

Методические указания по методам контроля МУК 4.2.4064-24 "Организация и проведение исследований клинических материалов на полиовирусы" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 27 сентября 2024 г.)

Методические указания по методам контроля МУК 4.2.4064-24
"Организация и проведение исследований клинических материалов на полиовирусы"
(утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 27 сентября 2024 г.)

Взамен МУК 4.2.2410-08
Дата введения 27 декабря 2024 г.

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания по методам контроля (далее - МУК) описывают порядок отбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторных исследований материалов от больных полиомиелитом и заболеваниями с синдромом острого вялого паралича (далее - ОВП), с подозрением на данные заболевания, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска"¹ при реализации эпидемиологического надзора за полиомиелитом².

¹ Примечание: к "группам риска" относятся дети, прибывшие из эндемичных или неблагополучных по полиомиелиту стран (территорий), из семей мигрантов и кочующих групп населения, беженцы, вынужденные переселенцы.

² Глава XXXII СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 N 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный N 67587); от 25.05.2022 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный N 68934) (далее - СанПиН 3.3686-21); План действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации на 2022 - 2024 гг., утвержденный руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека/Министром здравоохранения Российской Федерации 02.02.2022 (далее - План действий на 2022 - 2024 гг.); МУ 3.1.1.4016-24 "Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и острыми вялыми параличами", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.03.2024 (далее - МУ 3.1.1.4016-24).

1.2. Настоящие МУК предназначены для специалистов органов и организаций, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) в отношении полиомиелита, а также могут быть использованы специалистами научно-исследовательских, образовательных и медицинских организаций (далее - МО) в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия по полиомиелиту.

II. Общие положения

2.1. Исследования проб клинических материалов от больных полиомиелитом, ОВП и контактных с ними в очагах, выявленных в процессе реализации эпидемиологического надзора за полиомиелитом, позволяет установить этиологию заболевания, выявить источник инфекции и конкретных носителей полиовирусов, провести дальнейшее изучение изолятов полиовирусов и группы населения, где были обнаружены полиовирусы [1].

2.2. Выделение полиовирусов из проб фекалий является ключевым фактором для подтверждения или опровержения диагноза "Полиомиелит" у больных с синдромом ОВП.

2.3. Вирусологические исследования проб фекалий от здоровых (без ОВП) детей из "групп риска"³ позволяют выявить бессимптомных носителей полиовирусов, имеющих эпидемиологическую значимость (дикий полиовирус (далее - ДПВ), полиовирусы вакцинного происхождения (далее - ПВВП) любых типов) [3].

2.4. Исследования материалов от больных полиомиелитом, ОВП и контактных с ними в очагах, здоровых детей из "групп риска", проведенные в установленные сроки в соответствии с настоящими МУК, позволяют своевременно приступить к организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий [1, 2].

III. Отбор и направление проб на исследования

3.1. Отбор проб клинических материалов от больных полиомиелитом, ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска" проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴.

3.2. Оптимальный размер фекальной пробы 8 - 10 г.⁵ Пробы отбираются в специальные пластиковые емкости с закручивающейся крышкой для забора фекальных проб.

³ Пункт 2522 СанПиН 3.3686-21; главы VII, X МУ 3.1.1.4016-24.

⁴ Пункты 2446, 2479, 2480, 2522, 2524, 2525 СанПиН 3.3686-21.

⁵ Руководство по эпидемиологическому надзору за ОВП (англ. WHO. Global guidelines for acute flaccid paralysis (AFP) surveillance in the context of poliovirus eradication, 2023-polioeradication.org (в свободном доступе)).

3.3. Если получить фекалии от больного невозможно⁶, фекальную пробу можно отобрать из прямой кишки с помощью ректального тампона. Стерильный ватный тампон на деревянной палочке вводят в прямую кишку и протирают слизистую оболочку так, чтобы захватить фекальный материал. Тампон извлекают и, отломив палочку, помещают его в стерильную пробирку или флакон с 1 - 2 мл транспортировочной среды, или 0,9 % раствор NaCl.

3.4. При летальных случаях отбирают секционные пробы (кусочки ткани) из шейного и поясничного отделов спинного мозга, продолговатого мозга, Варолиева моста, нисходящего отдела толстой кишки. Пробы отбирают как можно раньше после наступления смерти. Ткани иссекают стерильными инструментами, помещают в отдельные стерильные пластиковые или стеклянные емкости с транспортировочной средой или 0,9 % раствором NaCl в количестве, обеспечивающем сохранение их влажными. Оптимальный объем каждой пробы из шейного и поясничного отделов спинного мозга, продолговатого мозга, Варолиева моста составляет 1 см³; из толстой кишки иссекают сегмент длиной 3-5 см, содержащий фекальные массы⁷.

3.5. Отбор проб сывороток крови.

3.5.1. Оптимальный объем сыворотки крови 3-5 мл. Если взятие крови из вены невозможно, проводят забор капиллярной крови объемом 0,3 - 0,4 мл. Для взятия крови используют стерильные емкости без антикоагулянтов и консервантов или специальные вакуумные пробирки с отделением сыворотки без смешивания с форменными элементами, в которых их доставляют в лабораторию.

3.5.2. При использовании стерильных емкостей пробы оставляют при комнатной температуре на 2 часа для свертывания крови. После образования сгустка его отделяют от стенки сосуда, пробу помещают в холодильник при температуре плюс 2 - 8 °С и спустя 24 часа отбирают сыворотку. Сыворотку осветляют центрифугированием при 1500 g в течение 5-10 минут и переносят стерильной пипеткой в стерильную емкость.

Перерасчет ускорения свободного падения (g) в число об/мин проводят по формуле (1):

$$g = (11,7 \times 10^{-7}) \times R N^2 \quad (1)$$

где: g - ускорение свободного падения;

R - радиус (мм) ротора центрифуги (от его оси до конца пробирки);

N - скорость в об/мин.

⁶ ВОЗ. Методические рекомендации "Клиника, диагностика и лечение острого полиомиелита", 1998 - fcgie.ru/page, 4, koord_tsentr.html (в свободном доступе) (далее - Методические рекомендации "Клиника, диагностика и лечение острого полиомиелита", 1998).

⁷ Методические рекомендации "Клиника, диагностика и лечение острого полиомиелита", 1998.

3.5.3. В случаях, когда отсутствует возможность воспользоваться центрифугой, или обработке подлежит сразу большое количество проб, с помощью стерильной пипетки необходимо осторожно отобрать сыворотку от сгустка так, чтобы в нее не попали выпавшие в осадок эритроциты. Во всех случаях необходимо предотвращать попадание в сыворотку эритроцитов, так как при хранении они подвергаются гемолизу, что влияет на результаты серологических исследований.

3.5.4. Если отсутствует возможность отделения сыворотки в стерильных условиях, пробы крови в день отбора целесообразно доставлять в учреждение, обеспечивающее деятельность территориального органа, осуществляющего федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор).

3.6. Отбор проб фекалий от здоровых детей из "групп риска" на исследование осуществляется также, как от больных полиомиелитом и ОВП (см. п.п. 3.2 - 3.3).

3.7. МО направляют пробы от больных полиомиелитом, ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска" в учреждения, обеспечивающие деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор).

3.8. Пробы от контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП направляют в ту же лабораторию, что и пробы от больного. Пробы от больных полиомиелитом и ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП направляются учреждениями, обеспечивающими деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁸, а также методическими документами⁹ в Национальную лабораторию по диагностике полиомиелита (далее - НЛДП) или лабораторию регионального центра по эпидемиологическому надзору за полиомиелитом и ОВП (далее - РЦ ПОЛИО/ОВП) (приложение 1 к настоящим МУК).

3.9. Пробы фекалий от здоровых детей из "групп риска", от детей в возрасте до 5 лет из организаций для детей-сирот и детей, оставшихся без попечения родителей, направляют на исследование в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁰, а также методическими документами¹¹.

3.10. До отправления любых проб отправитель информирует получателя в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹².

⁸ Пункты 2447, 2449-2452, 2454 СанПиН 3.3686-21.

⁹ Пункты 8.4, 8.5, 8.7, 8.8 МУ 3.1.1.4016-24.

¹⁰ Пункты 2452-2455 СанПиН 3.3686-21.

¹¹ Пункты 10.5, 10.6 МУ 3.1.1.4016-24.

¹² Пункты 2448, 2569 СанПиН 3.3686-21.

3.11. НЛДП, РЦ ПОЛИО/ОВП направляют результаты исследований (положительные или отрицательные) проб от больных полиомиелитом, ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска" в учреждения, обеспечивающие деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), направившие материалы, а также в Координационный центр профилактики полиомиелита и энтеровирусной (неполио) инфекции Роспотребнадзора. Целесообразно направлять результаты в течение 24 часов с момента их получения.

