

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения  
Главный государственный санитарный врач



М.И. Римжа

12 апреля 2005 г.

Регистрационный № 133–1204

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ  
ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:** Научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии

**Авторы:** Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, О.Н. Казинец, З.Ф. Бо-  
гуш, Е.П. Кишкурно

Инструкция предназначена для специалистов НИИ, лабораторий санитарно-эпидемиологической службы и лечебно-профилактических учреждений, занимающихся диагностикой вирусных инфекций.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Автоклав.
2. Автоматические микропипетки со стерильными наконечниками.
3. Анализатор иммуноферментный (АИФ-340 или «Мульти-скан»).
4. Антибиотики (гентамицин, амфотерицин).
5. Весы технические аптечные.
6. Весы торсионные.
7. Вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при температуре  $121 \pm 1^\circ \text{C}$  в течение 20 мин).
8. Инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания.
9. Иономер (рН-121).
10. Микроскоп инвертированный.
11. Микроскоп люминесцентный.
12. Натрий хлористый (NaCl, х.ч.).
13. Первично трипсинизированные линии клеток ПЭЧ, ФЭЧ.
14. Перевиваемые линии клеток RD, FL, BGM, Нер-2.
15. Перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ).
16. Пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл.
17. Полиэтиленгликоль (Sigma).
18. Посуда лабораторная (чашки Петри, колбы, пробирки).
19. Среда для культур клеток (МЕМ).
20. Стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты.
21. Стерильные стеклянные флаконы для культуры клеток (емкость — 25, 50 мл).
22. Сыворотки диагностические энтеровирусные сухие (для реакции нейтрализации, группоспецифические и типоспецифические).

23. Сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота.
  24. Термостат, регулируемый до  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ .
  25. Термостат ( $\text{CO}_2$ -инкубатор).
  26. Тест-система для определения антигенов энтеровирусов иммуноферментным методом (ТУ РБ 100558032.092-2004).
  27. Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к энтеровирусам (ТУ РБ 100558032.090-2004).
  28. Тест-система для определения антител класса М к вирусам группы ЕСНО непрямым методом флуоресцирующих антител (ТУ РБ 100558032.050-2001).
  29. Тест-система для определения антител класса М к вирусам группы Коксаки В непрямым методом флуоресцирующих антител (ТУ РБ 100558032.051-2001).
  30. Фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2–7,4).
  31. Фосфатно-солевой твинсодержащий буферный раствор (рН 7,2–7,4).
  32. Холодильник-морозильник (от  $-20^\circ \text{C}$  до  $+4^\circ \text{C}$ ).
  33. Центрифуга рефрижераторная (1000–5000 об./мин).
  34. Центрифуга высокоскоростная (не менее 10 000 об./мин) с охлаждением.
  35. Хлороформ (х.ч.).
  36. Этиловый спирт (этанол, ГОСТ 5962-67).
- Необходимые материалы и оборудование для осуществления ПЦР-исследований изложены в пп. 4.5.1, 4.5.3.

## **1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Современная диагностика включает 4 основные группы лабораторных методов исследований: серологические, вирусологические, иммуногистохимические, молекулярно-биологические (табл. 1).

*Серологические методы* направлены на выявление маркеров энтеровирусной инфекции в сыворотке крови больных. К ранним маркерам инфекции относятся иммуноглобулины М (IgM) и иммуноглобулины А (IgA), появление которых в сыворотке крови и слюне соответственно свидетельствует о наличии свежего антигенного стимула. Наиболее распространенными методами их определения являются метод флуоресцирующих антител (МФА) и иммуноферментный анализ (ИФА). По-прежнему актуальным серологическим

методом остается выявление в сыворотках крови вируснейтрализующих противоэнтеровирусных антител (Ат) в реакции нейтрализации, четырехкратное и более нарастание которых считается диагностическим показателем. Определенную диагностическую значимость при некоторых формах энтеровирусной инфекции имеет обнаружение энтеровирусного антигена (Аг) в фекалиях.

*Вирусологические методы* исследований направлены на выделение из клинического материала (кровь, сыворотки, фекалии, ликворы, биоптаты пораженных органов и т. д.) инфекционных энтеровирусов в культурах чувствительных клеток.

Основная цель *иммуногистохимических исследований* — обнаружение *in situ* энтеровирусных Аг. К числу наиболее доступных методов иммуногистохимии относятся МФА и пероксидазный метод (ПМ).

*Молекулярно-биологические методы* исследований направлены на выявление генетического материала энтеровирусов. Наиболее часто применяемой для этих целей является полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), которая обладает рядом преимуществ: высокой специфичностью, чувствительностью и быстротой исполнения.

