

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

И.В. Гаевский

« 25 » марта 2014 г.

Регистрационный № 016-1213.

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

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Авторы: д.м.н., профессор Амвросьева Т.В., н. с. Казинец О. Н., к.б.н.,
вед. н.с. Поклонская Н.В., н.с. Богуш З.Ф.

Минск, 2013

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

1 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

- 1 Автоклав;
- 2 автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл;
- 3 бифэкстракт (Sigma);
- 4 бумага крафт по ГОСТ 8273-75;
- 5 весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;
- 6 вода деионизированная (или дистиллированная вода, стерилизованная автоклавированием при 121°C+1°C в теч. 20 мин);
- 7 глицин по ГОСТ 4209-67;
- 8 инструменты лабораторные: пинцеты, ножницы, совок для взвешивания;
- 9 иономер (рН-121);
- 10 кислота соляная (HCl), х.ч. по ГОСТ 3118-77;
- 11 ламинарный бокс или бокс с УФ-лампой;

- 12 наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, (0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл);
- 13 натрий хлористый (NaCl), х.ч. по ГОСТ 4233-77;
- 14 натрия гидроксид (NaOH), ч.д.а. по ГОСТ 4328-77;
- 15 натрий фосфорнокислый 2-х замещенный 12 водный (Na₂HPO₄·12 H₂O) по ГОСТ 4172-76;
- 16 одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл);
- 17 перекись водорода, х.ч. по ГОСТ 10929-78;
- 18 пипетки стеклянные градуированные на 1, 5, 10 мл по ГОСТ 29227-91;
- 19 посуда лабораторная (колбы, пробирки) по ГОСТ 1770-74;
- 20 трис-HCL, х.ч. (Sigma);
- 21 хлороформ, х.ч. по ТУ 2631-02-11291058-96;
- 22 центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;
- 23 холодильник-морозильник (-18 – -20°С, +4 – +8°С);
- 24 этиловый спирт по ГОСТ 5962-67.

2 Объекты исследований

Объектами исследований являются ОСОЧ - многочисленные объекты (предметы) обихода (например, стены, полы, мебель и ее обивка, дверные ручки, перила, бытовая техника, посуда, одежда, постельные принадлежности, детские игрушки и т.д.), а также объекты (предметы) производственной среды, включая госпитальную (например, оборудование, разные технические приспособления, компьютерная техника, телефонные аппараты, спецодежда и т.д.), окружающие человека в связи с его той или иной профессиональной деятельностью.

3 Методы и схемы отбора и концентрирования проб из разных видов ОСОЧ для проведения их санитарно-вирусологических исследований

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

3.1 Приготовление растворов и сорбента для получения смывов и экстрактов из ОСОЧ

3.1.1 Приготовление 0,1 М глицинового буферного раствора

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

3.1.2 Приготовление 3% бифэкстракта

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

3.1.3 Приготовление 0,01М фосфатно-солевой буферного раствора

Растворяют 7,65 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ в 100 мл дистиллированной воды (получают раствор А), 2,95 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды (получают раствор Б), доводят рН р-ра А до 7,4

р-ром Б. На 100 мл р-ра добавляют 2,1 г NaCl, полученный концентрат разводят в 25 раз дистиллированной водой.

3.1.4 Приготовление сорбента

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

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

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

В качестве сорбента вирусов с твердых поверхностей используют тампоны из волокнистого ионообменного материала марки Фибан А6, приготовленные в соответствии с п. 3.1.4 Для проведения процедуры отбора пробы разворачивают тампон и протирают им с помощью пинцета исследуемую поверхность площадью от 10 до 25 см². Затем тампон помещают в раствор элюента объемом 5,0 мл (3% бифэкстракт, рН 9,6 или 0,1 М глициновый буферный раствор, рН 8,8) на 30 минут. Тампон используют сухой или влажный, смоченный предварительно в физиологическом растворе. После 30 минутной элюции сорбент извлекают из раствора, предварительно отжав его с помощью пинцета для получения смыва. Использованный тампон помещают в 6% раствор перекиси водорода на 24 часа для обеззараживания.

Полученный смыв (элюат), предположительно содержащий вирусный материал, подвергают дополнительному концентрированию с помощью ПЭГ. Для этого ПЭГ-6000 и хлористый натрий добавляют в

элюат, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 10% и 0,5 М (0,1г и 0,03г на 1 мл элюата, соответственно). Смесь тщательно перемешивают до растворения ПЭГ и затем выдерживают в течение 18 часов в холодильнике при +4°C. Образовавшуюся суспензию центрифугируют при 3 000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора. Применение дополнительного концентрирования позволяет сконцентрировать вируссодержащий материал в 10 раз.



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

3.3 Отбор и концентрирование проб с текстиля и других мягких, пористых и поглощающих биологический вируссодержащий материал ОСОЧ (получение экстрактов и их концентрирование)

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

Отбор проб проводят с помощью экстрагирующих буферных растворов (0,1 М глициновый, рН 8,5, 0,01 М фосфатно-солевой.буферный раствор, рН 7,4. Материал текстиля или другого ОСОЧ площадью 5x5 см² помещают для экстракции в стакан объемом 250 мл, в который добавляют 200 мл экстрагирующего буферного раствора, рН 7,4. Время экспозиции составляет 30 минут, по истечении которого текстиль отжимается с помощью пинцета и удаляется из стакана. Полученный вируссодержащий экстракт концентрируется с использованием волокнистого материала марки Фибан А6 проточным или суспензионным способом.

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

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

Полученные пробы подвергают дополнительному концентрированию с помощью ПЭГ (п.3.2.).