3.12. Учреждениям, обеспечивающим деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), целесообразно в течение 24 часов с момента получения результатов из НЛДП, РЦ ПОЛИО/ОВП направить их в территориальный орган, осуществляющий федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), и в МО, которая организовала отбор проб.

IV. Транспортирование материалов

4.1. Транспортирование проб от больных полиомиелитом и ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, от здоровых детей из "групп риска" осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹³, а также методическими документами¹⁴. Рекомендуемые сроки доставки проб фекалий от здоровых детей из "групп риска" такие же, как для проб от

больных полиомиелитом и ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП¹⁵. О задержке доставки и условиях хранения проб организация-отправитель уведомляет получателя (НЛДП или РЦ ПОЛИО/ОВП).

4.2. Все виды проб доставляют с документацией, оформленной в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁶.

4.2.1. Пробы фекалий от больных полиомиелитом и ОВП доставляются с направлением на лабораторное (вирусологическое) исследование проб фекалий от больного полиомиелитом, ОВП (далее - направление), оформленным в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹⁷. Сведения в направлении должны совпадать с картой эпидемиологического расследования случая полиомиелита и ОВП¹⁸.

¹³ Пункты 2486, 2564-2571 СанПиН 3.3686-21.

¹⁴ Пункты 8.7, 8.8, 8.9 МУ 3.1.1.4016-24.

¹⁵ Пункт 8.7 МУ 3.1.1.4016-24.

¹⁶ Пункты 2564, 2568, приложение 26, таблица 17 приложения 7 СанПиН 3.3686-21.

¹⁷ Пункт 2447, приложение 26 СанПиН 3.3686-21.

¹⁸ Приложение 23 СанПиН 3.3686-21.

Форма направления также используется для транспортирования других видов клинического материала от случаев полиомиелита и ОВП (сыворотки крови, цереброспинальная жидкость, аутопсийный материал), проб фекалий от контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, проб фекалий от детей из "групп риска"¹⁹.

4.2.2. При заполнении направления на пробы фекалий от детей из "групп риска" в нем не указывается эпидемиологический номер, но вносится следующая информация:

- отношение обследуемого лица к "группе риска" (указывается территория, откуда прибыл, дата прибытия или кочующая группа населения);

- данные о полученных профилактических прививках против полиомиелита (число полученных прививок, дата проведения последней прививки, наименование иммунобиологического лекарственного препарата и его серия).

4.3. Для транспортирования изолятов полиовирусов и неполиовирусов (далее - НПЭВ) используют пластиковые пробирки с винтовыми крышками с наружной резьбой²⁰. Транспортирование осуществляют при температуре плюс 2-8 °С. Если отправление изолятов задерживается, до отправки их хранят при температуре не выше минус 20 °С, и доставляют при температуре хранения²¹.

4.4. Все виды материалов маркируют этикеткой, на которой указывают идентификационный номер, тип пробы, дату отбора.

4.5. При транспортировании материалов в лабораторию соблюдают принцип тройной упаковки²².

4.5.1. Первичная емкость - маркированный контейнер, пробирка или флакон с завинчивающейся крышкой, в который помещают пробу. Для дополнительной герметизации используют лабораторную пленку.

4.5.2. Вторичная емкость - прочный водонепроницаемый, не протекающий контейнер (или полиэтиленовый пакет) с адсорбирующим материалом в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его протечки. Во вторичную емкость помещают контейнер, пробирку или флакон с пробой. Направление²³, вложенное в полиэтиленовый пакет, закрепляют клеевой лентой снаружи вторичной емкости. Образцы от каждого пациента упаковываются отдельно.

4.5.3. Внешняя упаковка - прочный термоизолирующий контейнер или термос, предназначенный для транспортирования биологических материалов. Для обеспечения температурных условий при транспортировании в термоконтейнеры помещают охлаждающие элементы. На внешней поверхности термоизолирующего контейнера, термоса закрепляют этикетку с указанием данных отправителя и получателя (почтового адреса, номера телефона, адреса электронной почты), условий транспортирования.

¹⁹ Пункты 8.9, 10.4 МУ 3.1.1.4016-24.

²⁰ Пункт 2552 СанПиН 3.3686-21; ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004 (англ. WHO. Polio Laboratory Manual. 4th ed. 2004 - iris.who.int (в свободном доступе) (далее - ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004).

²¹ Пункт 2553 СанПиН 3.3686-21.

²² Пункт 524, пункт 8 приложения 8 СанПиН 3.3686-21; ВОЗ. Руководство по правилам перевозки инфекционных веществ, 2021-2022 (англ. WHO. Guidance on regulations for the transport of infectious substances, 2021-2022 - who.int/publications/i/item/9789240019720 (в свободном доступе).

²³ Приложение 26 СанПиН 3.3686-21.

V. Подготовка проб к исследованию

5.1. Сразу после доставки в лабораторию упаковочную коробку, термоконтейнер или термос распаковывают в отведенной для этого зоне, с соблюдением требований биологической безопасности²⁴. Все работы по подготовке для исследования проб клинических материалов от больных полиомиелитом и ОВП, контактных в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска" проводятся в боксе микробиологической безопасности 2 класса (далее - БМБ 2 класса)²⁵.

5.2. В зоне, где происходит распаковка, должны иметься емкость для сбора отходов класса Б, тампоны, смоченные дезинфицирующим раствором, активным в отношении полиовирусов и НПЭВ, БМБ 2 класса²⁶. Емкости с пробами помещаются на поднос или лоток, покрытый многослойной марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором. Персонал лаборатории использует маску и резиновые перчатки.

5.3. Внешнюю упаковку и охлаждающие элементы обеззараживают, вторичную емкость обеззараживают и утилизируют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями²⁷, а также методическими документами²⁸, первичная емкость хранится вместе с пробами.

²⁴ Глава IV СанПиН 3.3686-21; ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

²⁵ Пункт 333 СанПиН 3.3686-21; ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

²⁶ Глава IV СанПиН 3.3686-21; глава X СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 3 (зарегистрировано Минюстом России 29.01.2021, регистрационный N 62297), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.06.2021 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 07.07.2021, регистрационный N 64146), от 14.12.2021 N 37 (зарегистрировано Минюстом России 30.12.2021, регистрационный N 66692), от 14.02.2022 N 6 (зарегистрировано Минюстом России 17.02.2022, регистрационный N 67331); ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

²⁷ Пункт 338, таблицы 3, 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

²⁸ МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения", утвержденные Минздравом России 30.12.1998 (далее - МУ-287-113).

5.4. При распаковке материалов в лаборатории проверяют полноту сопроводительных документов, соответствие сведений на этикетке и в направлении, оценивают и фиксируют в рабочих записях состояние поступивших проб ("удовлетворительное" или "неудовлетворительное", нарушения упаковки, целостность емкостей с пробами, протечки проб, соблюдение температурного режима). "Удовлетворительными" считают пробы, доставленные в достаточном объеме, с соблюдением температурного режима, без нарушения упаковки и протечки проб, без нарушений при заполнении документации.

5.5. Обо всех выявленных при распаковке материалов нарушениях, случаях несовпадения информации на этикетке и в направлении, неполной информации на этикетке и (или) в направлении, нарушениях упаковки, протечках проб сообщают в организацию, направившую материал для исследования.

5.6. Каждой пробе присваивают идентификационный номер, который сопровождает все документы и емкости (центрифужные пробирки, флаконы или пробирки с культурой клеток), относящиеся к данной пробе в процессе ее исследования и хранения в лаборатории, проводящей исследования.

5.7. Приготовление проб к исследованию начинают в течение 48 часов с момента получения проб. В этот период пробы хранят при температуре плюс 2-8 °С. Если исследование проб фекалий будет начато позже 48 часов, пробы хранят при температуре не выше минус 20 °С.

5.8. Перед приготовлением фекальной суспензии исходную пробу делят пополам. Одну часть пробы используют для приготовления фекальной суспензии, вторую - хранят при температуре не выше минус 20 °С на случай возникновения необходимости направления пробы в НЛДП или прове-

дения повторного исследования исходной пробы.

5.9. Перед исследованием на культуре клеток фекальные пробы обрабатывают хлороформом для удаления бактерий, грибов, цитотоксических липидов, разъединения вирусных агрегатов.

5.10. Для приготовления 10-20 % фекальной суспензии устойчивые к хлороформу полиэтиленовые центрифужные пробирки емкостью 50 мл маркируют номером пробы. В каждую пробирку вносят 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора (далее - ФСБ) с антибиотиками (приложение 2 к настоящему МУК), 1 г стеклянных бусин и 1 мл хлороформа. Затем в пробирку вносят 2 г фекальной пробы. Плотнo закрывают центрифужную пробирку и тщательно встряхивают в течение 20 минут в механическом шейкере или вручную. Центрифугируют 20 минут при 1500 g в центрифуге с охлаждением. Перерасчет ускорения свободного падения (g) в число об/мин проводят по формуле (1).

