

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
25.03.2014
Регистрационный № 016-1213

**МЕТОДЫ ОТБОРА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРОБ
ИЗ ОБЪЕКТОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

инструкция по применению

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

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

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов. В ней представлены новые методы отбора и концентрирования проб из разных видов объектов среды обитания человека (ОСОЧ), а также схемы их применения для проведения санитарно-вирусологических исследований.

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. Бифэкстракт (Sigma).
4. Бумага крафт по ГОСТ 8273-75.
5. Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
6. Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при $121\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин).
7. Глицин по ГОСТ 4209-67.
8. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания.
9. Иономер (рН-121).
10. Кислота соляная (HCl), х.ч. по ГОСТ 3118-77.
11. Ламинарный бокс или бокс с УФ-лампой.
12. Наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, (0,5–10; 2–20; 20–200; 200–1000 мкл).
13. Натрий хлористый (NaCl), х.ч. по ГОСТ 4233-77.
14. Натрия гидроксид (NaOH), ч.д.а. по ГОСТ 4328-77.
15. Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12 водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) по ГОСТ 4172-76.
16. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл).
17. Перекись водорода, х.ч. по ГОСТ 10929-78.
18. Пипетки стеклянные градуированные на 1; 5; 10 мл по ГОСТ 29227-91.
19. Посуда лабораторная (колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74.
20. Трис-HCL, х.ч. (Sigma).
21. Хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96.
22. Центрифуга рефрижераторная на 1–5 тыс. об./мин.
23. Холодильник-морозильник (-18 – -20°C , $+4$ – $+8^\circ\text{C}$).
24. Этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований являются ОСОЧ — многочисленные объекты (предметы) обихода (например, стены, полы, мебель и ее обивка, дверные ручки, перила, бытовая техника, посуда, одежда, постельные принадлежности, детские игрушки и т. д.), а также объекты (предметы) производственной среды, включая

госпитальную (например, оборудование, разные технические приспособления, компьютерная техника, телефонные аппараты, спецодежда и т. д.), окружающие человека в связи с его той или иной профессиональной деятельностью.

МЕТОДЫ И СХЕМЫ ОТБОРА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРОБ ИЗ РАЗНЫХ ВИДОВ ОСОЧ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИХ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Метод отбора и концентрирования проб зависит от качества ОСОЧ. Для ОСОЧ, имеющих твердую поверхность (например, оборудование, мебель, стены, посуда и т. д.), применяют технологию отбора проб путем получения смывов. Для мягких, пористых и поглощающих биологический вирусосодержащий материал ОСОЧ (например, постельные принадлежности, одежда, мягкие игрушки, обивка мебели и др.) используют технологию получения экстрактов.

1. Приготовление растворов и сорбента для получения смывов и экстрактов из ОСОЧ

1.1. Приготовление 0,1 М глицинового буферного раствора

Растворяют 7,5 г глицина в 100 мл дистиллированной воды, после чего доводят 0,01 М раствором NaOH рН буферного раствора до 8,8. Общий объем раствора доводят до 1000 мл дистиллированной водой.

1.2. Приготовление 3% бифэкстракта

Растворяют 30,3 г Трис-HCl и 145 г NaCl в 500 мл дистиллированной воды, рН раствора доводят до 9,6 с помощью 6 М HCl. В полученном буферном растворе растворяют 150 г биф-экстракта с повторным доведением рН до 9,6. Приготовленный таким образом концентрат элюента автоклавируется 15–20 мин при давлении 1 атм. Перед использованием концентрат элюента разводят в 10 раз стерильной дистиллированной водой.

1.3. Приготовление 0,01М фосфатно-солевой буферного раствора

Растворяют 7,65 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ в 100 мл дистиллированной воды (получают раствор А), 2,95 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды (получают раствор Б), доводят рН раствора А до 7,4 раствором Б. На 100 мл раствора добавляют 2,1 г NaCl, полученный концентрат разводят в 25 раз дистиллированной водой.

1.4. Приготовление сорбента

В качестве сорбента используют волокнистый материал марки Фибан А6, который развешивают по 2 г, затем заворачивают в крафт-бумагу и стерилизуют в автоклаве 15–20 мин при давлении 1 атм.

2. Отбор и концентрирование проб с твердых поверхностей ОСОЧ (получение смывов и их концентрирование)

Этапы и общий порядок получения смывов с ОСОЧ и их концентрирования представлены на рисунке 1. В качестве базового метода для получения смывов применяют метод сорбции-элюции с последующим использованием дополнительного концентрирования проб с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ).

В качестве сорбента вирусов с твердых поверхностей используют тампоны из волокнистого ионообменного материала марки Фибан А6, приготовленные в соответствии с п. 1.4. Для процедуры отбора пробы разворачивают тампон и

протирают им с помощью пинцета исследуемую поверхность площадью от 10 до 25 см². Затем тампон помещают в раствор элюента объемом 5,0 мл (3% бифэкстракт, рН 9,6 или 0,1 М глициновый буферный раствор, рН 8,8) на 30 мин. Тампон используют сухой или влажный, смоченный предварительно в физиологическом растворе. После 30-минутной элюции сорбент извлекают из раствора, предварительно отжав его с помощью пинцета для получения смыва. Использованный тампон помещают в 6% раствор перекиси водорода на 24 ч для обеззараживания.