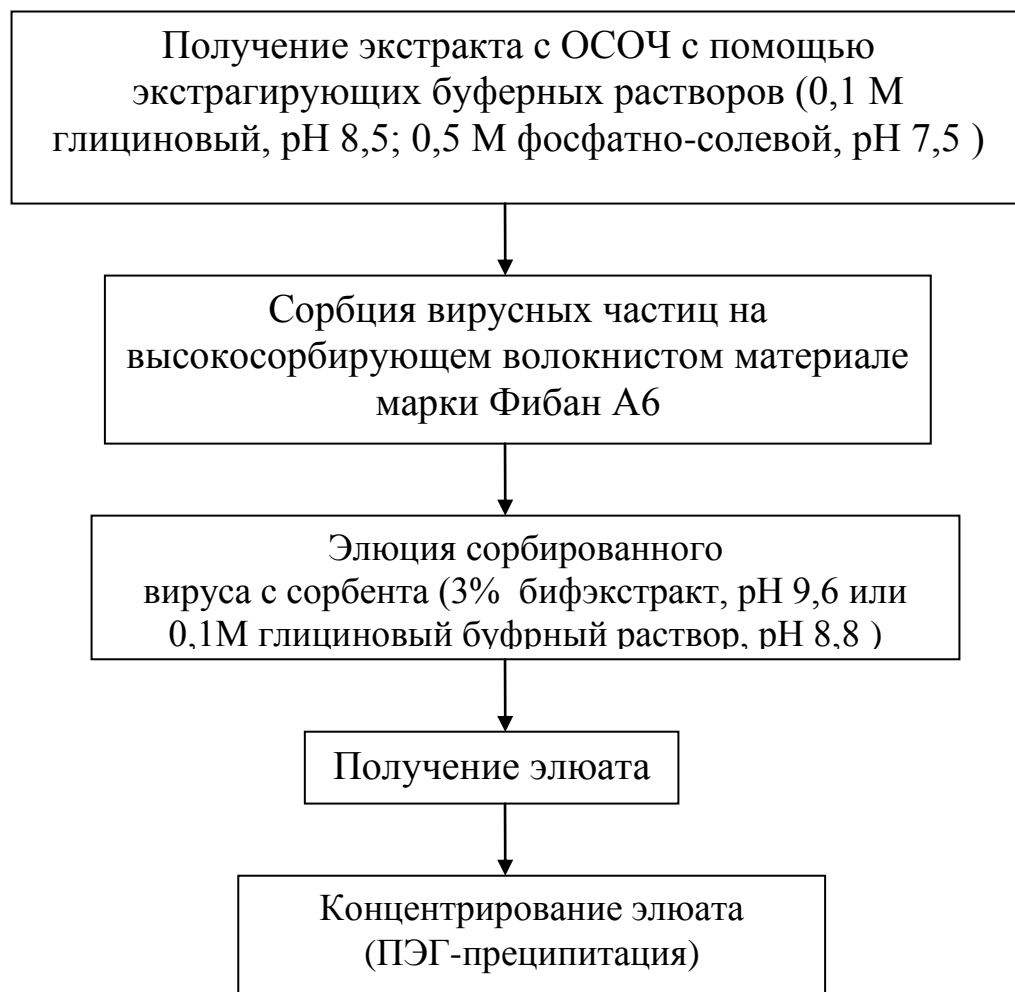


Рисунок 2 – Этапы отбора и концентрирования проб с поверхности текстиля и других мягких, пористых и поглощающих биологический вирусосодержащий материал ОСОЧ (получение и концентрирование экстрактов)

4 Транспортирование и хранение проб

4.1 Пробы смывов, отобранные с твердых поверхностей с помощью тампона помещают в элюирующий буферный раствор и транспортируют при температуре 4⁰С в лабораторию, где проводится концентрирование пробы по п. 3.2.

4.2 Пробы, отобранные с поверхности текстиля и других мягких поверхностей, помещают в экстрагирующий буферный раствор и

транспортируют при температуре 4⁰С в лабораторию, где проводится концентрирование пробы по п. 3.3.

4.3 Сконцентрированные пробы смывов и экстрактов с ОСОЧ хранят при температуре 4⁰С не более 24 часов. При необходимости хранения в течение более длительного времени, они подвергаются замораживанию при -18⁰С. Не допускается повторное замораживание-оттаивание образцов

5 Сортировка проб

После проведения пробоподготовки каждый образец сконцентрированных смывов и экстрактов делят на 2 равные аликвоты, одну из которых используют для идентификации содержащегося в нем вирусного агента, а другую хранят при -20⁰С для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в исследуемых санитарно-вирусологическом материалах и клиническом материале в целях установления контактно-бытового пути передачи вирусной инфекции.

6 Возможные осложнения при отборе и концентрировании проб с ОСОЧ и меры их устранения

а) Недостаточная экстракция вирусного материала из ОСОЧ

Меры устранения: строгое соблюдение времени прохождения этапа экстракции.

б) Недостаточная сорбция вирусного материала из ОСОЧ

Меры устранения: строгое соблюдение времени сорбции, контроль рН буферных растворов

в) Недостаточная элюция вирусного материала из ОСОЧ

Меры устранения: строгое соблюдение времени элюции, контроль рН буферных растворов.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения, в котором
внедрена инструкция

" _____ " _____ 20__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения

2. Кем предложено (наименование учреждения разработчика, автор)

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения

Республики

Беларусь

3. Источник информации

4. Где и когда начато внедрение

(наименование лечебного учреждения, дата внедрения)

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

Эффективность внедрения:

7. Замечания, предложения

Дата _____

Ответственные за
внедрение

должность, Ф.И.О., кафедра

ПОДПИСЬ

Примечание: акт внедрения направляется организации-разработчику (п.2), п.п. 4-8 заполняются организацией, внедрившей разработку.