранения

В.П. Филонов



18 мая 1999 г.

Регистрационный № 136-9811

**МЕТОДИКИ
ПО САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОМУ КОНТРОЛЮ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ
И ОЦЕНКЕ ЕЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
(ДЛЯ СИСТЕМЫ ЦЕНТРАЛИЗОВАННОГО
ХОЗЯЙСТВЕННО-ПИТЬЕВОГО
ВОДОСНАБЖЕНИЯ)**

Минск 1999

Основное учреждение-разработчик: Белорусский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

Учреждение-соисполнитель: Белорусский научно-исследовательский санитарно-гигиенический институт

Авторы: Т.В. Амвросьева, С.В. Орлова, О.В. Дьяконова, З.Б. Квачева, Р.М. Шарко, В.Ф. Еремин, З.Ф. Богуш, О.Н. Казинец, Т.А. Стельмах, П.А. Амвросьев

Рецензенты: *С.Г. Позин, С.Ф. Кретова*

В методиках обобщен опыт работы сотрудников БелНИИЭМ и БелНИСГИ. Описаны организация и порядок осуществления санитарно-вирусологического контроля качества воды, методы улавливания вирусов из воды и их концентрирование. С учетом рекомендаций ВОЗ даны методы выделения и идентификации энтеровирусов.

Предназначены для специалистов НИИ, санэпидслужбы, а также специалистов предприятий системы централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения: вирусологов, бактериологов, санитарных врачей, эпидемиологов.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БОЕ — бляшкообразующая единица
ВГА — вирус гепатита А
ИФА — иммуноферментный анализ
МЕМ — минимальная среда Игла
НМФА — непрямой метод флуоресцирующих антител
ПЭЧ — клетки почки эмбриона человека
РН — реакция нейтрализации
РТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции
ТЦД₅₀/мл — тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая ЦПЭ в 50% зараженных клеточных культур
ФИТЦ — флуоресцеинизотиоционат
ФЭЧ — фибробласты эмбриона человека
ЦПА — цитопатический агент
ЦПЭ — цитопатический эффект
BGM — клетки почки африканской зеленой мартышки
Нер-2 — клетки карциномы гортани человека
FL — клетки амниона человека
RD — клетки рабдомиосаркомы человека
Vero — клетки почки зеленой мартышки

ВВЕДЕНИЕ

В связи с усиливающейся в последние десятилетия антропогенной и техногенной нагрузкой на объекты окружающей среды проблема загрязнения воды патогенными вирусами становится все более актуальной. Распространяемые с водой вирусные инфекции продолжают оставаться одной из основных причин роста кишечных и ряда соматических заболеваний человека. Среди них наибольшую социальную значимость имеют вирусные гепатиты (А, Е), менингиты, ротавирусная инфекция, заболевания сердца (мио-, перикардит, дилатационная кардиомиопатия), гастроэнтероколиты печени (некротический гепатит), поджелудочной железы (диабет) и др. К так называемым «водным вирусам», наиболее часто обнаруживаемым в воде, относятся: энтеровирусы (вирусы ЕСНО, Коксаки А и В, вирусы полиомиелита), вирусы гепатита А и Е, адено-, рео-, корона-, ретровирусы. В основе профилактики вызываемых данными возбудителями вирусных инфекций лежит разработка эффективной системы санитарно-вирусологического контроля качества воды, а также совершенствование критериев оценки ее эпидемической безопасности.

Данной проблеме посвящены настоящие методики, которые предназначены для организаций, предприятий и иных хозяйственных субъектов, независимо от подчиненности и форм собственности, эксплуатирующих системы централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, а также органов и учреждений санитарно-эпидемиологической службы, осуществляющих государственный и ведомственный санитарный надзор.

Разработка и утверждение данных методик обусловлены необходимостью приведения методических документов Республики Беларусь в соответствие с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и новыми научными знаниями о влиянии питьевой воды на эпидемическое благополучие населения, а также применением технологий водоочистки, часто не отвечающих уровню загрязнения водисточников.

1. ОРГАНИЗАЦИЯ И ПОРЯДОК ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВОДЫ

Контроль качества питьевой воды предусматривает ее санитарно-вирусологическое исследование на двух уровнях: водисточников (поверхностных, подземных) и распределительной сети.

1.1. Виды контроля

Различают 4 вида санитарно-вирусологического контроля:

- 1) текущий;
- 2) в период «риска»;
- 3) экстренный;
- 4) по санитарно-эпидемиологическим показаниям.

Текущий контроль осуществляется планоно (в течение года) в соответствии с разработанной региональной рабочей программой для конкретной территории (города, населенного пункта). Рабочая программа должна содержать:

- перечень контролируемых показателей;
- перечень применяемых для исследований методик;
- план пунктов (точек) отбора проб воды в местах водозабора перед подачей в распределительную сеть и в местах водоразбора в распределительной сети водопровода;
- количество контролируемых проб воды и периодичность их отбора;
- календарные графики отбора проб воды и проведения их исследований.