Что касается *экспресс-диагностики энтеровирусных инфекций*, то она включает обнаружение противоэнтеровирусных IgM и IgA с помощью МФА и ИФА, а также РНК энтеровирусов с помощью метода ОТ-ПЦР.

Одним из важных моментов при осуществлении диагностики энтеровирусной инфекции является правильный выбор вида исследуемого клинического материала, а также сроков его забора. Указанные параметры — вполне определенные для каждой конкретной нозологической формы. В табл. 2 приводятся оптимальные для исследований виды клинического материала, сроки его забора, а также диагностические маркеры, признанные репрезентативными для осуществления точной диагностики наиболее распространенных форм энтеровирусной инфекции.

## **2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК**

В качестве исследуемого материала чаще всего используются фекалии, ликворы, носоглоточные смывы, кровь и сыворотки кро-

ви. Из данного перечня предварительной обработке подвергаются только фекалии.

### **2.1. Обработка проб фекалий для вирусологического исследования**

В стерильную пробирку вносят 10 мл раствора Хенкса или фосфатно-солевого буфера, добавляют 0,5 мл хлороформа и несколько стеклянных бус. С помощью стерильной лопатки в пробирку вносят 2–3 г фекальной пробы. Пробирку плотно закрывают и в течение 15–20 мин тщательно встряхивают, затем 20 мин центрифугируют при +4° С со скоростью 3000 об./мин. Надосадочную жидкость собирают в стерильный флакон для дальнейшего исследования. Осветленную суспензию можно заморозить при –20° С.

### **2.2. Рекомендуемые культуры клеток**

Наиболее часто для выделения энтеровирусов применяются перевиваемые линии клеток человека и обезьяны. К ним относятся культуры следующих клеток: *RD* (клетки рабдомиосаркомы человека), которые наиболее чувствительны к вирусам ЕСНО, *FL* (клетки амниона человека), *BGM* (клетки почки африканской зеленой мартышки), в которых активно репродуцируются вирусы полиомиелита, Коксаки А, В, большинство вирусов ЕСНО, а также *Hep-2* (клетки карциномы гортани человека), в которых хорошо размножаются полиовирусы, вирусы Коксаки В. Кроме перевиваемых весьма чувствительными являются первичные и диплоидные культуры клеток. Среди них в качестве наиболее подходящих рекомендуются первично трипсинизированные клетки *ПЭЧ* (клетки почки эмбриона человека) и *ФЭЧ* (фибробласты эмбриона человека). Для работы используются культуры клеток со сформированным монослоем на 2–3-и сутки их роста *in vitro*.

### **2.3. Работа с культурой клеток**

При работе с культурами клеток обязательно соблюдение правил асептики и тщательная подготовка стеклянной посуды, сред и реагентов. Культивирование клеток можно осуществлять во флаконах из нейтрального стекла (например, флакон № 179 емкостью 50 мл), а также в пробирках и пенфлаконах или в пластиковых флаконах и планшетах. На первой стадии выращивания клетки помещают в ростовую среду, содержащую 10% сыворотки крови эмбрионов

крупного рогатого скота. 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. Применяют преимущественно сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота, так как она способствует росту клеток и не содержит ингибиторов энтеровирусов. При использовании сыворотки другого происхождения следует предварительно проверить наличие ингибиторов изучаемых вирусов. Вся работа должна проводиться в специальных стерильных помещениях или ламинарных боксах.

**Таблица 1**

**Современные методы диагностики энтеровирусной инфекции**

<b>Вид исследований</b>	<b>Диагностический маркер</b>	<b>Метод</b>	<b>Клинический материал</b>	<b>Оценка положительного результата</b>
Серологические	Нарастание титра вирус-нейтрализующих Ат	Реакция нейтрализации в культуре клеток	Сыворотка	4-кратное и более нарастание титра Ат
	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Сыворотка, ликвор	Наличие IgM к энтеровирусам
	IgA к энтеровирусам	МФА, ИФА	Слюна	Наличие IgA к энтеровирусам
Вирусологические	Инфекционный энтеровирус	Выделение вируса в 2 культурах чувствительных клеток в 3 пассажах	Кровь, носоглоточные смывы, фекалии, биоптаты пораженных органов и др.	Наличие энтеровирусов
Иммуногистохимические	Энтеровирусные Ag	МФА, ПМ	Клетки крови, ликвора, биоптаты пораженных органов и др.	Наличие Ag энтеровирусов
Молекулярно-биологические	РНК энтеровирусов	ОТ-ПЦР	Фекалии, кровь, биоптаты пораженных органов и др.	Наличие РНК энтеровирусов