Надосадочную жидкость каждой пробы переносят в два маркированных флакона с закручивающейся крышкой. Если жидкость непрозрачная, обработку хлороформом повторяют. Суспензию из одного флакона используют для исследования, второй флакон хранят при температуре не выше минус 20 °С для повторного исследования, если это будет необходимо.

5.11. Пробы, отобранные с помощью метода ректальной "соломинки", готовят для исследования так же, как и фекальные пробы.

5.12. Если проба была отобрана с помощью ректального тампона, то емкость, содержащую тампон в транспортировочной среде или 0,9 % растворе NaCl, тщательно встряхивают в механическом шейкере или вручную для того, чтобы фекальный материал перешел в жидкость. Стерильным пинцетом плотно прижимают тампон к стенке емкости и отжимают жидкость. Далее вносят 0,5 мл хлороформа и встряхивают, как описано в п. 5.10. Полученную жидкость переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 минут при 1500 g в центрифуге с охлаждением. Перерасчет ускорения свободного падения (g) в число об/мин проводят по формуле (1).

Надосадочную жидкость переносят в два маркированных флакона: жидкость из одного флакона используют для исследования, второй - хранят при температуре не выше минус 20 °С.

5.13. Для исследования секционных материалов (кусочки тканей, помещенных в транспортировочную среду), готовят 10 % суспензию в ФСБ с антибиотиками отдельно для каждой пробы. Кусочки тканей гомогенизируют в измельчителе (или растирают пестиком в охлажденной ступке с песком и 10 мл ФСБ). Переносят жидкость в центрифужную пробирку и центрифугируют 20 минут при 1500 g в центрифуге с охлаждением. Перерасчет ускорения свободного падения (g) в число об/мин проводят по формуле (1).

Надосадочную жидкость переносят в два маркированных флакона: жидкость из одного флакона используют для исследования, второй - хранят при температуре не выше минус 20 °С.

5.14. Участок толстой кишки вместе с содержимым используют для приготовления 20 % суспензии и обрабатывают так же, как пробы фекалий.

VI. Проведение вирусологических исследований²⁹

6.1. Для выделения полиовирусов из проб используют перевиваемые линии культур клеток RD и L20B. Использование комбинации этих двух клеточных линий обеспечивает высокую чувствительность и специфичность выявления полиовируса. Схема выделения вирусов на культурах клеток представлена в приложении 3 к настоящему МУК. Поддержание клеточных культур в лаборатории выполняют в соответствии с методическими документами³⁰. При проведении вирусологических исследований применяются средства измерений, вспомогательное и испытательное оборудование, расходные материалы и реактивы в соответствии с приложением 6 к настоящему МУК.

²⁹ ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

³⁰ ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

6.2. RD - клетки рабдомиосаркомы человека, чувствительные к полиовирусам, вирусам ECHO, некоторым вирусам Коксаки А (CVA), за исключением CVA1, CVA19, CVA22, энтеровирусам EV-A71, EV-D68. Вирусы Коксаки В могут проявлять цитопатический эффект (далее - ЦПЭ) на клетках RD.

6.3. L20B - линия мышечных клеток (L-клеток), способная экспрессировать рецептор полиовируса. Клетки L20B избирательно чувствительны к полиовирусам, которые вызывают в них

характерный ЦПЭ. Ряд вирусов, не относящихся к энтеровирусам (аденовирусы, реовирусы), могут вызывать ЦПЭ в клетках L20B, который отличается от ЦПЭ, свойственного полиовирусам.

6.4. Использование культуры клеток HEp-2 (Cincinnati), чувствительной к полиовирусам и вирусам Коксаки В, является факультативным.

6.5. НЛДП получает культуры клеток по запросу из лабораторий Глобальной лабораторной сети по полиомиелиту ВОЗ, РЦ ПОЛИО/ОВП - из НЛДП, учреждения, обеспечивающие деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор) - в РЦ ПОЛИО/ОВП, за которым они закреплены.

6.6. После получения клеточного материала РЦ ПОЛИО/ОВП создают банк клеток. Лаборатории учреждений, обеспечивающих деятельность территориальных органов, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), закрепленные за РЦ ПОЛИО/ОВП, создают банк клеток при наличии возможностей. Запас каждой линии культуры клеток составляет не менее 12 ампул, которые используются по мере необходимости для создания рабочей линии клеток.

6.7. Для сохранения чистоты, аутентичности и стабильности клеточных культур следует заменять рабочую линию после 3-х месяцев или 15 пассажей культивирования в лаборатории.

6.8. Все действия с культурами клеток фиксируют в рабочих записях обозначая тип клеток, номер пассажа, дату получения, дату посева и все смены среды, наименования использованных реактивов, их серии и сроки годности.

6.9. Все работы с неинокулированными культурами клеток проводятся в отдельном боксированном помещении, расположенном в "заразной зоне" лаборатории, в БМБ 2 класса.

6.10. Для предотвращения перекрестной контаминации между различными типами клеточных культур не допускается работа с несколькими культурами клеток одновременно.

6.11. Все неинокулированные культуры клеток следует считать потенциально опасными, поэтому после окончания работы все культуральные жидкости и культуры обеззараживают в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³¹, а также методическими документами³².

6.12. Для контроля чувствительности культур клеток к полиовирусам проводят ежеквартальное титрование референс-штаммов полиовирусов (вакцинных штаммов Сэбина) (далее - референс-штаммы), имеющихся в коллекции в лаборатории, на каждой из культур клеток после 8-10 пассажей (приложение 4 к настоящим МУК).

6.12.1. Если титр референс-штаммов не отличается от заранее установленного значения ожидаемого титра или отличается от него в пределах $\pm 0,5 \lg$, чувствительность клеток не изменилась.

6.12.2. Превышение ожидаемого значения на $0,5 \lg$ или более может быть связано с погрешностями в приготовлении разведений вируса.

6.12.3. Снижение титра по сравнению с ожидаемым на $0,5 \lg$ или более может указывать на снижение чувствительности клеток. В этом случае выполняют титрование новой порции референс-штамма. Одновременно проверяют возможные изменения в условиях культивирования клеток. Если низкий титр воспроизводится при титровании новой порции, а изменений в условиях культивирования клеток не выявлено, используемые клетки необходимо заменить из клеточного банка лаборатории или получить по запросу в НЛДП или в РЦ ПОЛИО/ОВП.

6.13. Микроскопируют культуры с недавно сформированным монослоем клеток RD и L20B, выращенным на поверхности пластиковых флаконов площадью 25 см^2 или пробирок (нормальный монослой формируется в течение 2-3 дней после посева клеток). Ростовую среду, содержащую сыворотку, заменяют поддерживающей средой (8-10 мл на флакон, 1,0-1,5 мл на пробирку). Флаконы или пробирки маркируют, указывая номер пробы, дату инокуляции, номер пассажа. Для исследований одной пробы используют по одному флакону или по две пробирки каждой культуры на один пассаж. По одному флакону или пробирке с каждым типом клеток оставляют незараженными в качестве отрицательного контроля.

6.14. Флаконы или пробирки с клетками обеих линий инокулируют одновременно, внося заражающий материал из расчета 0,4-0,6 мл во флакон или 0,2 мл в пробирку. Культуры инкубируют при температуре плюс 36°C , ежедневно микроскопируют, наблюдая за появлением ЦПЭ (приложение 3 к настоящим МУК).

6.15. Результаты наблюдений за инокулированными и контрольными культурами регистрируют в рабочих записях, указывая дату заражения, даты учета результатов, результаты наблюдения за

развитием ЦПЭ фиксируют в рабочих записях. Развитие ЦПЭ, охватывающего 25 % монослоя, обозначают 1+; 25-50 % обозначают 2+; 50-75 % обозначают 3+; 75-100 % обозначают 4+.

³¹ Глава IV, таблицы 3, 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

³² МУ-287-113.

6.16. Быстрая дегенерация клеток в течение одного-двух дней после инокуляции может быть вызвана неспецифической токсичностью пробы. Культуры, проявившие признаки неспецифической дегенерации, замораживают при температуре не выше минус 20 °С, оттаивают и пассируют на клетках того же типа. Если признаки токсичности проявляются снова, возвращаются к исходной фекальной суспензии, разводят ее 1:10 в ФСБ и повторяют процесс инокуляции (см. п. 6.14).

6.17. В случае бактериальной контаминации среды, возвращаются к исходному экстракту пробы, вновь обрабатывают его хлороформом, повторяют процедуры инокуляции (см. п. 6.14).

6.18. За появлением признаков ЦПЭ на зараженных клетках наблюдают не менее 5 дней.

6.18.1. При отсутствии ЦПЭ на любой из культур клеток проводят "слепой" пассаж в той же культуре клеток. Если результат отсутствия ЦПЭ повторяется, то результат считается негативным.