Рабочая программа, разработанная центром гигиены и эпидемиологии (ЦГЭ), утверждается главным государственным санитарным врачом ЦГЭ на срок не более 1 года. В ней должен быть определен порядок передачи информации органу местного самоуправления. Рабочая программа, разработанная ведомственными лабораториями водоканалов (при осуществлении производственного контроля), а также все изменения и дополнения в ней должны согласовываться с территориальными ЦГЭ, а полученная информация — направляться в ЦГЭ и органы местного самоуправления.

Производственный контроль качества питьевой воды по вирусологическим показателям может осуществляться также по договору со специализированными лабораториями НИИ и санитарной службы.

Контроль в период «риска» предусматривает проведение санитарно-вирусологических исследований в весенне-летне-осеннее время — III–IX месяцы каждого года, которые являются наиболее уязвимыми в плане вирусного загрязнения воды.

Экстренный контроль предусматривает осуществление исследований в случае каких-либо внезапных нарушений или аварий в системе водоснабжения, в результате которых может произойти микробное загрязнение водопроводной воды в распределительной сети.

Контроль по санитарно-эпидемиологическим показателям осуществляется в случае подъема заболеваемости населения кишечными вирусными инфекциями, уровень которой превышает средние сезонные показатели, а также при вспышке или эпидемии водного происхождения.

Экстренный контроль и контроль по санитарно-эпидемиологическим показателям осуществляются по согласованию заинтересованных специалистов (эпидемиолога, санитарного врача, бактериолога, вирусолога) и предусматривают более частые исследования по сравнению с установленными в программе текущего контроля.

1.2. Вирусологические показатели качества питьевой воды

Санитарно-вирусологический контроль качества питьевой воды предусматривает исследования по двум показателям:

- наличие или отсутствие колифагов в 100 мл воды (БОЕ);
- наличие или отсутствие инфекционных энтеровирусов (вирусов полиомиелита, ЕСНО, Коксаки А и В) в 1000 л воды (ТЦД₅₀/мл).

Основным контролируемым показателем являются колифаги, которые в соответствии с рабочей программой определяются как в водоисточниках, так и в воде распределительной сети.

При обнаружении в пробе (100 мл) питьевой воды колифагов проводится их определение в повторно взятой в экстренном порядке пробе (в течение суток). При обнаружении колифагов в повторно взятой пробе воды проводятся исследования на энтеровирусы.

2. ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

Питьевая вода должна быть безопасна в эпидемическом отношении. Критерием эпидемической безопасности питьевой воды является отсутствие изменений в состоянии здоровья населения, обусловленных, наряду с другими микробиологическими факторами, возбудителями вирусных инфекций, передающихся водным путем. Основным принципом регламентирования вирусного загрязнения воды на настоящем этапе развития гигиены, вирусологии и эпидемиологии является отсутствие возбудителей вирусных инфекций в определенном объеме воды для каждого вида водопользования.

Оценка эпидемической безопасности питьевой воды должна осуществляться исходя из нормативов, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Вирусологические критерии для оценки эпидемической безопасности питьевой воды

Показатели	Единица измерения	Нормативы
Колифаги	БОЕ	Отсутствие в 100 мл воды
Энтеровирусы	ТЦД ₅₀ /мл	Отсутствие в 1000 л воды

3. МЕТОДЫ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

Санитарно-вирусологическое исследование питьевой воды проводится в соответствии с приведенной на рис. 1 схемой применения вирусологических, серологических и молекулярно-биологических методов. Основные необходимые материалы, оборудование, реактивы и ре-агенты приведены в Приложениях 1 и 2.

3.1. Улавливание вирусов из воды и их концентрирование

Для улавливания вирусных агентов из водной среды используется проточный метод, основанный на применении специально изготовленных ловушек или ловушечных устройств, входящих в состав наборов для сбора и концентрирования вирусов. Данное 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 специальный картридж-ловушка, внутри которого находится адсорбент,

сорбирующий вирусы из воды. Применяемая ловушка является одноразовой, а само устройство может использоваться после стерилизации многократно в соответствии с прилагаемой инструкцией.

3.1.1. Общие правила отбора проб

Отбор проб осуществляют в халате и резиновых перчатках. После окончания работы перчатки обрабатывают спиртом, а халаты стерилизуют. Пробы маркируют, указывая населенный пункт, точку отбора, дату (число, месяц, год), должность и Ф.И.О. производившего отбор. Материал доставляют в лабораторию в максимально короткий срок (не более 6 ч). Доставленный материал немедленно обрабатывают. В порядке исключения допускается его хранение при температуре $+4^{\circ}\text{C}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в течение одних суток. Каждую пробу регистрируют в рабочем журнале.

3.1.2. Отбор проб

Перед использованием в ловушечное устройство вставляют ловушку, после чего его заворачивают в бумагу для стерилизации и стерилизуют сухим жаром при температуре 80°C 45 мин. Ловушечное устройство со 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. В точке отбора ловушечное устройство извлекают из стерильной упаковки и устанавливают на кран с помощью насадки. Объем пропускаемой воды должен составить 1000 л. Спустя 24 ч ловушечное устройство помещают в стерильный пакет и доставляют в вирусологическую лабораторию. После извлечения ловушки использованное ловушечное устройство подвергают обеззараживанию в 3%-м 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.