Таблица 2

## Вид и сроки забора клинического материала при разных формах энтеровирусной инфекции

Клиническая форма	Вид исследуемого материала	Срок забора материала (от начала инфекции)	Диагностический маркер	Метод	Оценка положительных результатов	
1	2	3	4	5	6	
Асептический менингит	Ликвор	Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтеровирусам	
			Энтеровирусные Ag	МФА, ПМ	Наличие Ag энтеровирусов	
			Инфекционный энтеровирус	Выделение в культурах клеток	Наличие энтеровирусов	
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов	
	Сыворотка крови	Сыворотка I — начало инфекции, сыворотка II — через 2 недели		Наращение титра вирус-нейтрализующих Ag	Реакция нейтрализации в культуре клеток	4-кратное и более нарастание титра Ag
		Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтеровирусам	
	Фекалии	1-е сутки и более	Энтеровирусные Ag	ИФА	Наличие Ag энтеровирусов	
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов	
			Инфекционный энтеровирус	Выделение в культурах клеток	Наличие энтеровирусов	
	Носоглоточные смывы	1-е сутки и более	Энтеровирусные Ag	ИФА	Наличие Ag энтеровирусов	
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов	
			Инфекционный энтеровирус	Выделение в культурах клеток	Наличие энтеровирусов	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6
Герпан- гина	Носоглоточ- ные смывы	1-е сутки и более	Инфекционный энтеро- вирус	Выделение в куль- турах клеток	Наличие энтеровирусов
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтерови- русов
	Сыворотка крови	Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтерови- русам
	Фекалии	1-е сутки и более	Энтеровирусные Ag	ИФА	Наличие Ag энтеровирусов
			Инфекционный энтеро- вирус	Выделение в куль- турах клеток	Наличие энтеровирусов
РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтерови- русов			
∞ Гастроэн- териты, гастроэнте- роколиты	Сыворотка крови	Сыворотка I — нача- ло инфекции, сыворотка II — через 2 недели	Нарастание титра вирус- нейтрализующих Ag	Реакция нейтрали- зации в культуре клеток	4-кратное и более нараста- ние титра Ag
		Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусу	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтерови- русам
	Слюна	Не ранее 3-х суток	IgA к энтеровирусу	МФА, ИФА	Наличие IgA к энтерови- русам
	Фекалии	1-е сутки и более	Энтеровирусные Ag	ИФА	Наличие Ag энтеровирусов
			Инфекционный энтеро- вирус	Выделение в куль- турах клеток	Наличие энтеровирусов
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтерови- русов



Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6	
Генерализованная инфекция новорожденных	Кровь (мазок)	1-е сутки и более	Энтеровирусные Аг	МФА, ПМ	Наличие Аг энтеровирусов	
		Сыворотка крови	Сыворотка I — начало инфекции, сыворотка II — через 2 недели	Нарастание титра вируснейтрализующих Аг	Реакция нейтрализации в культуре клеток	4-кратное и более нарастание титра Аг
			Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтеровирусам
			1-е сутки и более	РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов
	Фекалии	1-е сутки и более	Энтеровирусные Аг	ИФА	Наличие Аг энтеровирусов	
			Инфекционный энтеровирус	Выделение в культурах клеток	Наличие энтеровирусов	
			РНК	ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов	
	Миалгия	Сыворотка крови	Не ранее 3-х суток	IgM к энтеровирусам	МФА, ИФА	Наличие IgM к энтеровирусам
		Фекалии	1-е сутки и более	Энтеровирусные Аг	ИФА	Наличие Аг энтеровирусов
Инфекционный энтеровирус				Выделение в культурах клеток	Наличие энтеровирусов	
РНК				ОТ-ПЦР	Наличие РНК энтеровирусов	

## **2.4. Морфологическая характеристика цитопатического эффекта энтеровирусов в культурах клеток**

Цикл репродукции энтеровирусов в чувствительных культурах длится 5–7 ч. При микроскопии инфицированных культур морфологические проявления размножения вирусов выражаются в равномерной мелкозернистой деструкции клеток в виде их округления и постепенного отслоения от стенки культуральных флаконов. В окрашенных пораженных клетках можно наблюдать эозинофильные массы, оттесняющие ядро к периферии (продукты внутриклеточного развития вирусов).

## **2.5. Порядок и техника выделения энтеровирусов**

Выделение энтеровирусов следует осуществлять параллельно не менее чем в двух культурах клеток, при выборе которых необходимо 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. Описанная ниже техника выделения вирусов касается осуществления процедуры в пробирках или пенфлаконах с общим объемом заливаемой жидкости 1 мл.