6.18.2. После появления характерного для энтеровирусов ЦПЭ (признаков разрушения культуры клеток, которые могут свидетельствовать о наличии НПЭВ), оцененного как 3+ и (или) 4+, прекращают инкубацию, культуру замораживают при температуре минус 20 °С. После этого пробу оттаивают и проводят перекрестный пассаж в другой линии клеток:

- из RD в L20B - для выяснения, не является ли полученный ЦПЭ полиовирусом;
- из L20B в RD - для накопления выделенного полиовируса в клетках RD.

Время наблюдения появления ЦПЭ при перекрестном пассаже - до 5 дней.

6.18.3. В случае наличия ЦПЭ на культуре клеток L20B и его повторения в клетках RD результат учитывается как LR+.

6.18.4. В случае наличия ЦПЭ на культуре клеток RD и его повторения в клетках L20B, проводят дополнительный пассаж в клетках RD для накопления вируса, результат учитывают как RLR+.

6.18.5. В случае наличия ЦПЭ на культуре клеток RD и его отсутствия в клетках L20B, проводят пассаж исходного материала с клеток RD в клетках RD для накопления вируса, результат учитывают как НПЭВ.

6.18.6. Если ЦПЭ после перекрестного пассажа не повторяется, то результат учитывают как негативный.

6.18.7. Если ЦПЭ появился в зараженных клетках после "слепого" пассажа, производится перекрестный пассаж по схеме, описанной в пункте 6.18.2.

6.19. Общий срок наблюдения за культурами с отрицательным результатом составляет не менее 10 дней.

6.20. Изоляты полиовирусов и НПЭВ, выделенные в РЦ ПОЛИО/ОВП из материалов от больных полиомиелитом, ОВП и контактных с ними в очагах доставляют³³ в НЛДП, рекомендуемый срок доставки материала - 72 часа от момента получения результата с предварительным уведомлением.

³³ Пункт 2450 СанПиН 3.3686-21.

6.21. Изоляты полиовирусов, выделенные в РЦ ПОЛИО/ОВП из проб фекалий от детей из "групп риска", целесообразно доставлять³⁴ в НЛДП в течение 72 часов от момента получения результата с предварительным уведомлением.

6.22. Изоляты НПЭВ, выделенные в РЦ ПОЛИО/ОВП из проб фекалий от детей из "групп риска", направляются для идентификации в Референс-центр по мониторингу за энтеровирусными инфекциями, на базе ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (далее - референс-центр по мониторингу за энтеровирусными инфекциями), Дальневосточный региональный научно-методический центр по изучению энтеровирусных инфекций, на базе ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора или Урало-Сибирский региональный научно-методический центр по изучению энтеровирусных инфекций, на базе ФБУН ФНИИВИ "Виром" Роспотребнадзора³⁵ (далее - Дальневосточный или Урало-Сибирский региональные научно-методические центры по изучению энтеровирусных инфекций) по предварительному согласо-

ванию (сроки, количество, вид направляемого материала)³⁶.

6.23. При получении неопределенных или трудно интерпретируемых результатов, выделенный инфекционный агент направляется в НЛДП для идентификации³⁷, рекомендуемый срок доставки - 72 часа.

VII. Идентификация изолятов и внутритиповая дифференциация полиовирусов

7.1. Идентификацию выделенных L20B+ изолятов (определение их принадлежности к полиовирусам или НПЭВ) и внутритиповую дифференциацию (далее - ВТД) полиовирусов проводит НЛДП методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (далее - ОТ-ПЦР).

7.2. Для идентификации изолятов могут быть использованы тест-системы для проведения исследований методом ОТ-ПЦР, зарегистрированные и разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке³⁸.

³⁴ Пункт 2450 СанПиН 3.3686-21.

³⁵ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116 "О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации" (далее - приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116); приказ Роспотребнадзора от 19.12.2016 N 1236 "О совершенствовании эпидемиологического надзора за ЭВИ" (далее - приказ Роспотребнадзора от 19.12.2016 N 1236).

³⁶ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116 "О совершенствовании системы мониторинга и лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации"; пункт 5 приказа Роспотребнадзора от 19.12.2016 N 1236 "О совершенствовании эпидемиологического надзора за ЭВИ".

³⁷ Пункт 2450 СанПиН 3.3686-21.

³⁸ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 N 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации" (далее - Федеральный закон от 21.11.2011 N 323-ФЗ); постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 N 1416 "Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий" (далее - постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 N 1416).

7.3. ВТД проводится в течение 5 дней от момента получения материала из РЦ ПОЛИО/ОВП или получения ЦПЭ в НЛДП.

7.4. В случае получения результатов ВТД, указывающих на принадлежность полиовируса к ДПВ, ПВВП любых типов, вакциноподобному полиовирусу типа 2 (далее - ПВ типа 2), в том числе в виде смеси с вакциноподобными полиовирусами типов 1 и (или) 3, или НПЭВ, НЛДП в течение 7 дней от момента получения результатов проводит секвенирование участка генома белка VP1 изолята полиовируса.

VIII. Идентификация выделенных неполиоэнтеровирусов

8.1. Идентификация изолятов НПЭВ (установление типа) может быть выполнена с помощью молекулярно-генетического (секвенирование, ОТ-ПЦР) или серологического метода (в реакции нейтрализации на культуре клеток микрометодом).

8.2. Идентификацию НПЭВ с помощью молекулярно-генетических методов проводят в соответствии с методическими документами³⁹.

8.3. Реакция нейтрализации выполняется в соответствии с методическими документами⁴⁰. Идентификацию изолята НПЭВ проводят на той культуре, на которой он выделен.

8.4. Для идентификации НПЭВ могут быть использованы тест-системы для проведения исследований методом ОТ-ПЦР, зарегистрированные и разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке⁴¹ в соответствии с методическими документами⁴² и инструкциями производителей.

IX. Сроки хранения материалов

9.1. При получении положительного результата все материалы хранят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴³ до получения окончательного результата из лаборатории, проводящей идентификацию (для полиовирусов - из НЛДП, для НПЭВ - из референс-центра

по мониторингу за энтеровирусными инфекциями, Дальневосточного или Урало-Сибирского

³⁹ МР 4.2.0327-23 "Молекулярное типирование энтеровирусов", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 06.06.2023.

⁴⁰ ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

⁴¹ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 N 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 N 1416.

⁴² МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащем микроорганизмы I-IV групп патогенности", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009.

⁴³ Пункт 2556 СанПиН 3.3686-21.

региональных научно-методических центров по изучению энтеровирусных инфекций) и после получения окончательного результата обеззараживают в автоклаве и утилизируют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴⁴, а также методическими документами⁴⁵, за исключением специальных распоряжений по хранению.

9.2. Пробы фекалий, фекальные суспензии, кроме положительных на полиовирус типа 2 любого происхождения, от больных полиомиелитом и ОВП, контактных лиц в очагах полиомиелита и ОВП, от здоровых детей из "групп риска" хранят при температуре не выше минус 20 °С⁴⁶. Рекомендуемый срок хранения - не менее 4 месяцев от момента поступления в лабораторию на исследование. После истечения срока хранения материалы обеззараживают в автоклаве в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴⁷, а также методическими документами⁴⁸.

9.3. При получении результата ВТД, указывающего на содержание в пробе ДПВ, ПВВП любого типа, ПВ типа 2, все материалы (исходная проба, фекальная суспензия, изолят) по согласованию с НЛДП обеззараживаются и утилизируются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁴⁹, а также методическими документами⁵⁰ или передаются в НЛДП. Целесообразно проводить обеззараживание, утилизацию или направление материалов в НЛДП в течение 72 часов с момента получения результата ВТД.

Х. Серологические исследования материала от больных полиомиелитом и с синдромом острого вялого паралича

10.1. Выявление специфических антител к полиовирусам типов 1, 2, 3 в сыворотках крови от больных полиомиелитом и ОВП проводят с диагностической целью в реакции нейтрализации инфекционности микрометодом (приложение 5 к настоящим МУК).

10.2. В основе определения титров антител с помощью реакции нейтрализации лежит принцип взаимодействия известного вируса с гомологичными антителами, присутствующими в сыворотке, что проявляется в виде отсутствия ЦПЭ на культуре клеток.

10.3. Для реакции нейтрализации с целью выявления антител к полиовирусу используют клетки НЕР-2 (Cincinnati).

⁴⁴ Глава IV, таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁵ МУ-287-113.

⁴⁶ Пункт 2553, 2556 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁷ Глава IV, таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁸ МУ-287-113.

⁴⁹ Глава IV, таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21; МУ-287-113.

⁵⁰ МУ-287-113.

10.4. Предварительно готовят рабочие запасы референс-штаммов (приложение 4 к настоящим МУК), используя для пассажа штаммы, полученные в НЛДП (выполняют не более 3-х последовательных пассажей на культуре клеток НЕР-2 при температуре плюс 36 °С). Рабочие запасы референс-штаммов разливают на аликвоты, достаточные для проведения одного опыта, в пластиковые флаконы с завинчивающейся крышкой, маркируют и хранят при температуре от минус 20 °С до минус 70 °С. Перед проведением реакции нейтрализации определяют титр референс-штаммов, исходя из которого рассчитывают рабочее разведение вируса каждого типа так, чтобы в 100 мкл ви-

руссодержащей жидкости содержалось 50 ТЦД₅₀ (допускаются колебания в интервале 50-200 ТЦД₅₀).