3.1.3. Обработка проб и концентрирование вирусов

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 пенфлакон. Элюирование «уловленных» адсорбентом вирусов осуществляют с помощью специального элюента. Данный элюент (10× концентрат) находится в составе набора¹. Для получения рабочего раствора концентрат элюента разводят в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1:10 (объем элюента/объем воды). Вирус элюируют путем пропускания элюента в рабочем разведении в объеме 3 мл через столб адсорбента в колонке. Полученную фракцию (элюат) собирают в стерильный пенфлакон. Для удаления бактериальной флоры собранный элюат обрабатывают хлороформом в соотношении 1/2 (объем пробы/объем хлороформа). Полученную смесь встряхивают в течение 10 мин на шоттель-аппарате, а затем центрифугируют

¹Наборы для сбора и концентрирования вирусов из воды производятся в БелНИИЭМ (220050 г. Минск, ул. К. Цеткин, 4, тел. факс. (0172) 226-52-63)

при 2000 об/мин 10 мин. После центрифугирования верхнюю фазу осторожно отбирают с помощью пипетки в стерильный флакон. Для удобства в работе полученный элюат сразу можно разделить на порции (аликвоты) по видам исследования (культуральные, серологические, молекулярно-биологические).

Использованный адсорбент заливают 3%-м раствором перекиси водорода для обеззараживания на 12 ч. Элюат можно хранить при температуре -20°C не более 6 мес. при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ не более 3 суток. При этом аликвоты элюата, предназначенные для вирусологических исследований, не следует размораживать более 2 раз.

3.2. Выделение энтеровирусов на культурах клеток

3.2.1. Рекомендуемые культуры клеток

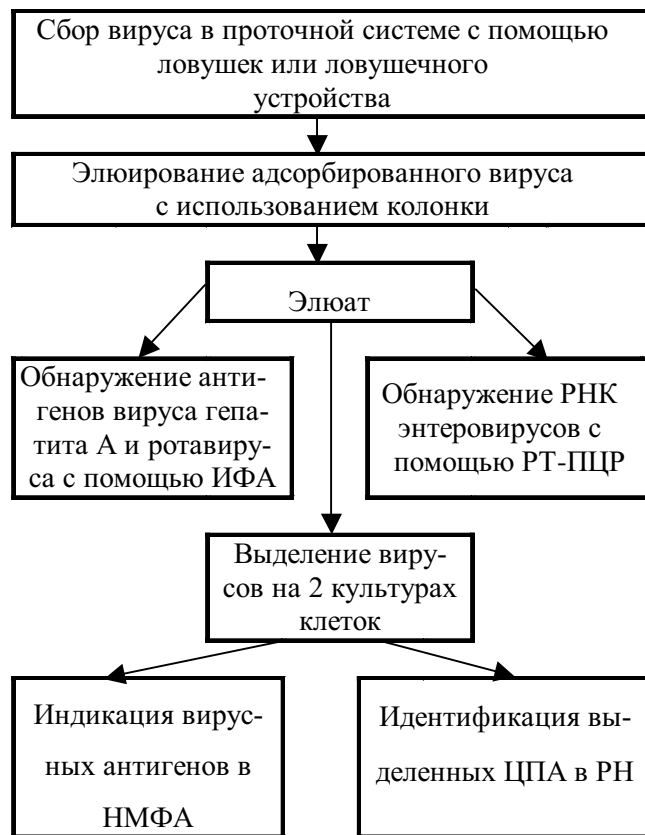


Рис. 1. Схема выделения кишечных вирусов из воды и их идентификация

Наиболее часто для выделения энтеровирусов применяются перевиваемые линии клеток человека и обезьяны. К ним относятся клетки RD, BGM, в которых активно репродуцируются вирусы полиомиелита, Коксаки А, большинство вирусов ЕСНО; в Нер-2 репродуцируются вирусы Коксаки В, а также значительная часть вирусов ЕСНО. В вирусологических лабораториях РБ для выделения энтеровирусов широко используются перевиваемые линии клеток — FL и Vero, которые также чувствительны к энтеровирусам.

Кроме перевиваемых, весьма чувствительными являются первичные и диплоидные культуры клеток человека и обезьяны. Среди них в качестве наиболее подходящих можно рекомендовать первично-трипсинизированные клетки ПЭЧ и ФЭЧ.

Для работы используются культуры клеток со сформированным монослоем на 2-е–3-и сутки их роста *in vitro*.