1. 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 CO<sub>2</sub> рекомендуется для стабилизации рН в синтетические среды добавлять буфер Нерес (25 ммоль).

2. На этикетке пробирки (пенфлакона) обозначают регистрационный номер пробы по журналу, дату заражения, вид клеточной культуры, номер пассажа.

3. В две пробирки (пенфлакона) с культурой клеток каждого вида инокулируют по 0,2 мл исследуемой пробы, инкубируют в горизонтальном, слегка наклоненном положении при  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  в термостате. Для контроля оставляют по несколько пробирок (пенфлаконов) с культурой со сменой и без смены среды.

4. За культурой клеток наблюдают: ее ежедневно микроскопируют и следят за появлением цитопатического эффекта в течение 5–7 дней. При первых признаках старения контрольных культур клеток опытные пробирки (пенфлаконы) замораживают при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Материал 1-го пассажа используют далее в качестве заражающего материала 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 с добавлением 0,8 мл поддерживающей среды. Зараженные на 2-м пассаже перевиваемые культуры наблюдают ежедневно в течение 5–7 сут. Аналогично 2-му осуществляют 3-й пассаж исследуемого материала. Общий период наблюдения за тремя пассажами составляет приблизительно 21 день. Если за это время характерный энтеровирусный цитопатический эффект не выявляется, то результат оценивается как отрицательный. В случае наличия типичного вирусного цитопатического эффекта делается вывод о выделении цитопатического агента, который далее идентифицируется.

## **2.6. Определение инфекционного титра цитопатических агентов и выделенных энтеровирусов**

Выделенные цитопатические агенты, дающие быстрый цитопатический эффект 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 ( $10^{-3}$ – $10^{-4}$ ) материала, содержащего цитопатический агент. В других случаях проводится определение титра выделенного цитопатического агента. Для этого готовят десятикратные его разведения в культуральной среде. Сначала разливают среду по 0,9 мл в пробирки (пенфлаконы), затем в первую пробирку (пенфлакон) вносят 0,1 мл цельного (неразведенного) вируса, не касаясь 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  $\rightarrow 10^{-1} \rightarrow 10^{-2} \rightarrow 10^{-3} \rightarrow 10^{-4}$  и т. д.

Чтобы исключить перенос избытка вируса пипеткой, необходимо следовать правилу: смешай, перенеси, выброси. Далее приготовленными разведениями вируса заражают культуру клеток с хорошо сформировавшимся монослоем, в которой был ранее выделен ци-

топатический агент. 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, или макрометодом, применяя для культивирования клеток пробирки или пенфлаконы. Можно использовать также стерильные плоскодонные 24-луночные пластиковые планшеты. Титр вируса (ТЦД<sub>50</sub>/мл) определяется как наибольшее разведение, которое вызывает цитопатический эффект 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 цитопатический эффект) в каждом разведении.

*Пример:*

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

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

Таким образом, инфекционная активность вирусосодержащего материала (титр вируса) составляет  $10^{-4,5}$  ТЦД<sub>50</sub> в 0,1 мл, т. е. титр вируса равен  $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1$  мл.

Титрование энтеровирусов осуществляется аналогично вышеописанной процедуре для цитопатического агента. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ , поэтому их титры обычно воспроизводимы и после оттаивания во время подготовки к исследованию.

### **2.7. Первичная идентификация и дифференциация выделенных цитопатических агентов на полио- и неполиомиелитные вирусные агенты с помощью химических ингибиторов**

Исключительно избирательная активность ингибиторов в отношении рода энтеровирусов позволяет применять их для первичной идентификации и дифференциации. Ингибиторы представлены двумя веществами химической природы — нифаном и белвтазидом. Основным их свойством является антивирусное действие, выражающееся в способности избирательно ингибировать (подавлять) размножение энтеровирусов в культуре клеток путем повреждения вирусспецифического синтеза РНК на стадии внутриклеточной репродукции, вследствие чего блокируется ключевой механизм наработки вируса *de novo*. Антивирусное действие ингибиторов определяется по подавлению цитопатического эффекта энтеровирусов в культуре клеток. Нифан обладает ингибирующим действием в отношении вирусов полиомиелита; белвтазид — в отношении вирусов групп ЕСНО и Коксаки. Эти препараты не ингибируют активность вирусов, относящихся к другим семействам и родам.

#### **2.7.1. Подготовка разведений выделенных цитопатических агентов**

Постановку реакции можно проводить без предварительного определения титра вирусного агента. Выделенные в культуре клеток энтеровирусы разводят в 10 раз на среде поддержки. К 0,1 мл цитопатического агента добавляют 0,9 мл среды поддержки.