10.5. В каждый опыт включают контрольное титрование референс-сыворотки - сыворотки с известным уровнем нейтрализующей активности. Референс-сыворотка представляет собой смесь сывороток взрослых людей, недавно иммунизированных бустер-дозой полиомиелитной вакцины. Сыворотку разливают на аликвоты, которые хранят при температуре минус 20 °С.

XI. Техника безопасности при работе с материалами, инфицированными или потенциально инфицированными полиовирусом

11.1. Мероприятия по обеспечению биологической безопасности при проведении исследований на полиовирусы организуются в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵¹ а также методическими документами⁵².

11.2. К работе допускаются сотрудники, имеющие защитные титры вируснейтрализующих антител к полиовирусам. Иммунизация лиц, работающих с материалом, инфицированным или потенциально инфицированным ДПВ, ПВВП любого типа, ПВ типа 2, проводится в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵³.

11.3. Все используемое лабораторное оборудование должно иметь инструкции по эксплуатации. Допустимо использование инструкций на бумажных и/или электронных носителях.

⁵¹ Глава IV, приложения 2-3, пункты 2545-2571 СанПиН 3.3686-21.

⁵² МУ-287-113.

⁵³ Пункты 2499, 2500 СанПиН 3.3686-21.

11.4. Контейнеры из-под первичного материала, использованная одноразовая посуда, наконечники микропипеток, микротитровальные планшеты, пипетки и прочие расходные материалы во время проведения работ собирают в емкости, предназначенные для сбора отходов класса Б. После окончания работ - обеззараживают в автоклаве в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵⁴, а также методическими документами⁵⁵. Стеклопосуду обеззараживают дезинфицирующими средствами с вирулицидной активностью в отношении полиовирусов, зарегистрированными и разрешенными к применению в Российской Федерации в установленном порядке⁵⁶.

11.5. Обеззараживание рабочих поверхностей, оборудования проводят дезинфицирующими средствами с вирулицидной активностью в отношении полиовирусов, и последующей обработкой ультрафиолетом в соответствии с методическими документами⁵⁷.

11.6. Для снижения риска распространения ДПВ, ПВВП любого типа, ПВ типа 2 соблюдают следующие правила:

- использование ДПВ, ПВВП любого типа, ПВ типа 2 прекращается во всех случаях, где ту же задачу можно выполнить при помощи аттенуированных вакцинных штаммов полиовирусов типа 1 и 3, инаktivированных антигенов или НПЭВ;

- во всех случаях, когда отсутствует необходимость хранения полиовирусов, все запасы вирусов и потенциально инфицированных ими материалов, обеззараживают в автоклаве в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁵⁸, а также методическими документами⁵⁹.

11.7. При приготовлении и титровании референс-штаммов одновременно работают только с вирусом одного типа. Оптимальным является работа с вирусом каждого типа в отдельные дни.

⁵⁴ Глава IV, таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

⁵⁵ МУ-287-113.

⁵⁶ Раздел II Единого перечня продукции (товаров), подлежащей государственному санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории Евразийского экономического союза, утвержденного решением Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 N 299, с изменениями, внесенными решениями Комиссии Таможенного союза от 17.08.2010 N 341, от 20.09.2010 N 383, от 14.10.2010 N 432, от 18.11.2010 N 456, от 02.03.2011 N 566, от 18.10.2011 N 828, от 09.12.2011 N 859, решениями Совета Евразийской экономической комиссии от 15.06.2012 N 36, от 24.08.2012 N 73, от 17.12.2012 N 115, от 18.09.2014 N 78, от 02.12.2015 N 82, от 14.06.2018 N 64, от 22.02.2019 N 8, от 09.09.2019 N 97, от 04.09.2020 N 65, от 29.10.2021 N 109, от 18.02.2022 N 15, от 17.03.2022 N 28, от 25.01.2023 N 6, от 14.05.2024 N 51.

⁵⁷ Р 3.5.1.4025-24 "Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях", утвержденное руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 31.05.2024.

⁵⁸ Глава IV, таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

⁵⁹ МУ-287-113.

Приложение 1 к МУК 4.2.4064-24

Перечень лабораторий, проводящих вирусологические исследования клинических материалов от больных полиомиелитом и ОВП, с подозрением на эти заболевания, контактных с ними в очагах полиомиелита и ОВП, здоровых детей из "групп риска" ⁶⁰

Наименование лаборатории	Организация, на базе которой функционирует лаборатория	Почтовый адрес	Телефон	Адрес электронной почты
Национальная лаборатория по диагностике полиомиелита	ФГАНУ "ФНЦИ-РИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита)	108819, г. Москва, поселение Московский, пос. Института полиомиелита, двлд. 8, корп. 1	+7 (495) 841 90 54	lubov_i_k@mail.ru; ivanova_oe@chumakovs.su; karpova_ev@chumakovs.su
лаборатория Московского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве"	129626, г. Москва, Графский переулок, 4, корп. 2, 3, 4	+7 (495) 687 36 16	poliolab@mossanepid.ru
лаборатория Омского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области"	644116, г. Омск, 27-я Северная, 42а	+7 (3812) 68 08 37	virus@mail.omsksanepid.ru
лаборатория Санкт-Петербургского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера	197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, 14	+7 (812) 644 63 47	kanaeva@pasteurorg.ru
лаборатория Свердловского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области"	620219, г. Екатеринбург, Отдельный пер., 3	+7 (343) 374 35 96	snitkovskaya_te@66.rospotrebnadsor.ru
лаборатория Ставропольского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае"	355008, г. Ставрополь, ул. Фадеева, 4	+7 (865) 294 65 93	poliost@fbuz26.ru
лаборатория Хабаровского РЦ ПОЛИО/ОВП	ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае" Роспотребнадзора	680009, г. Хабаровск, ул. К.Маркса, 109б	+7 (421) 227 47 72	khvvir@gmail.com

Приложение 2
к МУК 4.2.4064-24

Приготовление сред и растворов

1. Фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2 - 7,4

1.1. Допускается применение готовых сред, растворов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке ⁶¹.

1.2. Неполный раствор ФСБ, не содержащий ионы кальция или магния, можно использовать для отмывания клеток.

1.3. Приготовление раствора А (неполный раствор ФСБ):

Состав: NaCl 8,0 г, KCl 0,2 г, Na₂HPO₄ 1,15 г, KН₂PO₄ 0,2 г.

Ингредиенты растворяют в дистиллированной воде, добавляют 2 мл 0,4 % фенолового красного - индикатора pH, доводят до 800 мл и автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 минут.

1.4. Полный раствор ФСБ используется для приготовления экстрактов проб и для разведения вирусов, присутствие ионов Са и Mg стабилизирует вирусы (полиовирус и НПЭВ).

1.5. Приготовление раствора В:

MgCl₂ • 6H₂O 0,10 г растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 минут.

1.6. Приготовление раствора С:

CaCl₂ 0,10 г растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Автоклавируют при 0,7 атм в течение 15 минут.

1.7. Рабочий раствор полного ФСБ:

К 8 частям раствора А добавляют 1 часть раствора В и 1 часть раствора С. Допускается использование таблетированной формы 0,01 М раствора ФСБ pH 7,40 ± 0,2.

2. Среда для транспортирования вирусов

2.1. Состоит из основного солевого раствора Хэнкса, доведенного до pH 7,4 буфером HEPES с 0,2 % бычьего сывороточного альбумина. В среду добавляют антибиотики - пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) (или гентамицин из расчета 30 - 50 мкг/мл) и феноловый красный в качестве индикатора. Среду разливают по 2,5 мл в надежно закрытые флаконы, хранят при температуре от 0 °С до плюс 8 °С в течение 4-6 недель.

2.2. Основной солевой раствор Хэнкса может быть заменен средой для культур клеток. В исключительных случаях в качестве транспортировочной среды можно использовать стерильный 0,9 % раствор NaCl.

⁶¹ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 N 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 N 1416.

Приложение 3
к МУК 4.2.4064-24

Схема выделения вирусов на культурах клеток

СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

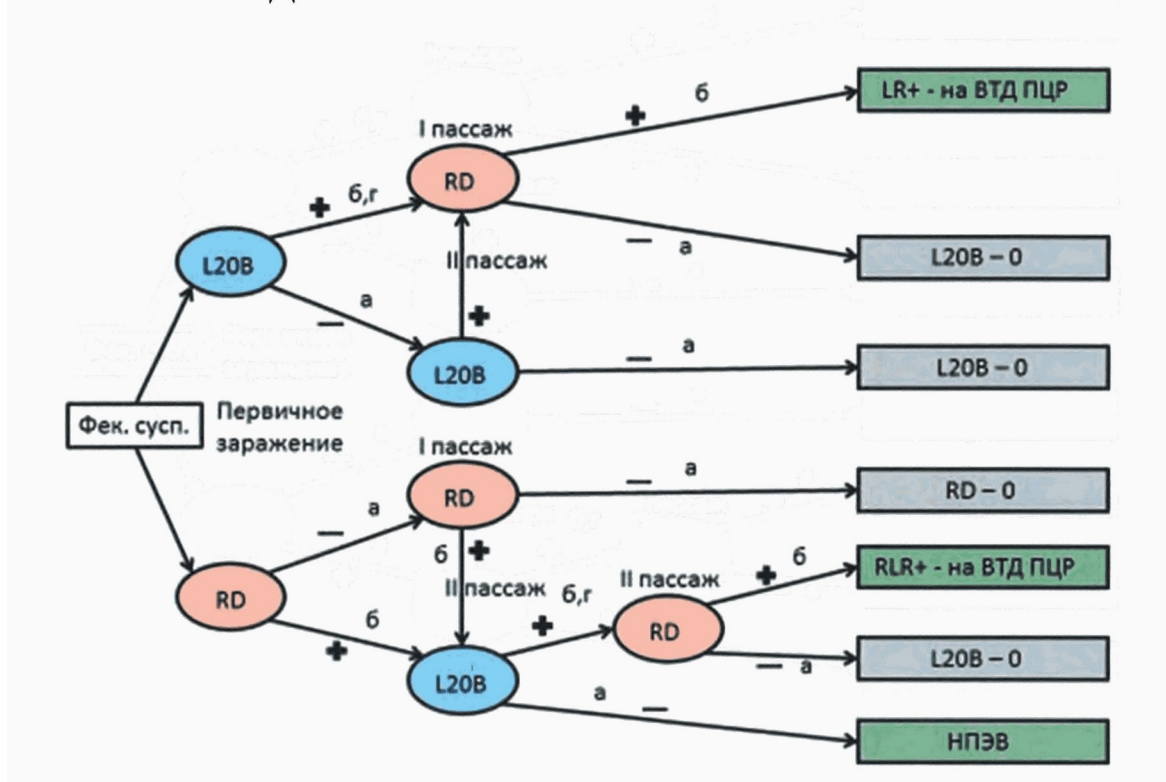


Рис. 1. Схема выделения вирусов на культурах клеток

Приложение 4
к МУК 4.2.4064-24

Приготовление и титрирование референс-штаммов полиовирусов (вакцинных штаммов Сэбина)

1. Приготовление рабочих запасов референс-штаммов⁶²

1.1. Готовят флакон площадью 25 см² с культурой клеток НЕр-2 (Cincinnati), сформировавшей сливной здоровый монослой в течение 2-3 дней. Маркируют флакон, указывая вид культуры, дату инокуляции, лабораторный номер референс-штамма.

1.2. Сливают ростовую среду и ополаскивают клеточный слой ФСБ.

1.3. Вносят во флакон 0,2 мл вирусосодержащей жидкости из пробирки с прототипным референс-штаммом, полученным в НЛДП. Оставшееся количество прототипного референс-штамма хранят при температуре не выше минус 20 °С.

1.4. Инкубируют культуру при температуре плюс 36 °С в течение 1 часа, периодически осторожно покачивая флакон для лучшей адсорбции вируса.

1.5. Добавляют поддерживающую среду (около 10 мл), содержащую 5 % сыворотки плодов коровы. Флакон помещают в термостат при температуре плюс 36 °С.

1.6. Культуру просматривают ежедневно. После распространения ЦПЭ на 75-100 % клеточного монослоя, флакон трижды замораживают и оттаивают для разрушения клеток.

1.7. Содержимое флакона переносят в центрифужную пробирку, центрифугируют при 1500 g 20 минут. Перерасчет ускорения свободного падения (g) в число об/мин проводят по формуле (1). Надосадочную жидкость по 0,5 мл переносят в пробирки, предназначенные для хранения референс-штамма, с этикетками, на которых указывают тип клеток, вирусный штамм, дата приготовления. Приготовленные лабораторные референс-штаммы хранят при температуре не выше минус 20 °С.

1.8. Определяют титр референс-штамма (см. п.п. 2.1-2.7).

1.9. Данные запасы вируса могут быть использованы для приготовления нужных объемов

для проведения исследований, для проведения процедуры контроля чувствительности клеточных культур. Вирус на культуре НЕр-2 пассируют не более 3-х раз.

⁶² ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

2. Определение титра референс-штаммов ⁶³

2.1. Готовят разведение 10^{-1} исследуемого вируса: 0,1 мл вируса вносят в пробирку, содержащую 0,9 мл среды.

2.2. Готовят ряд последовательных разведений от 10^{-2} до 10^{-8} . В маркированные соответствующим образом пробирки разливают по 9,0 мл среды, в первую вносят 1,0 мл разведения 10^{-1} исследуемого вируса. Новой пипеткой перемешивают содержимое пробирки, переносят 1,0 мл в следующую, меняют пипетку, вновь перемешивают и переносят 1,0 мл, и т.д.

2.3. Переносят по 100 мкл разведения вируса из пробирок в лунки рядов А-Н колонок 1-10 панели для микротитрования (рис. 2а). Для получения статистически достоверных результатов определения титра референс-штамма используют разведения 10^{-5} - 10^{-8} , каждое разведение вносят в 20 лунок.

2.4. Вносят по 100 мкл поддерживающей среды в лунки колонок А11-Н рядов 11-12 для контроля клеток.

2.5. Готовят суспензию клеток в концентрации $1-2 \times 10^5$ клеток / 1,0 мл, вносят по 100 мкл во все лунки панели. Заклеивают панель пленкой и помещают в термостат при температуре плюс 36 °С.

2.6. Ежедневно микроскопируют панель, наблюдая за появлением ЦПЭ, окончательно учитывают результаты на 5-7 день. Тест считают действительным при образовании в лунках контроля сплошного монослоя нормальных клеток.

2.7. Расчет титра вируса проводят по формуле Кербера (2):

$$\log \text{ТЦД}_{50} = L - d (S - 0,5) \quad (2)$$

где: L = $\log$ наименьшего разведения сыворотки в опыте;

d = разница между $\lg$ последовательных разведений;

S = сумма пропорций тест-объектов (лунок с культурой клеток), давших положительный результат (ЦПЭ) в каждом разведении.

В примере на рис. 2б титр вируса равен $10^{6,6}$ ТЦД₅₀/0,1 мл, рассчитан по формуле (3):

$$\log \text{ТЦД}_{50} = -5 - 1 (2,1 - 0,5) = -6,6 \quad (3)$$

⁶³ ВОЗ. Руководство по лабораторным исследованиям на полиовирусы, 2004.

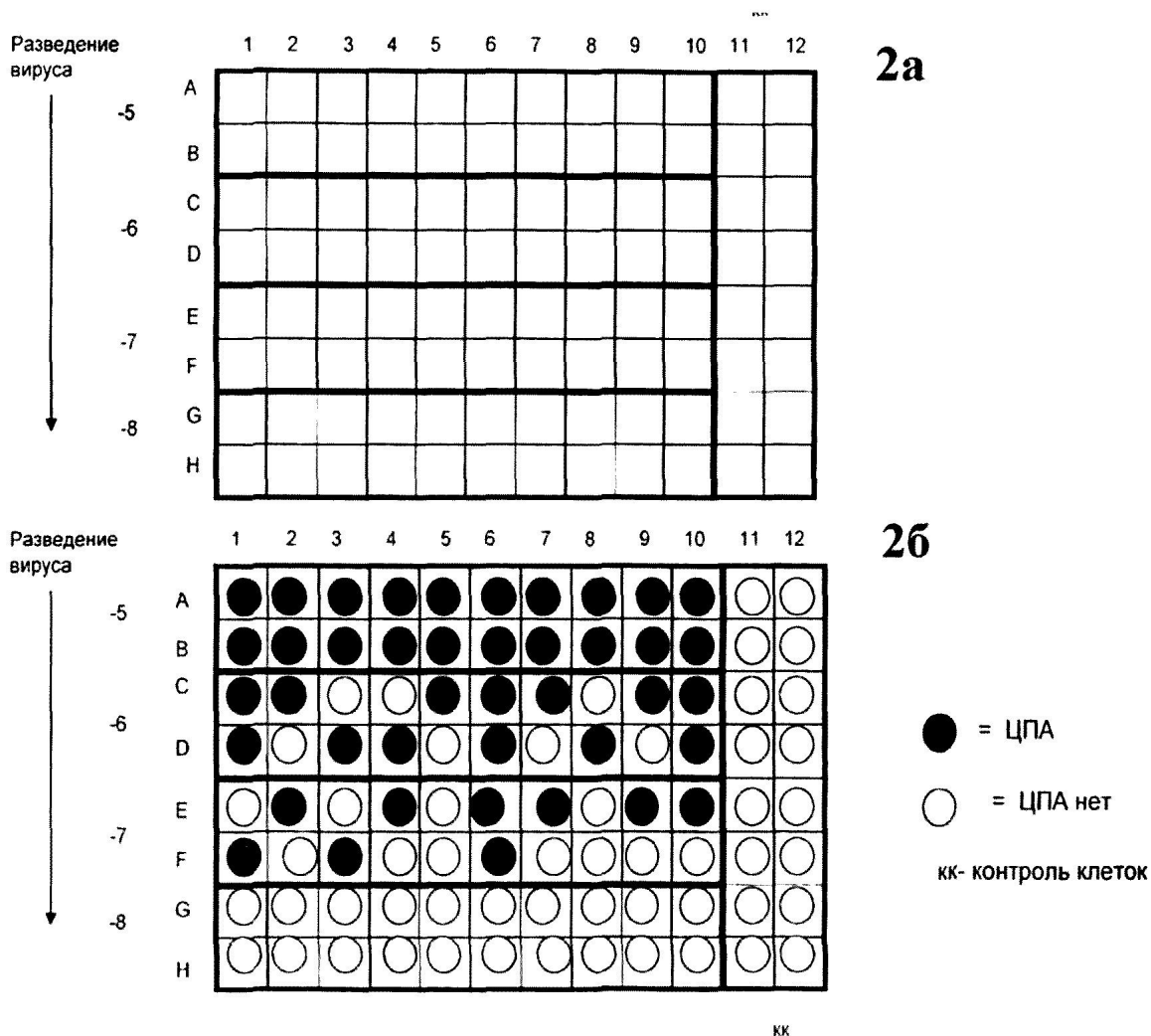


Рис. 2. Определение титра референс-штамма

Приложение 5 к МУК 4.2.4064-24

Проведение реакции нейтрализации для выявления антител к полиовирусу

1.1. Готовят панели для микротитрования из расчета одна панель на каждый тип вируса, маркируют их, обозначая номер исследуемой сыворотки, тип вируса, дату постановки опыта.

1.2. Вносят 50 мкл питательной среды во все лунки панели, кроме лунок, предназначенных для контроля культуры клеток (ряды А-Н, колонки 11-12). В эти лунки вносят 100 мкл среды (рис. 3а).

1.3. Необходимый объем сыворотки, приготовленной для исследования, инактивируют в течение 30 минут при температуре плюс 56 °С.

1.4. Готовят разведение 1:4 каждой исследуемой сыворотки, а также референс-сыворотки в поддерживающей среде с добавлением 2 % сыворотки плодов коровы. Необходимо иметь как минимум 600 мкл разведения 1:4 каждой сыворотки.

1.5. Вносят 50 мкл разведения 1:4 каждой сыворотки в соответствующие лунки колонок 1 и 2 в каждую из трех панелей (рис. 3а).

1.6. Используя микропипетку с одноразовым наконечником, аккуратно перемешивают содержимое лунки 2 ряда А, отбирают 50 мкл, переносят в лунку 3, вновь перемешивают, отбирают 50 мкл, переносят в лунку 4 и т.д., включая лунку 10. Из лунки 10, соответствующей разведению 1:2048 после перемешивания 50 мкл содержимого отбрасывают (рис. 3б).

1.7. Повторяют вышеописанные процедуры для ряда В. Таким образом получены двукратные разведения от 1:8 до 1:1024 сыворотки 1. Лунки колонки 1 рядов А и В служат для контроля

токсичности сыворотки, в них не добавляют вирус.

1.8. Аналогично вышеописанному готовят последовательные разведения второй исследуемой сыворотки и референс-сыворотки. Таким образом, лунки рядов А-Е колонок 1-10 предназначены для исследования сывороток.

1.9. При титровании сывороток допускается использование многоканальных микропипеток, которые должны быть регулярно проверены, наконечники - соответствовать типу пипетки, для недопущения ошибок опыта.

1.10. Готовят суспензию нейтрализуемого полиовируса каждого типа с известным заранее титром в поддерживающей среде в количестве, достаточном для исследования намеченного числа сывороток. Разводят каждый вирус так, чтобы в 50 мкл вирусосодержащей жидкости содержалось 100 ТЦД₅₀. Для одной панели необходимо примерно 4,0 мл вируса.

1.11. Пример определения рабочего титра вируса.

При предварительном титровании референс-штаммов на культуре клеток Нер-2 был установлен их титр (конечная точка титрования):

- полиовирус типа 1 - 9,02 lg/мл;
- полиовирус типа 2 - 8,44 lg/мл;
- полиовирус типа 3 - 8,66 lg/мл.

Разведение, которое дает концентрацию 100 ТЦД₅₀/мл - в 100 раз меньшее разведение, чем конечная точка титрования. Так как в лунку вносят 50 мкл разведения вируса, то его рабочее разведение должно быть в 20 раз меньше (или на 1,3 lg). Рабочее разведение референс-штаммов будет следующим:

- полиовирус типа 1 - 5,72 lg/мл (можно использовать разведение - 6);
- полиовирус типа 2 - 5,14 lg/мл (можно использовать разведение - 5);
- полиовирус типа 3 - 5,36 lg/мл (можно использовать разведение - 5).

1.12. Пример приготовления ряда последовательных разведений референс-штаммов (табл. 1).

Таблица 1

Пример приготовления ряда последовательных разведений референс-штаммов

Разведения	Объем среды для разведения	Объем вирусной суспензии
10 ⁻¹	0,9 мл	0,1 мл
10 ⁻²	0,9 мл	0,1 мл
10 ⁻³	0,9 мл	0,1 мл
10 ⁻⁴	0,9 мл	0,1 мл
10 ⁻⁵ - рабочее разведение для полиовирусов типов 2 и 3	3,6 мл	0,4 мл
10 ⁻⁶ - рабочее разведение для полиовируса типа 1	3,6 мл	0,4 мл
10 ⁻⁷	0,9 мл	0,1 мл
10 ⁻⁸	0,9 мл	0,1 мл

1.13. Вносят 50 мкл рабочего разведения вируса определенного типа в лунки рядов А2-А10 - F2-F10 соответствующей типу вируса панели. В лунки колонок 1, 11, 12, а также рядов G и H вирус не добавляют (рис. 3в). Ряды G и H предназначены для титрования референс-вируса для контроля рабочей дозы. Вносят 50 мкл последовательных разведений вируса, начиная с наибольшего (от - 9 до - 5).

1.14. Панели заклеивают специальной пластиковой пленкой, закрывают крышкой, осторожно постукивают по краю панели для лучшего смешивания ингредиентов в лунках и помещают на 3 часа в термостат при температуре плюс 36 °С.

1.15. Готовят суспензию клеток Нер-2 в ростовой среде в концентрации 1-2 x 10⁵ клеток в 1,0 мл.

1.16. Добавляют по 100 мкл клеточной суспензии во все лунки всех панелей. Заклеивают па-

нели, помещают в термостат при температуре плюс 36 °С на 5 дней. Учет результатов начинают на 3 день, окончательный учет - на 5 день.

1.17. При учете результатов обращают внимание на состояние контролей культуры, токсичность сыворотки, результаты контрольного титрования рабочих разведений референс-вирусов. Для контроля рабочей дозы каждого из использованных в опыте вирусов по формуле Кербера рассчитывают титр вируса (пункт 2.7 приложения 4 к настоящим МУК). Если рабочая доза выходит за пределы 50-200 ТЦД₅₀, результаты опыта считают недостоверными.

1.18. При учете результатов обращают внимание на воспроизводимость уже известных титров референс-сыворотки. Если в опыте значения титров резко отличаются от ожидаемых, результаты опыта считают недействительными.

1.19. Рассчитывают конечную точку нейтрализации по формуле Кербера (пункт 2.7 приложения 4 к настоящим МУК).

Переводят разведения сыворотки в логарифмические значения (разведение 1:4 = 2, 1:8 = 3, 1:16 = 4 и т.д.). Титром антител в сыворотке считается ее наибольшее разведение, защищающее 50 % тест-культур от действия 100 ТЦД₅₀ вируса. Титр вируса часто выражают величиной, обратной разведению (например, при разведении 1:256 титр антител выражается как 256).