3.2.2. Работа с культурой клеток

При работе с культурами клеток обязательны соблюдение правил асептики и тщательная подготовка стеклянной посуды, сред и реагентов. Культивирование клеток можно осуществлять во флаконах из нейтрального стекла (например № 179, емкостью 50 мл), а также в пробирках и пенфлаконах или в пластиковых флаконах и планшетах (96-, 24-луночных). На первой стадии выращивания клетки помещают в ростовую среду, содержащую сыворотку. Как только клетки образуют сплошной монослой, культуральную среду меняют на поддерживающую, которая предназначена для поддержания культур в жизнеспособном состоянии как можно дольше без стимуляции их роста. Это обычно достигается снижением концентрации сыворотки в питательной среде до 1–2 % или ее отсутствием. Используют преимущественно эмбриональную телячью сыворотку, так как она способствует росту клеток и не содержит ингибиторов энтеровирусов. Если используют сыворотку другого происхождения, следует предварительно проверить наличие ингибиторов изучаемых вирусов. При использовании культур клеток рекомендуется применять стандартные питательные среды, к которым адаптированы используемые линии клеток.

При работе с культурами клеток следует четко выполнять методические инструкции для предотвращения микробной контаминации клеточных культур и защиты от контаминации культуральными материалами окружающего рабочего пространства. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях или ламинарных боксах.

3.2.3. Морфологическая характеристика ЦПЭ энтеровирусов в культурах клеток

Цикл репродукции энтеровирусов в чувствительных культурах длится 5–7 ч. При микроскопии инфицированных культур морфологические проявления размножения вирусов заключаются в равномерной мелкозернистой деструкции клеток, выражающейся в их округлении и постепенном отслоении от стенки культуральных флаконов. В окрашенных пораженных клетках можно видеть эозинофильные массы, оттесняющие ядро к периферии (продукты внутриклеточного развития вирусов). К факторам, определяющим морфологическую картину ЦПЭ, и срокам его проявления относятся также конкретные условия исследования, вариации в химическом составе и pH культуральной среды, температуре инкубации, концентрации клеток, сроках их роста *in vitro* и множественности заражения и т. д.

3.2.4. Порядок и техника выделения энтеровирусов

Выделение энтеровирусов следует осуществлять параллельно не менее чем на двух культурах клеток, при выборе которых следует учитывать их чувствительность к разным вирусным типам с целью создания благоприятных условий для размножения как можно более широкого спектра энтеровирусных агентов. Например: RD + Нер-2; Нер-2 + BGM; RD + BGM; ФЭЧ + RD и т. д. Выделение производится в трех последовательных пассажах. Нижеописанная техника выделения вирусов касается осуществления процедуры на пробирках или пенфлаконах с общим объемом заливаемой жидкости 1 мл.

– В пробирках (пенфлаконах) с хорошо сформированным клеточным монослоем заменяют ростовую среду на поддерживающую с 1–2% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота и добавлением антибиотиков: гентамицина К в дозе 80–100 мкг/мл, амфотерицина В — 2,5 мкг/мл. При культивировании клеток в инкубаторе без содержания CO₂ рекомендуется для стабилизации pH в синтетические среды добавлять буфер Нерес (25 мМ).

– На этикетке пробирки (пенфлакона) обозначают регистрационный номер пробы по журналу, год, вид клеточной культуры, номер пассажа.

– В две пробирки (пенфлакона) с культурой клеток каждого вида инокулируют по 0,2 мл исследуемой пробы, инкубируют в горизонтальном, слегка наклоненном положении при 36,5–37°C в термостате. Для контроля оставляют по несколько пробирок (пенфлаконов) с культурой со сменой и без смены среды.

– За культурой клеток наблюдают, микроскопируя их ежедневно и следя за появлением ЦПЭ в перевиваемых культурах клеток в течение 7–10 дней и в первично-трипсинизированных культурах клеток 4–5 дней.

– При первых признаках старения контрольных культур клеток (обычно 5–7 дней после посева перевиваемых культур клеток и 4–6 суток для первично-трипсинизированных и диплоидных) опытные пробирки (пенфлаконы) замораживают при -20°C. Материал 1-го пассажа используют далее в качестве заражающего для осуществления 2-го пассажа. Для этого он трехкратно замораживается–оттаивается, затем вносится в свежую культуру того же вида клеток в объеме 0,2 мл, к которому прибавляется 0,8 мл поддерживающей среды. Зараженные на 2-м пассаже перевиваемые культуры наблюдают ежедневно в течение 7 суток, а первично-трипсинизированные — 4–5 суток. Третий пассаж исследуемого материала осуществляют аналогично второму. Общий период наблюдения за тремя пассажами составляет ~21 и 15 дней соответственно. Если за это время характерный энтеровирусный ЦПЭ не выявляется, то результат оценивается как отрицательный. В случае наличия типичного вирусного ЦПЭ делается вывод о выделении ЦПА, который далее идентифицируется с использованием ряда методик.