Полученный смыв (элюат), предположительно содержащий вирусный материал, подвергают дополнительному концентрированию с помощью ПЭГ. Для этого ПЭГ-6000 и хлористый натрий добавляют в элюат, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 М (0,1 и 0,03 г на 1 мл элюата соответственно). Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 18 ч в холодильнике при +4°C. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 3000 об./мин в течение 30 мин. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора. Применение дополнительного концентрирования позволяет сконцентрировать вирусосодержащий материал в 10 раз.

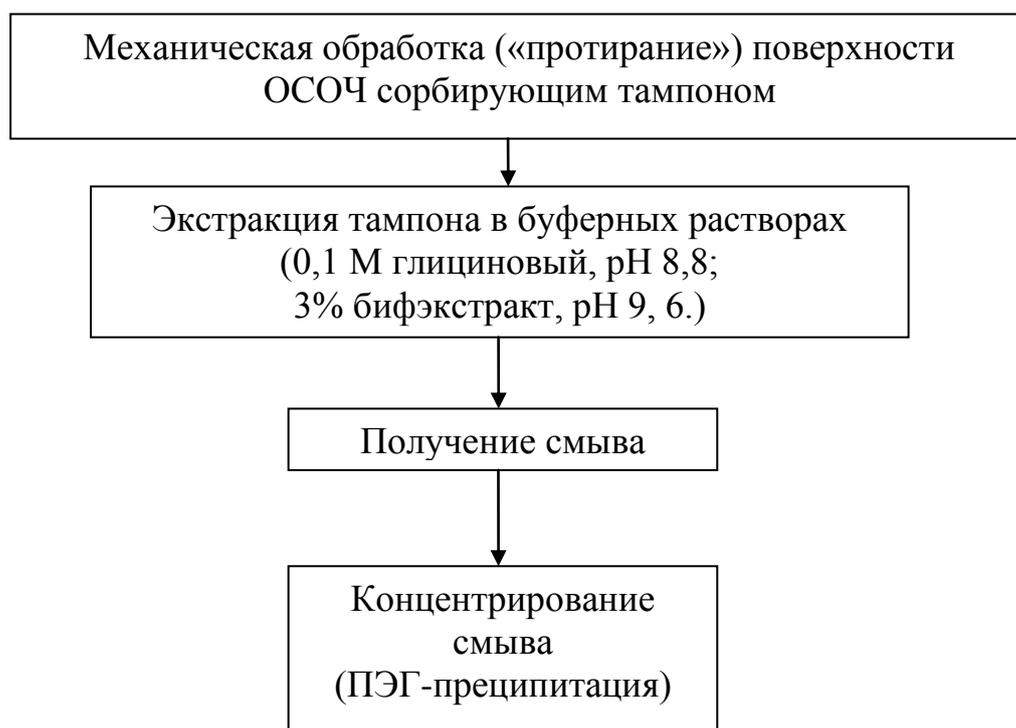


Рисунок 1 — Общая схема получения и концентрирования смывов с поверхностей ОСОЧ для вирусологических исследований

3. Отбор и концентрирование проб с текстиля и других мягких, пористых и поглощающих биологический вирусосодержащий материал ОСОЧ (получение экстрактов и их концентрирование)

Этапы и общий порядок получения экстрактов из ОСОЧ и их концентрирования представлены на рисунке 2.

Отбор проб проводят с помощью экстрагирующих буферных растворов (0,1 М глициновый, рН 8,5; 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор, рН 7,4. Материал текстиля или другого ОСОЧ площадью 5×5 см² помещают для экстракции в стакан объемом 250 мл, в который добавляют 200 мл экстрагирующего буферного раствора, рН 7,4. Время экспозиции составляет 30 мин, после чего текстиль отжимается с помощью пинцета и удаляется из стакана. Полученный вирусодержащий экстракт концентрируется с использованием волокнистого материала марки Фибан А6 проточным или суспензионным способом.

При применении проточного метода сорбции/элюции стеклянную колонку длиной 10 см наполняют сорбентом (фибан А6) массой 2 г, через который пропускают вирусодержащую жидкость. Затем проводят элюцию уловленных сорбентом вирусных частиц с помощью 5,0 мл 3% раствора бифэкстракта (рН 9,6).

При концентрировании вирусов суспензионным способом сорбент помещают в экстрагирующий буферный раствор на 30 мин, периодически помешивая. Затем жидкость удаляют и проводят элюцию уловленных вирусных частиц раствором 3% бифэкстракта в объеме 5,0 мл в течение 30 мин.

Полученные пробы подвергают дополнительному концентрированию с помощью ПЭГ (п. 2).