#### **2.7.2. Постановка реакции первичной идентификации и дифференциации**

Проводят с использованием наборов группоспецифических ингибиторов для первичной идентификации энтеровирусов и диффе-

ренциации их на полио- и неполиомиелитные вирусные агенты согласно инструкции по применению (ТУ РБ 100558032.077-2002).

## **2.8. Идентификация выделенных цитопатических агентов в реакции нейтрализации**

Сущность метода заключается в способности иммунной сыворотки нейтрализовать вирус соответствующего ей типа. Основной эффект в культуре клеток заключается в разрушающем цитопатогенном действии вируса на клетки при отсутствии такового эффекта в случае нейтрализации инфекционности вируса соответствующей ему сывороткой. Постановку метода проводят, используя пластиковые планшеты с плоским дном (микрометод) или пробирки (пенфлаконы) с культурой клеток (макрометод). Вместо пробирок (пенфлаконов) при макрометоде 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 цитопатический агент выделен в разных клеточных культурах, необходимо проводить идентификацию обоих изолятов, так как перmissивность разных линий клеток для различных типов энтеровирусов неодинакова. При постановке реакции нейтрализации в культуре клеток соблюдаются равные количественные и объемные соотношения вирусосодержащей жидкости и диагностической сыворотки. В реакцию включается материал, состоящий из 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл вируса и сыворотки, содержащей 20 вируснейтрализующих единиц.

### **2.8.1. Приготовление рабочих разведений диагностических сывороток**

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

- к вирусу полиомиелита 1–3;
- Коксаки В 1–6; Коксаки А 1–5, 6–10, 11–15, 16–19, 20–24;

- ЕСНО 1–6, 7–13, 14–24, 15–22, 25–32;
- к энтеровирусам 68, 69, 70, 71.

Перед постановкой реакции нейтрализации сухую сыворотку, соблюдая стерильность, растворяют в упаковочной ампуле в 1 мл стерильной дистиллированной воды. Полученный раствор можно расфасовать на аликвоты и заморозить при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед работой сыворотку инактивируют при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, а затем разводят до рабочего разведения, указанного на этикетке, питательной средой или раствором Хенкса. Разведенные сыворотки можно хранить при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 14 дней.

При выявлении нейтрализации исследуемого вируса одной из смесей групповых сывороток проводится отдельное 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.

### ***2.8.2. Приготовление смесей вируса и диагностических сывороток для реакции нейтрализации***

Из равных объемов составляют: смесь рабочего разведения сыворотки и рабочего разведения вирусосодержащей жидкости каждого испытуемого штамма (вирус + диагностическая сыворотка); 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  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч или при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 18 ч.

### ***2.8.3. Постановка макрометода реакции нейтрализации***

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

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

3. Ставят соответствующие контроли:

– контроль рабочего разведения вируса;

– контроль токсичности диагностической сыворотки;

– контроль титра вируса;

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

4. Инкубируют пробирки (пенфлаконы) в стационарном наклонном положении при  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ .

5. Ежедневно пробирки микроскопируют до обнаружения полного цитопатического эффекта вируса (обычно 3 дня). Антисыворотка, которая сдерживает развитие цитопатического эффекта вируса, находящегося в смеси с ней, указывает на тип выделенного вируса.

#### ***2.8.4. Постановка микрометода реакции нейтрализации***

Постановка производится в плоскодонных 96-луночных панелях с использованием клеточной суспензии в ростовой среде в объеме 0,1 мл и смеси диагностической сыворотки с вирусом в таком же объеме на одну лунку. Таким образом, общий объем вносимых ингредиентов составляет 0,2 мл на одну лунку. Этапы метода выполняются в следующей последовательности:

– рабочее разведение сыворотки в количестве 50 мкл смешивают в лунках микропанелей с 50 мкл исследуемого агента с титром 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл. Для агентов, которые в пассаже быстро вызывают цитопатический эффект (в течение первых 2 сут), обычно используют разведения  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$ , а для вирусов, которые вызывают цитопатический эффект в более поздние сроки, —  $10^{-1}$  и  $10^{-2}$ ;

– в контроли клеток вносят на лунку 100 мкл питательной среды с 2% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота;

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

– микропанели помещают на 1 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор при  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  для контакта вируса со специфическими сыворотками;

– после контакта во все лунки добавляют по 100 мкл суспензии культур клеток: перевиваемых — 200 000–250 000 и первично трипсинизированных — 500 000 клеток в 1 мл питательной среды;



– микропанели закрывают стерильной клейкой лентой и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Ежедневно просматривают под инвертированным микроскопом. Заканчивают учет результатов после выявления 100% цитопатического эффекта в лунках контроля вируса.