3.2.5. Определение инфекционного титра ЦПА и выделенных энтеровирусов

Выделенные ЦПА, дающие быстрый ЦПЭ на 3-м пассаже (в течение 1–2 дней после инфицирования), не требуют определения титра перед постановкой опытов по идентификации. В данном случае при идентификации используются произвольно выбранные разведения (10³–10⁻⁴) ЦПА-содержащего материала. В других случаях необходимо провести определение титра выделенного ЦПА. Для этого готовят десятикратные его разведения в культуральной среде. Сначала разливают среду по 0,9 мл в пробирки (пенфлаконы), затем в первую пробирку

(пенфлаконе) вносят 0,1 мл цельного (неразведенного) вируса, не дотрагиваясь до среды. Новой пипеткой перемешивают содержимое пробирки (пенфлакона), избегая вспенивания, и переносят по 0,1 мл из первого разведения во второе и т. д. Схематично эту процедуру можно представить следующим образом:

Цельный вирус $10^{-1} \rightarrow 10^{-2} \rightarrow 10^{-3} \rightarrow 10^{-4}$ и т. д.

Чтобы исключить перенос избытка вируса пипеткой, необходимо следовать правилу: смешай, перенеси, выброси. Далее приготовленными разведениями вируса инфицируют культуры клеток с хорошо сформировавшимся монослоем, на котором был ранее выделен ЦПА. На каждое разведение с 10^{-1} до 10^{-8} используют не менее двух пробирок (пенфлаконов) с культурой клеток, куда вносят по 0,9 мл среды поддержки и по 0,1 мл каждого разведения вируса, начиная с наибольшего. При этом пипетку можно не менять. Постановку можно осуществлять микрометодом, используя микротитровальные плоскодонные планшеты (Приложение 1), или макрометодом, используя для культивирования клеток пробирки или пенфлаконы, а также стерильные плоскодонные 24-луночные пластиковые планшеты. Титр вируса (ТЦД₅₀/мл) определяется как наибольшее разведение, которое вызывает ЦПЭ в 50% зараженных клеточных культур. Рассчитывается титр вируса по формуле Кербера:

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

где L — lg наименьшего разведения, используемого в титровании;

d — интервал в lg между двумя последовательными разведениями;

S — сумма пропорций положительных тест-единиц (т.е. лунок или пробирок с культурой, где проявился ЦПЭ) в каждом разведении.

Пример:

Разведение вируса	Доля культур с ЦПЭ
10^{-1}	2/2 = 1
10^{-2}	2/2 = 1
10^{-3}	2/2 = 1
10^{-4}	1/2 = 0,5
10^{-5}	1/2 = 0,5
10^{-6}	0/2 = 0
10^{-7}	0/2 = 0
10^{-8}	0/2 = 0

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = -1 - 1(4 - 0,5) = -4,5$$

Формула Кербера использует «отрицательный логарифм». $10^{-4,5}$ — это конечное разведение, содержащее 1 ТЦД₅₀ в единице объема. При окончательном выражении инфекционной активности следует указывать объем вирусных разведений, вносимых в каждую культуру клеток (в данном случае 0,1 мл).

Таким образом, инфекционная активность вирусосодержащего материала (титр вируса) составляет $10^{-4,5}$ ТЦД₅₀ в 0,1 мл, т. е.

$$\text{титр вируса} = 4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1\text{мл}$$

Титрование энтеровирусов осуществляется аналогично вышеописанной для ЦПА процедуре. При этом важно помнить, что любые изменения в используемой клеточной системе, объемах вирусного материала или дней учета результатов опыта делают необходимым повторное титрование исходного вирусного материала. Группа энтеровирусов характеризуется высокой стабильностью при хранении при -20°C , поэтому их титры обычно воспроизводимы и после оттаивания во время подготовки к исследованию.

3.3. Идентификация выделенных ЦПА в РН

Сущность метода заключается в способности иммунной сыворотки нейтрализовать соответствующий ей тип вируса. Основной эффект в культуре клеток заключается в разрушающем цитопатогенном действии вируса на клетки при отсутствии такового в случае нейтрализации инфекционности вируса соответствующей ему сывороткой. Постановку метода можно провести, используя пластиковые планшеты с плоским дном (микрометод) или пробирки (пенфлаконы) с культурой клеток (макрометод). Вместо пробирок (пенфлаконов) в макрометод можно использовать стерильные пластиковые плоскодонные 24-луночные планшеты. Микрометод является более экономичным, так как расходуется меньше дорогостоящих диагностических сывороток и других компонентов, однако значительно возрастает возможность перекрестной вирусной контаминации между изолятами. Макрометод требует больших объемов реагентов, но имеет и преимущество: каждая отдельная пробирка (пенфлакон) открывается только один раз. Если из одного и того же материала ЦПА выделен в разных клеточных культурах, необходимо проводить идентификацию обоих изолятов, так как перmissивность разных линий клеток для различных типов энтеровирусов неодинакова. При постановке РН на культуре клеток соблюдаются равные количественные и объемные соотношения вирусосодержащей жидкости и диагностической сыворотки. В реакцию включается материал, состоящий из 100 ТЦД₅₀/мл вируса и сыворотки, содержащей 20 вируснейтрализующих единиц.

3.3.1. Приготовление рабочих разведений диагностических сывороток

Для идентификации энтеровирусных изолятов вначале используют группоспецифические гомологичные диагностические сыворотки¹ к следующим группам энтеровирусов:

- а) вирусу полиомиелита 1–3;
- б) Коксаки В 1–6; Коксаки А 1–5, 6–10, 11–15, 16–19, 20–24;
- в) ЕСНО 1–6, 7–13, 14–24, 15–22, 25–32;
- г) энтеровирусам 68, 69, 70, 71.