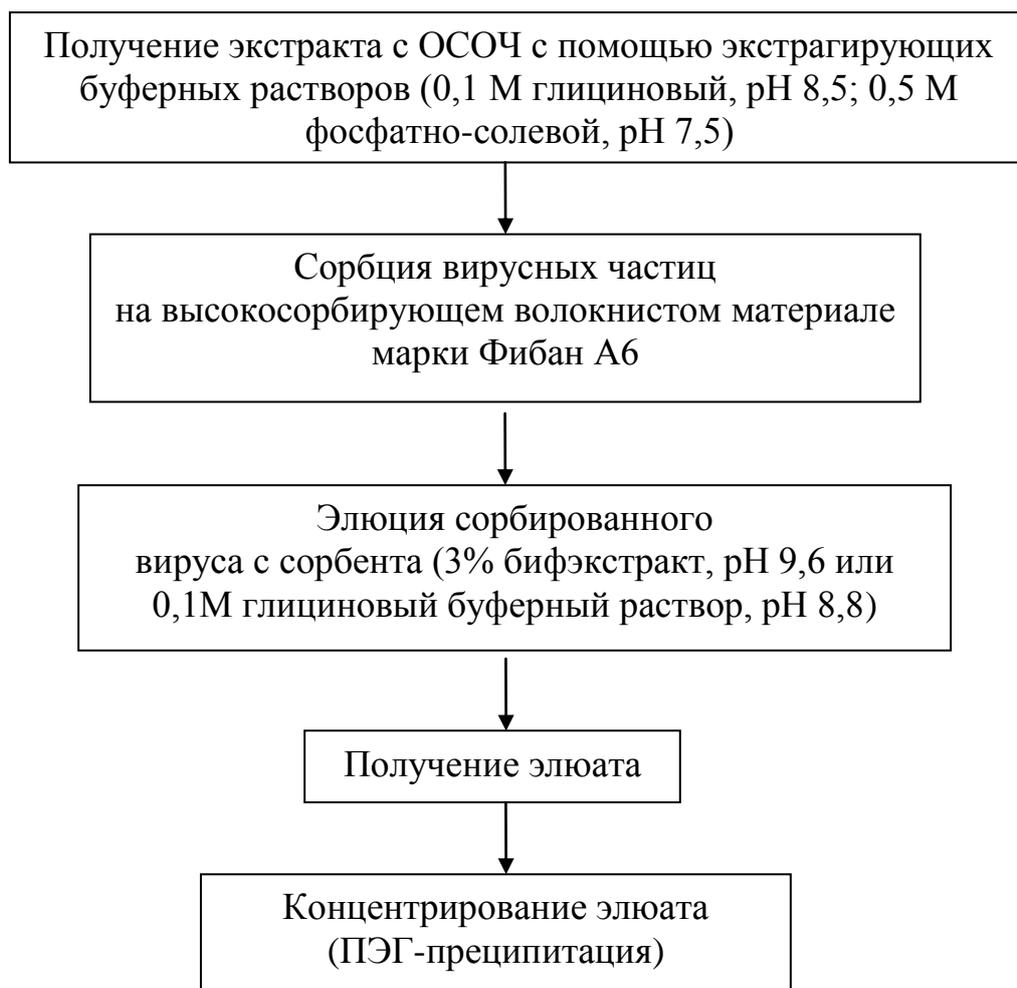


Рисунок 2 — Этапы отбора и концентрирования проб с поверхности текстиля

и других мягких, пористых и поглощающих биологический вирусосодержащий материал ОСОЧ (получение и концентрирование экстрактов)

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

1. Пробы смывов, отобранные с твердых поверхностей с помощью тампона, помещают в элюирующий буферный раствор и транспортируют при температуре 4°C в лабораторию, где проводится концентрирование пробы по п. 2.

2. Пробы, отобранные с поверхности текстиля и других мягких поверхностей, помещают в экстрагирующий буферный раствор и транспортируют при температуре 4°C в лабораторию, где проводится концентрирование пробы по п. 3.

3. Сконцентрированные пробы смывов и экстрактов с ОСОЧ 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.

СОРТИРОВКА ПРОБ

После пробоподготовки каждый образец сконцентрированных смывов и экстрактов делят на 2 равные аликвоты, одну из которых используют для идентификации содержащегося в нем вирусного агента, а другую хранят при -20°C для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в исследуемых санитарно-вирусологическом материалах и клиническом материале в целях установления контактно-бытового пути передачи вирусной инфекции.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Недостаточная экстракция вирусного материала из ОСОЧ. Меры устранения: строгое соблюдение времени прохождения этапа экстракции.

2. Недостаточная сорбция вирусного материала из ОСОЧ. Меры устранения: строгое соблюдение времени сорбции, контроль рН буферных растворов.

3. Недостаточная элюция вирусного материала из ОСОЧ. Меры устранения: строгое соблюдение времени элюции, контроль рН буферных растворов.