### **3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1. Выявление IgM в сыворотках крови методом ИФА**

Проводят с использованием иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления Ag класса М к энтеровирусам. Принцип действия тест-систем основан на способности выявлять IgM к энтеровирусам в сыворотках крови больных за счет их взаимодействия с иммобилизованными на поверхности лунок планшетов Ag энтеровирусов. Образованный комплекс Ag-Ag выявляют с помощью иммунопероксидазного конъюгата.

##### ***3.1.1. Обработка проб и подготовка к исследованию***

Кровь у обследуемых больных забирают не ранее чем на 3–5-й день от начала заболевания в стеклянную или пластмассовую пробирку в объеме 0,5–1,0 мл. Выдерживают в термостате при  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  в течение 30 мин для скорейшего сворачивания. Центрифугируют при 1000–1500 об./мин в течение 15 мин. Сыворотку отбирают и исследуют либо хранят при  $-20^\circ \text{C}$  до исследования. Многократные замораживания-оттаивания сывороток нежелательны, так как IgM при этом могут разрушаться. Разведения исследуемых проб готовят перед постановкой опыта на фосфатно-солевом твинсодержащем буферном растворе. При использовании тест-систем рекомендуемое разведение сывороток для исследования — 1:400.

##### ***3.1.2. Постановка реакции ИФА***

Проводят согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению (ТУ РБ 100558032.090-2004 или др.).

##### ***3.1.3. Возможные проблемы прохождения реакции ИФА и меры их устранения***

1. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контролей не соответствуют установленным пороговым уровням.

Меры устранения: строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

2. Соотношение показателей оптической плотности отрицательного и положительного контролей ниже 2,1.

Меры устранения: строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

3. Не возникает окраска после добавления субстратно-индикаторного раствора.

Меры устранения: слежение за полным растворением ортофенилендиамина в субстратном буферном растворе, строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

### **3.2. Выявление IgM в сыворотках крови непрямым МФА**

Проводят с использованием иммунофлуоресцентных тест-систем, предназначенных для выявления Ag класса М к вирусам групп ЕСНО и Коксаки В. Принцип действия тест-систем основан на образовании специфичных иммунных комплексов между Ag препаратов, полученных путем инфицирования монослоя клеток определенными штаммами энтеровирусов, имеющих общие антигенные детерминанты с другими представителями энтеровирусов, и IgM исследуемой сыворотки крови. Для выявления образовавшегося иммунного комплекса Ag-Ag используют конъюгат, меченный флуоресцеинизотиоционатом.

#### ***3.2.1. Обработка проб и подготовка к исследованию***

Обработка проб и получение сывороток крови — в соответствии с п. 3.1.1. Разведения исследуемых проб готовят перед постановкой опыта на физиологическом растворе в соотношении 1:10.

#### ***3.2.2. Постановка реакции непрямого МФА***

Проводят согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению (ТУ РБ 100558032.050-2001, ТУ РБ 100558032.051-2001 или др.).

#### ***3.2.3. Возможные проблемы прохождения реакции непрямого МФА и меры их устранения***

1. В лунках с положительным контролем отсутствуют клетки со специфическим цитоплазматическим свечением либо наблюдается свечение недостаточной интенсивности.

Меры устранения: строгое соблюдение температурного режима хранения ингредиентов тест-системы. Недопущение многократного замораживания-оттаивания ингредиентов тест-системы.

2. В лунках с отрицательным контролем присутствуют клетки со специфическим цитоплазматическим свечением в количестве, превышающем допустимую норму.

Меры устранения: недопущение перетекания содержимого лунок с положительным и отрицательным контролями.

3. Фоновое окрашивание клеточного монослоя после нанесения диагностических флуоресцирующих сывороток, затрудняющее интерпретацию результатов.

Меры устранения: строгое соблюдение временного режима стадии отмывки при постановке реакции.

### **3.3. Обнаружение энтеровирусных Аг**

Выявление Аг энтеровирусов проводят в пробах фекалий, носоглоточных смывов и ликворов больных методом ИФА с использованием тест-систем.