Перед постановкой РН сухую сыворотку, соблюдая стерильность, растворяют в упаковочной ампуле в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Полученный раствор можно расфасовать и заморозить при -20°C . Перед работой сыворотку инактивируют при 56°C в течение 30 мин, а затем разводят до рабочего

разведения, указанного на этикетке, питательной средой или раствором Хенкса. Разведенные сыворотки можно хранить при +4°C в течение 14 дней.

При выявлении нейтрализации исследуемого вируса одной из смесей групповых сывороток проводится раздельное типирование вируса с использованием каждой типоспецифической сыворотки, вошедшей в состав данной групповой смеси. Для типирования вируса полиомиелита готовят три смеси поливалентных групповых иммунных сывороток: P1+P2; P1+P3; P2+P3. При этом сыворотки разводят в два раза меньше, чем указано на этикетке, учитывая их дальнейшее смешивание.

3.3.2. Приготовление смесей вируса и антисывороток для РН

Из равных объемов составляют: смесь рабочего разведения сыворотки и рабочего разведения вирусосодержащей жидкости каждого испытуемого штамма (вирус + антисыворотка); смесь тех же разведений вирусосодержащей жидкости и разбавителя (культуральная среда или раствор Хенкса) для контроля действия вируса (контроль вируса); смесь рабочих разведений сыворотки и разбавителя для контроля токсического действия сыворотки (контроль сыворотки). Каждый ингредиент входит в состав смеси в объеме 0,25 мл при постановке макрометода и 0,05 мл при постановке микрометода. Смеси инкубируют при температуре 36°–36,5°C в течение 1 часа или при температуре +4°C в течение 18 ч.

3.3.3. Постановка макрометода РН

– Пробирки (пенфлаконы) с культурой клеток (по две пробирки или пенфлакона на каждую смесь) маркируют и осуществляют смену ростовой среды на 0,8 мл поддерживающей.

– Переносят по 0,2 мл смеси вируса с антисывороткой в каждую пробирку (пенфлакон).

– Ставят соответствующие контроли:

а) контроль рабочего разведения вируса,

б) контроль токсичности диагностической сыворотки,

в) контроль титра вируса,

г) контроль клеток (со сменой ростовой среды на поддерживающую и без смены ростовой среды).

– Инкубируют пробирки (пенфлаконы) в стационарном наклонном положении при 36,5°C–37°C.

– Ежедневно пробирки микроскопируют до обнаружения полного ЦПЭ вируса (обычно 3 дня).

Антисыворотка, которая сдерживает развитие ЦПЭ вируса, находящегося в смеси с ней, указывает на тип выделенного вируса.

3.3.4. Постановка микрометода РН

Постановка производится в плоскодонных 96-луночных панелях с использованием клеточной суспензии в ростовой среде в объеме 0,1 мл и смеси антисыворотки с вирусом в таком же объеме на одну лунку. Таким образом, общий объем вносимых ингредиентов составляет 0,2 мл на одну лунку. Метод включает следующую последовательность этапов:

– рабочее разведение сыворотки в количестве 50 мкл смешивают в лунках микропанелей с 50 мкл исследуемого агента с титром 100 ТЦД₅₀/мл. Для агентов, которые в пассаже быстро вызывают ЦПЭ (в течение первых 2-х суток), обычно используют разведения 10⁻³ и 10⁻⁴, а для вирусов, которые вызывают ЦПЭ в более поздние сроки, — 10⁻¹ и 10⁻²;

– в контроли клеток вносят на лунку 100 мкл питательной среды с 2% телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС);

– в контроли вируса вносят на лунку 50 мкл той же среды и 50 мкл исследуемого вируса в рабочем разведении (100 ТЦД₅₀/мл);

– микропанели помещают в СО₂-инкубатор при +36°–36,5°С на 1 ч для контакта вируса со специфическими сыворотками;

– после контакта во все лунки добавляют по 100 мкл суспензии культур клеток: перевиваемых — 200–250 и первично-трипсинизированных — 500 тыс. клеток в 1 мл питательной среды;

– микропанели закрывают стерильной клейкой лентой и помещают в СО₂-инкубатор; ежедневно просматривают под инвертированным микроскопом, оканчивают учет результатов после выявления 100% ЦПЭ в лунках контроля вируса.

3.4. Обнаружение вирусного материала в пробах воды

В настоящее время для экспресс-обнаружения вирусов используется комплекс вирусологических, серологических и молекулярно-биологических методов исследования, которые включают: иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления антигенов вируса гепатита А (ВГА) и ротавирусов, непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) для определения антигенов энтеровирусов, метод полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции (РТ-ПЦР) для обнаружения вирусной РНК.