1.19.1. Пример расчета титра сыворотки (табл. 2, рис. 3г - сыворотка 1), формула (4):

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = L - d (S - 0,5) = 11 - 1 (5,5 - 0,5) = 6 (1 : 64) \quad (4)$$

Таблица 2

Пример расчета титра сыворотки

разведение сыворотки (lg)		пропорции тест-объектов
1:8	3	0/2 = 0
1:16	4	0/2 = 0
1:32	5	0/2 = 0
1:64	6	1/2 = 0,5
1:128	7	2/2 = 1
1:256	8	2/2 = 1
1:512	9	2/2 = 1
1:1024	10	2/2 = 1
1:2048	11	2/2 = 1
S = 5,5		

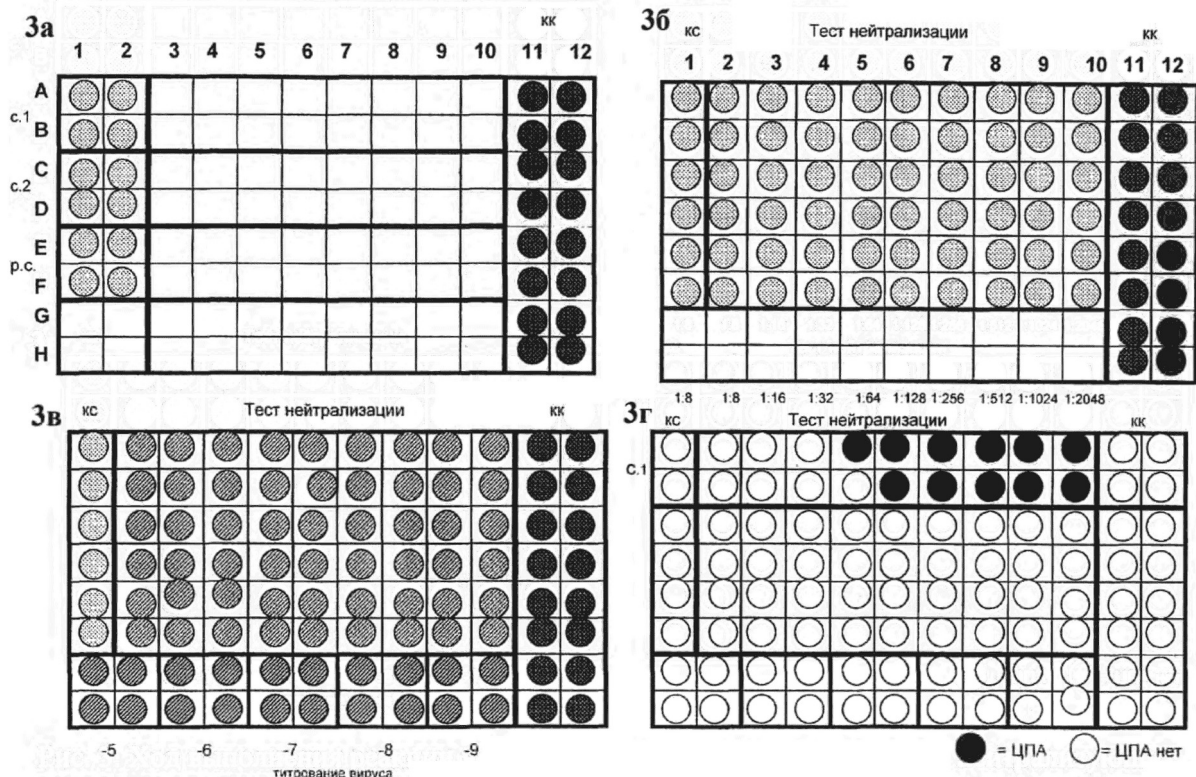


Рис. 3. Ход выполнения реакции нейтрализации для определения титра нейтрализующих антител к полиовирусу

Приложение 6 к МУК 4.2.4064-24

**Средства измерений, вспомогательное и испытательное оборудование,
расходные материалы и реактивы**

1. При проведении лабораторной диагностики полиомиелита, обнаружении полиовирусов в пробах клинического материала применяют средства измерений, вспомогательное и испытательное оборудование, расходные материалы и реактивы, приведенные в таблицах П1.1 - П1.2.

Таблица П 1.1

Средства измерений, вспомогательное и испытательное оборудование

Наименование средств измерений, вспомогательного и испытательного оборудования	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Автоклав большой (настольный для маленьких лабораторий)	-
Весы	-
Бокс микробиологической безопасности 2 класса	-
Центрифуга низкоскоростная с охлаждением	-
Компьютер с программным обеспечением	-
Счетная камера (для подсчета клеток)	-
Комплект автоматических дозаторов	одноканальные (диапазон 2-20 мкл, 20-

	200 мкл, 100-1000 мкл) и восьмиканальные (диапазон 5-50 мкл, 30-300 мкл)
Морозильник	Температура минус 20 °С
Термостат стандартный	Рабочая температура 36 °С ± 1 °С
Термостат стандартный	Рабочая температура 37 °С ± 1 °С
Термостат с подачей CO ²	Рабочая температура 36-37 °С
Контейнер для жидкого азота	25 л
РН-метр с запасными электродами	-
Микроскоп инвертированный	-
Микроскоп обычный	-
Смеситель - вортекс	-
Сухожаровой стерилизатор	-
Холодильник	Температура плюс 4 °С
Штативы для пробирок	Диаметр 16 мм
Термометры стандартные	-
Термометры 0-100 °С	-
Дистиллятор воды	Для двойной или тройной перегонки
Деионизатор воды	-
Водяная баня	-
Примечание: допускается использование средств измерения, вспомогательного и испытательного оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.	

Таблица П 1.2

Расходные материалы и реагенты для выделения полиовирусов

Наименование лабораторной посуды и расходных материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Халат (разные лабораторные зоны рекомендуется снабжать отдельным комплектом халатов)	-
Шапочки медицинские	-
Одноразовые перчатки	-
Бутылки	60 мл, 125 мл, 250 мл, 500 мл, 1 л
Резиновые груши для работы пипетками	-
Флакончики для низких температур	2 мл, 4 мл
Цилиндры градуированные	100 мл, 500 мл
Пипетки серологические	1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл
Бусы стеклянные	-
Хлороформ	-
Диметилсульфоксид	-
Флаконы для культур клеток	75 см ² , 25 см ²
Глутамин	-
Хэнкса раствор	-
Минимальная среда с буфером ХЕПЕС	-
Планшеты культуральные	96 луночные
Клейкие пластины для запечатывания планшетов	-
ФСБ	-
Пенициллин и стрептомицин	-
Феноловый красный	-
Наконечники для микродозаторов одноразовые	2-20 мкл, 10 мкл, 200 мкл
Микродозаторы одноканальные переменного	2-20 мкл

объема	
Микродозаторы многоканальные переменного объема	2-200 мкл
Сыворотка крови телячья плодная	-
Трипановый синий	-
Пробирки стерильные с крышками	-
Пробирки центрифужные (устойчивые к хло-роформу)	15 мл
Версен	-
Трипсин	-
Лопаточки деревянные	-
Примечание: допускается использование расходных материалов и реагентов с аналогичными или лучшими характеристиками.	

Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".
2. Федеральный закон от 21.11.2011 N 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации".
3. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 N 1416 "Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий".
4. Единый перечень продукции (товаров), подлежащей государственному санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории Евразийского экономического союза.
5. План действий по поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации на 2022 - 2024 гг.
6. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".
7. СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".
8. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 N 1116 "О совершенствовании системы мониторинга и лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации".
9. Приказ Роспотребнадзора от 19.12.2016 N 1236 "О совершенствовании эпидемиологического надзора за ЭВИ".
10. МУ 3.1.1.4016-24 "Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и острыми вялыми параличами".
11. МР 4.2.0327-23 "Молекулярное типирование энтеровирусов".
12. МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащем микроорганизмы I - IV групп патогенности".
13. Р 3.5.1.4025-24 "Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях".
14. МУ-287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

Библиографические ссылки

1. А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова, А.А. Мельникова, Н.С. Морозова, Ю.М. Михайлова,

О.Е. Иванова, Л.И. Козловская, Т.П. Еремеева, А.П. Гмыль, Е.А. Короткова, О.Ю. Байкова, А.Ю. Красота, А.В. Иваненко, М.С. Ярмольская, И.В. Ковальчук, Е.Н. Романенко. Ответные меры по противодействию распространения вируса полиомиелита вакцинного происхождения типа 2 в России в 2016 г. Инфекция и иммунитет. 2020, Т. 10, N 1, с. 90-98.

2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Г.Г. Онищенко, И.В. Брагина, Е.Б. Ежлова [и др.]; Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. - издание 2-е, переработанное и дополненное. - Москва: ЗАО "Шико", 2013. - 560 с.

3. Olga E. Ivanova, Tatiana P. Eremeeva, Olga Y. Baykova, Alexandr Y. Krasota, Elizaveta V. Yakovchuk, Elena Y. Shustova, Lyudmila P. Malyshkina, Aida N.-I. Mustafina, Yulia M. Mikhailova, Alina V. Chirova, Evgeniya A. Cherepanova, Nadezhda S. Morozova, Anna S. Gladkikh, Anna S. Dolgova, Vladimir G. Dedkov, Areg A. Totolian and Liubov I. Kozlovskaya. Detection of Polioviruses Type 2 among Migrant Children Arriving to the Russian Federation from a Country with a Registered Poliomyelitis Outbreak. Vaccines 2024, 12, 718.