#### ***3.3.1. Обработка проб и подготовка к исследованию***

При обработке пробы фекалий готовят 10–20% суспензию на физиологическом растворе или фосфатно-солевом твинсодержащем буферном растворе. Для осветления суспензии пробу центрифугируют 10 мин при 3000 об./мин, затем надосадок переносят в другую пробирку и добавляют к нему равный объем хлороформа, встряхивают в течение 5 мин, повторяют центрифугирование в том же режиме. Верхнюю фазу используют для исследования. При низком содержании Аг энтеровирусов в пробах проводят концентрирование полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого ПЭГ-6000-8000 и хлористый натрий добавляют в супернатант, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 моль (0,1 г и 0,03 г на 1 мл супернатанта соответственно). Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ, а затем выдерживают в течение 18 ч в холодильнике при +4° С. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 6000 об./мин в течение 1 ч. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в том же буферном растворе, составляющем 1/20 исходного объема суспензии, и используют для исследования.

Носоглоточные смывы получают при помощи ватных тампонов, которые помещают после взятия носоглоточных секретов в сте-

рильную пробирку с 1 мл физиологического раствора и исследуют. Материал можно заморозить и хранить до использования при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед постановкой реакции материал оттаивают и исследуют без дополнительной обработки.

Ликворы исследуют без дополнительной обработки и разведения.

### **3.3.2. Постановка реакции ИФА**

Проводят согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению (ТУ РБ 100558032.093-2004 или др.).

### **3.3.3. Возможные проблемы прохождения реакции ИФА и меры их устранения**

1. Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контролей ниже порогового уровня.

Меры устранения: строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

2. Соотношение показателей оптической плотности отрицательного и положительного контролей ниже 2,1.

Меры устранения: тщательное перемешивание компонентов реакции в лунках планшета после добавления иммунной сыворотки, строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

3. Не возникает окраска после добавления субстратно-индикаторного раствора.

Меры устранения: слежение за полным растворением ортофенилендиамина в субстратном буферном растворе, строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.

## **4. ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСНОЙ РНК МЕТОДОМ ПЦР**

Детекцию РНК энтеровирусов осуществляют в образцах ликвора, сыворотки крови, носоглоточных смывов, фекалий методом ОТ-ПЦР.

### **4.1. Обработка проб**

#### **4.1.1. Обработка проб фекалий**

1. Образцы пробы фекалий объемом 1 мл отбирают стерильным шпателем и помещают в стерильный флакон.

2. Добавляют физиологический раствор до образования 10–20% суспензии.

3. Взвесь встряхивают на вортексе и осветляют центрифугированием при 3000 об./мин в течение 20 мин.

4. Отбирают 50 мкл супернатанта и смешивают с равным объемом сыворотки крови крупного рогатого скота.

5. При необходимости хранения добавляют глицерин до конечной концентрации 20% и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мес.

#### **4.1.2. Отбор и обработка образцов носоглоточных смывов**

1. Отбор материала производят стерильным одноразовым аппликатором. После забора материала аппликатор помещают в стерильную одноразовую пробирку, содержащую 1 мл транспортной среды (Амплисенс, Россия или другие производители).

2. Допускается хранение материала при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мес.

#### **4.1.3. Отбор и обработка сыворотки крови**

Осуществляется в соответствии с п. 3.1.1.

**4.1.4. Пробы ликвора** не требуют предварительной обработки.

### **4.2. Выделение РНК из исследуемых образцов**

Выделение РНК осуществляют с использованием тест-системы «Рибо-сорб» (Амплисенс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

#### **4.3. Реакция обратной транскрипции**

Реакцию ОТ можно осуществлять с использованием набора «РЕ-ВЕРТА» производства Амплисенс (Россия) или тест-систем других производителей в соответствии с инструкцией производителя. Стандартные реакционные смеси для ОТ производятся различными фирмами (Sigma, Promega, Amersham, Fermentas). В состав реакционных смесей входят буферный раствор(ы) и фермент — обратная транскриптаза (ревертаза) различного происхождения. Ингибитор РНКазы и смесь дезоксирибонуклеотрифосфатов (ДНТФ) поставляются отдельно.

Постановка реакции ОТ:

– в пробирки емкостью 0,2 или 0,5 мл вносят 10–14,5 мкл РНК-пробы, 10–15 пмоль обратного праймера;

– смесь аккуратно перемешивают, осаждают центрифугированием и помещают в термоциклер на 10 мин при  $70^{\circ}\text{C}$ ;

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

– в пробы добавляют 5× или 10× буфер для ОТ (конечная концентрация — 1×), 1 мкл ДНТФ (100–200 мкмоль), обратную транскриптазу (100–200 ед.), ингибитор РНКаз (20 ед.). Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Его 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 температура, необходимые для работы фермента, указываются в инструкции производителя).