3.4.1. Обнаружение антигенов ВГА и ротавирусов методом ИФА

Метод ИФА весьма специфичен, обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Ингредиенты реакции стабильны и не требуют специальных мер предосторожности. К преимуществам метода относится также возможность исследования инфекционного и инактивированного материала без длительного этапа накопления его в культуре клеток. Учет проводят фотометрически, на иммуноферментном анализаторе или мультискане при длине волны 492 нм или визуально по интенсивности окраски, что также дает преимущество в практической работе.

¹Данный набор диагностических сывороток можно приобрести в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, г. Москва

Для обнаружения можно использовать коммерческие тест-системы производства БелНИИЭМ МЗ РБ (г. Минск). В связи с тем, что ВГА и ротавирусы в питьевой воде могут присутствовать в очень низких концентрациях, которые находятся за пределами пороговой чувствительности данных систем, необходимо:

1) использование специального метода концентрирования, предусмотренного при отборе проб воды (раздел 3.1.);

2) изменение условий сенсibilизации твердой фазы иммуноглобулином путем увеличения времени контакта до 1 ч при температуре 37°C с последующим контактом в течение 16–18 ч при комнатной температуре. Остальные этапы постановки ИФА производятся в соответствии с прилагаемой к тест-системам инструкцией.

3.4.2. Выявление вирусных антигенов с помощью ИМФА

Метод флуоресцирующих антител обеспечивает визуальность реакции между антигеном и антителом и находит применение там, где имеется люминесцентный микроскоп, антивидовая меченная флуорохромом сыворотка, набор диагностических сывороток. Этот метод широко используется в вирусологии благодаря своей специфичности, доступности, скорости и относительной простоте. ИМФА делает возможным морфологическое изучение процессов взаимоотношения вирусов с клетками, а также исследование динамики накопления вирусных антигенов в клетке и антигенных связей вирусов. Для индикации вирусных антигенов желательно выбирать оптимальные сроки наблюдения, когда в культуре уже имеется достаточно большое количество инфицированных клеток, но еще отсутствуют значительные дегенеративные изменения, приводящие к гибели и способствующие неспецифической окраске таких структур.

3.4.2.1. Приготовление препаратов инфицированных клеток

Процедура приготовления:

– культуру клеток (Нер-2, FL, RD, Vero) с посевной дозой 100–150 тыс. клеток/мл выращивают на покровных стеклах в пробирках или пенфлаконах;

– к не полностью сформированному монослою клеток (2-е сутки *in vitro*) добавляют выделенный ранее на культуре исследуемый ЦПА или вирус в рабочем разведении (100 ТЦД₅₀/мл) по 0,2 мл на 2 мл поддерживающей среды;

– культуру клеток инкубируют с исследуемым материалом в течение 12–16 ч при температуре 36–36,5°C;

– культуральную жидкость удаляют из пробирок или пенфлаконов, а стекла промывают физраствором или фосфатно-солевым буфером (рН 7,2–7,4);

– клетки на стеклах фиксируют охлажденным до -20°C ацетоном или смесью ацетон:метанол (1:1).

Полученные препараты можно хранить при -20°C.

3.4.2.2. Постановка НМФА

Основные этапы:

- прикрепить покровные стекла с клетками на предметном стекле и пронумеровать;
- нанести на фиксированные клетки с антигеном диагностические сыворотки (кроличьи) в рабочих разведениях, указанных на этикетке;
- поместить стекла с нанесенной сывороткой во влажную камеру и поставить в термостат при 37°C на 30–45 мин;
- после окончания инкубации промыть стекла трижды в солевом фосфатном буфере по 5–7 мин и подсушить на воздухе;
- нанести на фиксированные клетки антисыворотку против глобулинов кролика, меченную ФИТЦ, в рабочем разведении; для удаления неспецифического свечения можно добавить эванс-голубой в концентрации 0,005% или альбумин, меченный родамином, в рабочем разведении, согласно прилагаемой инструкции (производство Института полиомиелита, г. Москва);
- поместить стекла во влажную камеру и инкубировать при 37°C в течение 30–45 мин;
- после окончания инкубации промыть стекла один раз в фосфатно-солевом буфере (рН 7,2–7,4) по 5 мин и дважды в дистиллированной воде по 10 мин;
- параллельно с описанными выше манипуляциями поставить контроли специфичности свечения в соответствии с прилагаемой к набору диагностических люминесцирующих антивидовых сывороток инструкцией.

Полученные препараты исследуются в люминесцентном микроскопе. В случае положительных результатов в цитоплазме клеток, содержащих антигены, обнаруживается свечение в виде отдельных светящихся гранул (спустя 5–6 ч после инфицирования), а затем — в виде большого включения, оттесняющего ядро клетки к периферии, или перинуклеарно расположенного однородного свечения (спустя 12–16 ч после инфицирования).

Окрашенные препараты рекомендуется изучать под микроскопом немедленно после приготовления. Наиболее яркая флуоресценция наблюдается в день окраски. Препараты можно сохранять при +4°C, но интенсивность флуоресценции постепенно падает.

3.4.3. Обнаружение вирусной РНК методом РТ-ПЦР

РТ-ПЦР позволяет выявить генетический вирусный материал в исследуемом элюате в течение 6 ч с высокой специфичностью (98%) и чувствительностью (96%).

3.4.3.1. Обработка элюатов

Полученный элюат (раздел 3.1) в объеме 3 мл:

- залить в центрифужную пробирку;

- осторожно шприцом на дно пробирки наложить 300 мкл 10%-й сахарозы;
- все пробирки тщательно уравновесить по одной;
- вставить пробирки в люльки;
- подвесить люльки к бакет-ротору SW 50.1;
- вставить ротор в ультрацентрифугу;
- осаждать вирус (ЦПА) при скорости 30 000 об./мин в течение 1,5 ч.

После осаждения вируса (ЦПА):

- удалить супернатант;
- вирусную бляшку ресуспендировать в 300 мкл стерильной де-ионизированной или дистиллированной воды;
- осторожно собрать бляшку стерильным наконечником;
- перенести ресуспендированный материал в пластиковую пробирку объемом 0,5–1,0 мл.

Приготовленные пробы можно брать сразу в реакцию или хранить в холодильнике при -20–50°C до использования в течение 3 мес.

3.4.3.2. Постановка метода РТ-ПЦР

Для выявления РНК энтеровирусов в исследуемых пробах можно использовать коммерческую тест-систему фирмы «Roche» (США). Исследования выполняются в соответствии с прилагаемой инструкцией.

3.5. Определение колифагов в воде

3.5.1. Отбор проб

Пробы отбирают в стерильные емкости с соблюдением правил стерильности. Бумажный колпачок с флакона снимают вместе с пробкой непосредственно перед отбором пробы, не касаясь пробки руками. Наполненные емкости закрывают притертыми пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и стерильными бумажными колпачками. Многоразовая посуда для отбора проб, в том числе и пробки, должна подвергаться стерилизации сухим жаром или автоклавированием.

3.5.2. Метод определения

Определение колифагов в воде проводят методом однослойного агара в соответствии с существующими нормативно-методическими документами.

ОСНОВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Автоклав
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками*
3. Анализатор иммуноферментный АИФ-340 или мультискан
4. Весы аналитические
5. Весы технические аптечные
6. Весы торсионные
7. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком для культуры клеток**
8. Вытяжной шкаф с ламинарным потоком (класса II) **
9. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания
10. Иономер (рН-121)
11. Микроскоп инвертированный
12. Микроскоп люминесцентный
13. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл
14. Посуда лабораторная (чашки Петри, колонки 10–20 мл, колбы)
15. Пробирки
16. Стекла предметные и покровные
17. Стерильная клейкая лента для заклеивания культуральных панелей
18. Стерильные плоскодонные 24-луночные пластиковые планшеты
19. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты
20. Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток (пенфлаконы емкостью 25, 50 мл)
21. Термостат, регулируемый до 37°C+1°C
22. Термостат CO₂ инкубатор*
23. Ультрацентрифуга***
24. Холодильники (-20°C, +4°C)
25. Центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин
26. Центрифужные пластиковые пробирки объемом 0,5–1,0 мл
27. Шприцы
28. Штативы (для фиксации флаконов)
29. Шюттель-аппарат

*для микрометода реакции нейтрализации

**желательно

***для постановки РТ-ПЦР

ОСНОВНЫЕ РЕАКТИВЫ И РЕАГЕНТЫ

1. Альбумин, меченный родамином
2. Антибиотики: гентамицин, амфотерицин
3. Антисыворотка против глобулинов кролика, меченная ФИТЦ
4. Ацетон
5. Биф-экстракт (Sigma, х.ч.)
6. Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при 121°C+1°C в течение 20 мин)
7. Диэтиловый эфир, х.ч.
8. Коммерческая тест-система фирмы «Roche» (США) — для ПЦР
9. Культуральные питательные среды: MEM, Игла MEM, 199, гемогидролизат
10. Метиловый спирт (метанол, х. ч. ГОСТ 6995–77)
11. NaCl (натрий хлористый, х.ч.)
12. Первично-трипсинизированные линии клеток ПЭЧ, ФЭЧ
13. Перевиваемые линии клеток RD, BGM, Hep-2, FL, Vero
14. 33%-я перекись водорода (ТУ 6–02–570–75 ОС.Ч)
15. Раствор Хенкса (pH 7,4)
16. 10%-я сахароза
17. Силиконовое масло
18. HCl (соляная кислота, х. ч., ГОСТ 3118-77, 35–38%)
19. Сыворотки диагностические энтеровирусные сухие (для реакции нейтрализации, группоспецифические и типоспецифические)
20. Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота
21. Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов вируса гепатита А
22. Тест-система иммуноферментная для выявления антигенов ротавируса
23. Трис-HCl (х.ч.)
24. Фосфатно-солевой буфер (pH 7,2–7,4)
25. Хепес (буфер — 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтанолсульфоная кислота)
26. Хлороформ (х. ч.)
27. Эванс-голубой
28. Этиловый спирт (этанол, ГОСТ 5962–67)