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

#### **4.4. Полимеразная цепная реакция**

Аmplификацию полученной в реакции ОТ кДНК осуществляют с использованием коммерческих тест-систем, например, Ампли-Сенс-100-R для амплификации участка кДНК 207 п. н. энтеровирусов (кат. № V-16-100-R), в соответствии с прилагаемой инструкцией.

#### **4.5. Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК**

##### **(учет результатов)**

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез.

##### **4.5.1. Материалы**

- агароза для электрофореза;
- ДНК-маркер 50–1000 пар оснований;
- этилендиаминтетраацетат (ЭДТА);
- фиколл;
- бромфеноловый синий;
- Трис;
- бромистый этидий;
- ледяная уксусная кислота;
- борная кислота.

##### **4.5.2. Подготовка реагентов**

– буферы для электрофореза. ТАЕ (50×) на 1 л: 0,04 моль Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 моль

ЭДТА (100 мл 0,5 моль ЭДТА, рН 8,0). ТБЕ (5×) на 1 л: 0,089 моль Трис-борат (54 г Трис, 27,5 г борной кислоты), 0,002 моль ЭДТА (20 мл 0,5 моль ЭДТА, рН 8,0);

– 1,5–2% агароза — 1,5–2 г агарозы на 100 мл 1× буфера ТАЕ или ТБЕ. Агарозу плавят на водяной бане при 100° С до полного расплавления;

– бромистый этидий — матричный раствор 10 мг/мл. Бромистый этидий вносят из матричного раствора в аликвоту расплавленной остывшей до 55–56° С агарозы до конечной концентрации 0,1–10 мкг/мл;

– буфер для нанесения проб: 0,25% бромфеноловый синий, 20% фиколл 400, 0,1 моль ЭДТА.

#### ***4.5.3. Оборудование***

- прибор для горизонтального электрофореза;
- гребенки для горизонтального электрофореза;
- источник питания (источник постоянного тока);
- трансиллюминатор;
- фото- или видеокамера с фильтрами для съемки в УФ;
- автоматические пипетки и наконечники.

#### ***4.5.4. Меры предосторожности и правила работы при постановке электрофореза***

Реагент бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции проводят с использованием перчаток. Реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. ниже).

#### ***4.5.5. Обезвреживание реагентов***

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 моль раствора калия перманганата и 1 объем 2,5 моль соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4–6 ч. Затем добавляют 1 объем 2,5 моль натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

#### **4.5.6. Постановка**

- в электрофорезную кювету вставляют гребенку так, чтобы расстояние между дном кюветы и зубцами гребенки составляло 1 мм;
- подготовленную агарозу заливают в электрофорезную кювету с гребенкой и дают ей застыть;
- после застывания агарозы гребенку аккуратно достают, стараясь не повредить образовавшиеся лунки, гель помещают в прибор для электрофореза так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду;
- в случае использования минерального масла проводят подготовку ПЦР-продуктов, добавляя 100 мкл хлороформа с последующим встряхиванием и центрифугированием при 12000 g в течение 1 мин. Верхнюю водную фазу переносят в новые пробирки. Пробы, амплифицированные без минерального масла, не требуют подготовки;
- вносят 15 мкл ПЦР-амплифицированной подготовленной пробы в чистые пробирки и добавляют 3 мкл буфера для проб, перемешивают;
- прибор для электрофореза наполняют 1× буфером ТАЕ или ТБЕ так, чтобы агароза была полностью им покрыта;
- через слой жидкости, внимательно, в отдельные лунки вносят по 15–20 мкл ДНК-маркера, положительный, отрицательный контроли и пробы;
- электрофорез проводят при напряжении 10 В/см.

#### **4.5.7. Учет результатов**

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 исследуемом материале РНК энтеровирусов положительные образцы должны содержать полосу ДНК размером 207 п. н. Размер полосы определяют по соотношению с ДНК-маркером.

Результаты фиксируются посредством фотографирования или видеосъемки геля при использовании УФ-фильтров.



#### ***4.5.8. Возможные проблемы при детекции РНК энтеровирусов с помощью ОТ-ПЦР и их устранение***

Отсутствие специфической полосы в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Отсутствие специфической полосы в препарате положительного контроля указывает на возможную деградацию РНК и/или внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. Пути устранения:

- при проведении данного этапа исследований необходимо использовать одноразовую стерильную пластиковую посуду и накопичники на всех стадиях постановки во избежание внесения ингибиторов реакции;

- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпироскарбонатом вода во избежание загрязнения препарата РНКазы.

Наличие специфической полосы в препарате отрицательного контроля свидетельствует о контаминации проб. Пути устранения:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон;
- работа только в одноразовых перчатках и их смена при переходе из одной зоны в другую;
- использование отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон.