

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

Арнаут О.В.

2011 г.



Регистрационный № 005-0611

**УСКОРЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ПОЛИОВИРУСОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

Самойлович Е.О., д.м.н., заведующая лабораторией

Ухова И.Ф., к.м.н., младший научный сотрудник

Свирчевская Е.Ю., к.м.н., старший научный сотрудник

Ермолович М.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник

Минск 2010

Инструкция предназначена для специалистов научно-исследовательских институтов, научно-практических центров, центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, других учреждений, занимающихся эпидемиологическим надзором за полиовирусной инфекцией.

1. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- термостат;
- микроскоп инвертированный;
- вортекс;
- камера Горяева;
- СО₂-инкубатор;
- холодильник;
- морозильник;
- амплификатор;
- баня водяная;
- центрифуга низкоскоростная с охлаждением;
- центрифуга высокоскоростная с охлаждением;
- трансиллюминатор с источником УФ-лучей;
- аппарат горизонтальный для проведения электрофореза;
- аппарат для фотографирования в ультрафиолетовом свете;
- автоматические пипетки объемом 0,1-10 мкл, 20-200 мкл и 100-1000 мкл.

Материалы:

- пластиковые микротитровальные 96-луночные панели с плоским дном и крышками, предназначенные для культур клеток;
- стеклянные пробирки (инсулиновые флаконы) для титрования вируса объемом 5 мл;
- стеклянные пробирки объемом 10 мл для культур клеток;
- наконечники с фильтрами для автоматических пипеток объемом 0,1-10 мкл, 20-200 мкл и 100-1000 мкл;
- пластиковые центрифужные пробирки объемом 50 мл (устойчивые к хлороформу);
- пластиковые флаконы объемом 5 мл для хранения фекальной суспензии;
- стеклянные бусы диаметром ~ 3 мм;
- стеклянные или деревянные лопаточки для забора фекалий;
- стеклянные пипетки объемом 1 мл, 5 мл и 10 мл;
- микропробирки 1,5 мл, 0,5 мл

Реагенты:

- питательная среда ДМЕМ;

- эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС);
- антибиотики (гентамицин или смесь пенициллина и стрептомицина);
- фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2-7,4;
- хлороформ;
- суспензия культуры клеток с посевной дозой 200 000 клеток/мл;
- смеси диагностических антиполиосывороток;
- моноклональные антитела, специфичные в отношении вакцинных и диких полиовирусов;
- реагенты и ферменты рестрикции для проведения ПЦР-ПДРФ (см. инструкцию «Рестрикционный анализ структурной и неструктурной областей генома полиовирусов для внутритиповой дифференциации и выявления рекомбинантных штаммов», №077-0708, утвержденной МЗ РБ 13.11.2008 г.);
- агароза;
- бромистый этидий 10 мкг/мл;
- ТАЕ буфер;
- буферный раствор для нанесения ПЦР проб на гель.

2. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являются образцы стула от подозрительных на полиомиелит больных (детей с синдромом острого вялого паралича), больных другими заболеваниями, здоровых детей.

3. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ГЛОБАЛЬНОЙ ЛИКВИДАЦИИ ПОЛИОМИЕЛИТА. ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ В УСКОРЕННОМ ОБНАРУЖЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ

Благодаря вакцинопрофилактике в последние годы удается успешно контролировать многие инфекционные заболевания и даже приблизиться к ликвидации отдельных инфекций. Ликвидация натуральной оспы в мире в 1980 стала уникальным достижением, продемонстрировавшим реальность постановки и решения таких задач человечеством и в отношении других инфекций, если не в глобальном, то, по крайней мере, в региональном масштабе. В настоящее время под руководством ВОЗ выполняется международная программа глобальной ликвидации полиомиелита.

Несмотря на существенное снижение заболеваемости полиомиелитом, в мире все еще остаются эндемичные по полиомиелиту страны (Нигерия, Индия, Афганистан, Пакистан), которые достаточно часто оказываются источником распространения дикого вируса полиомиелита. Только в течение 2003-2007 гг. зарегистрировано более 70 случаев завоза диких полиовирусов (ПВ) из эндемичных стран на территории, свободные от этой инфекции, что

привело к реинфицированию ПВ 17 стран мира и возникновению там 1577 случаев паралитического полиомиелита.

В последнее время ситуация по полиомиелиту осложнилась и в Европейском регионе вследствие возникновения крупной вспышки заболевания в Таджикистане (зарегистрировано 458 лабораторно подтвержденных обнаружением дикого ПВ случаев паралитического полиомиелита, 26 из них закончились летально). Вспышка полиомиелита в Таджикистане привела к распространению дикого ПВ на соседние территории. Завозные случаи были зарегистрированы в России (14), Туркменистане (3), Казахстане (1). Несомненно, распространение полиомиелита в Европейском регионе, который на протяжении практически 10 лет считался свободным от ПВ, требует от всех стран повышения эпидемиологической настороженности и активизации мероприятий по недопущению дальнейшего распространения возбудителя.

Еще одна проблема, осложняющая выполнение программы глобальной ликвидации полиомиелита, – это обнаружение так называемых вакцинно-родственных полиовирусов (ВРПВ), вирусов, которые в значительной степени (на 1-15% нуклеотидных оснований в области генома, кодирующей основной белок капсида) дивергировали от их прародителей, вакцинных штаммов Себина, вследствие длительного размножения в организме иммунодефицитных лиц, либо длительной циркуляции. В некоторых странах мира на территориях с низким уровнем охвата населения вакцинацией (Египет, Доминиканская Республика, Гаити, Филиппины, Республика Мадагаскар, Китай и др.) были зарегистрированы вспышки паралитического полиомиелита, обусловленные циркулирующими ВРПВ. ВРПВ были также обнаружены в сточных водах и в странах, имеющих высокий уровень охвата прививками и сертифицированных, подобно Беларуси, как свободные от полиомиелита (Эстония, Словакия, Германия). В 2007 г. впервые в Республике Беларусь был изолирован ВРПВ от иммунодефицитного ребенка с вакцино-ассоциированным полиомиелитом. Таким образом, и в постсертификационный период сохраняется необходимость поддержания высокого уровня охвата детей прививками и интенсификации эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией.

Основная роль в дифференциальной диагностике подозрительных на полиомиелит заболеваний принадлежит лабораторным исследованиям, которые включают как классические вирусологические методы (выделение вируса в культуре клеток, серологическая идентификация выделенного агента), так и современные молекулярные методы, направленные на изучение вирусного генома. В соответствии с рекомендациями ВОЗ время, отведенное на изоляцию вируса из проб стула детей с подозрением на полиовирусную инфекцию и его идентификацию не должно превышать 28 дней. Дополнительно 14 дней предоставляется для проведения внутритиповой дифференциации выделенного ПВ (т.е. дифференциации диких и вакцинных штаммов).

Однако, учитывая чрезвычайную опасность распространения дикого полиовируса или ВРПВ, очень важно, чтобы появление таких вирусов было обнаружено в кратчайшие сроки. Накопленный к настоящему времени в мире и нашей стране опыт работы с ПВ позволяет разработать и внедрить в практику схему ускоренного выявления ПВ в материале от подозрительных больных и их идентификации.

4. ОБЩАЯ СХЕМА УСКОРЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПОЛИОВИРУСОВ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Ввиду многих причин (присутствие различных ингибиторов ПЦР в фекальном материале) обнаружение ПВ непосредственно в пробах стула с использованием ПЦР не относится к высокочувствительным методам диагностики полиомиелита. Поэтому для ускорения получения окончательного результата и повышения чувствительности исследования целесообразно на первом этапе проводить инокуляцию чувствительных линий клеток, а после появления вирусспецифического эффекта исследовать культуральную жидкость с использованием молекулярных методов.

ПВ хорошо размножаются во многих перевиваемых клетках человека и приматов. Наиболее целесообразным и экономичным для исследования образцов, в которых предполагается присутствие ПВ, является использование двух перевиваемых культур клеток – RD и L20B. RD – это клетки рабдомиосаркомы человека. Эта клеточная линия является высокочувствительной к ПВ, а также к неполиомиелитным энтеровирусам (Экхо вирусам). L20B – линия мышечных клеток (L-клеток), которым генно-инженерным путем придана способность экспрессировать рецептор ПВ. Клетки L20B отличаются избирательной чувствительностью к ПВ. Некоторые вирусы (в частности аденовирусы и реовирусы) могут вызвать цитопатический эффект (ЦПЭ) в этих клетках, однако он значительно отличается от ЦПЭ, вызываемого ПВ. Использование этих двух линий клеток обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при обнаружении ПВ, а также позволяет выявлять и некоторые другие вирусы.

После накопления вируса в культуре клеток вируссодержащая культуральная жидкость исследуется в ПЦР с последующим изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) генома. ПЦР-ПДРФ анализ позволяет в течение короткого срока определить серотип ПВ и провести его внутритиповую дифференциацию.

В целом при использовании такого подхода предварительная информация о наличии дикого ПВ в пробе может быть получена в течение 3-7 дней. Весь полный цикл исследования по предложенной схеме занимает не более 14 дней. Быстрое обнаружение дикого ПВ или ВРПВ позволит своевременно принять меры по недопущению его распространения. Учитывая рекомендации ВОЗ о необходимости осуществления внутритиповой дифференциации ПВ с использованием как минимум двух

методов (один из них должен быть направлен на антигенную, другой – на генетическую характеристику вируса) наряду с использованием ПЦР-ПДРФ анализа схема ускоренного выделения и идентификации ПВ включает в себя также реакцию нейтрализации с моноклональными антителами (МкАт) к диким и вакцинным ПВ соответствующего серотипа.

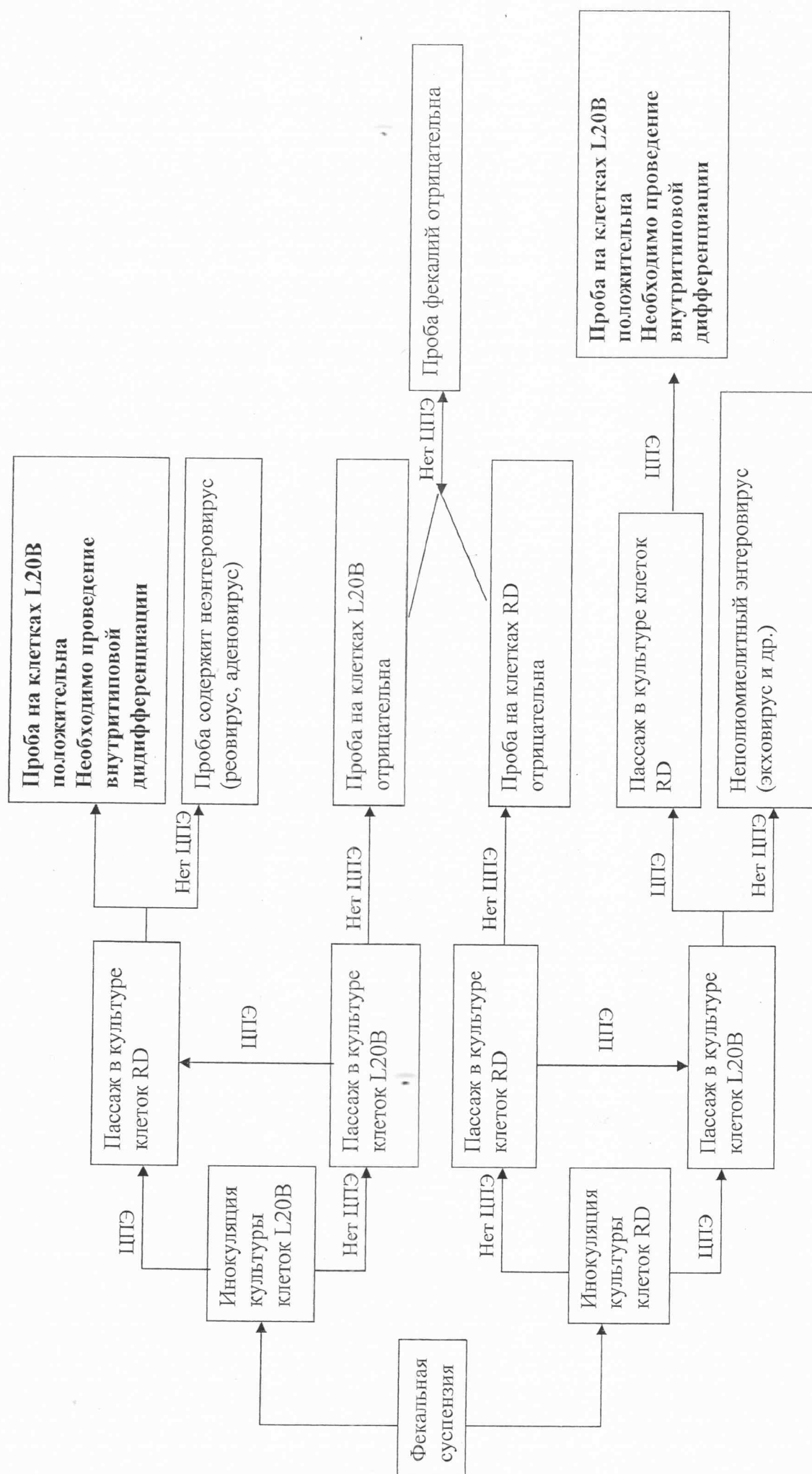
В случае выявления с использованием данной схемы исследования ПВ, отличного от вакцинного, в соответствии с рекомендациями ВОЗ информация об обнаружении такого вируса должна быть немедленно направлена в ЕРБ ВОЗ, а сам изолят в трехдневный срок должен быть доставлен в Региональную референс-лабораторию по полиомиелиту ВОЗ (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова АМН Российской Федерации, г. Москва) для секвенирования его генома в целях определения происхождения вируса.

4.1. Приготовление фекальной суспензии для выделения полиовируса

- Для приготовления 10% фекальной суспензии в пластиковую центрифужную пробирку устойчивую к хлороформу объемом 50 мл с герметичной завинчивающейся крышкой наливают 10 мл ФСБ (рН 7,2-7,4) с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин с конечной концентрацией 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл), 5 г стеклянных бусин диаметром ~ 3 мм и 0,5 мл хлороформа. В подготовленный таким образом флакон вносят примерно 2 г. фекальной пробы. Добавление хлороформа освобождает пробу от бактерий, грибов, цитотоксичных липидов, а также способствует разъединению вирусных агрегатов.
- Пробирку плотно закрывают и встряхивают на вортексе в течение 15-20 минут.
- Осветляют суспензию центрифугированием в течение 20 минут при скорости вращения ротора 3 000 об/мин и температуре +4⁰С, после чего в промаркированные стерильные пробирки отбирают 4-5 мл надосадочной жидкости. Хранят суспензию при -20⁰С.

4.2. Выделение полиовируса с использованием клеток RD и L20B

- Проводят инокуляцию обеих культур клеток – L20B и RD (Рис. 1). На каждую пробу используют по две пробирки со свежесформированным клеточным монослоем каждой культуры. В пробирках с монослоем клеток меняют ростовую питательную среду на среду поддержки, содержащую 2% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Пробирки маркируют, затем в каждую из них вносят по 0,2 мл фекальной суспензией и инкубируют при температуре +36⁰С.



- С целью выявления ЦПЭ ежедневно микроскопируют пробирки с использованием инвертированного микроскопа.
- Регистрируют наблюдаемый ЦПЭ в пробирках с инокулированной и контрольной культурами клеток, используя обозначения от 1+ до 4+ в зависимости от степени поражения клеточного монослоя (1+ свидетельствует о поражении до 25% монослоя, 2+ от 25 до 50%, 3+ от 50 до 75%, 4+ от 75 до 100%).
- Если ЦПЭ не появляется в течение 5 дней наблюдения, выполняют «слепой» пассаж с использованием той же культуры клеток и продолжают наблюдение еще в течение 5 дней. Для проведения «слепого» пассажа замораживают пробирку с инокулированной культурой клеток при -20°C . Затем оттаивают и переносят 0,2 мл содержимого пробирки в пробирку со свежесформированным монослоем клеток. Если в течение 5 дней наблюдения ЦПЭ не появляется, исследуемый образец расценивается как негативный.
- Если характерный ЦПЭ появляется на любой из стадий после инокуляции клеток, продолжают наблюдение до тех пор, пока ЦПЭ не достигнет 3+. После этого выполняют следующий пассаж с использованием той же самой, а также другой (с L20B на RD, с RD на L20B) культуры клеток. (Рис. 1). Необходимость дополнительного пассажа объясняется тем, что при первичном заражении с использованием фекального материала достаточно часто отмечается неспецифическая дегенерация клеток, которую визуально практически невозможно отличить от специфического ЦПЭ. В тех случаях, когда речь идет об исследовании проб от больных с высоким риском инфицирования диким ПВ, при появлении ЦПЭ после первичной инокуляции культуры клеток, параллельно с выполнением следующего пассажа в культуре клеток культуральная жидкость может быть исследована с использованием ПЦР-ПДРФ анализа.
- Если после пассирования ЦПЭ-позитивной L20B культуры на клетках RD также появляется характерный ЦПЭ, после достижения 75%-го поражения монослоя флакон замораживается и в замороженном состоянии направляется в Национальный референс-центр по полиомиелиту (РНЦ эпидемиологии и микробиологии) для определения принадлежности ПВ к дикому или вакцинному штамму.
- Если при пассировании ЦПЭ-позитивной RD культуры в культуре клеток L20B ЦПЭ не появляется, а в культуре RD появляется снова, образец рассматривается как содержащий неполиомиелитный энтеровирус. Цитопатический агент передается в замороженном состоянии в Национальный референс-центр по полиомиелиту для дальнейшей идентификации.
- При появлении ЦПЭ в культуре клеток L20B после пассирования ЦПЭ-позитивной RD культуры (этот пассаж направлен на разделение ПВ,

который может присутствовать в пробе в смеси с неполиомиелитным энтеровирусом) выполняется еще один пассаж в культуре клеток RD (в целях увеличения титра ПВ). После достижения 75%-го поражения монослоя флакон замораживается и в замороженном состоянии направляется в Национальный референс-центр по полиомиелиту для проведения внутритиповой дифференциации ПВ.

Интерпретация возможных результатов выделения вирусов по ускоренной схеме с использованием культур клеток L20B и RD представлена в таблице 1.

Таблица 1

Интерпретация результатов выделения вирусов по ускоренной схеме с использованием культур клеток L20B и RD

Результат исследования	Наблюдаемое при микроскопировании	Необходимые дальнейшие действия
Проба отрицательна	При инокуляции и пассировании пробы в культурах клеток L20B и RD ЦПЭ отсутствует.	В образце стула ПВ отсутствует.
Проба положительна на культуре клеток L20B, содержит ПВ	При инокуляции и/или пассировании пробы в культуре клеток L20B наблюдается ЦПЭ. ЦПЭ воспроизводится при пассировании пробы с клеток L20B в клетках RD.	В образце стула присутствует ПВ. Необходимо проведение его внутритиповой дифференциации. Вирусодержащая культуральная жидкость должна быть доставлена в Национальный референс центр по полиомиелиту в течение 3 дней.
Проба содержит неполиомиелитный энтеровирус	При инокуляции и/или пассировании пробы в культуре клеток RD наблюдается ЦПЭ. При пассировании пробы с клеток RD в клетках L20B ЦПЭ не наблюдается.	Вирусодержащая культуральная жидкость должна быть направлена в Национальный референс центр по полиомиелиту для дальнейшей идентификации.
Проба положительна на культуре клеток L20B, но не содержит ПВ, а содержит неэнтеровирус (реовирус, аденовирус)	При инокуляции и пассировании пробы в культуре клеток L20B наблюдается ЦПЭ. При инокуляции и пассировании пробы в культуре клеток RD ЦПЭ не наблюдается.	Вирусодержащая культуральная жидкость должна быть направлена в Национальный референс центр по полиомиелиту для дальнейшей идентификации.

Согласно традиционным методам исследования ПВ, после выделения вируса в культуре клеток проводится его идентификация с использованием поликлональных гипериммунных сывороток в реакции нейтрализации в культуре клеток.

В соответствии с ускоренной схемой предлагается использование ПЦР-ПДРФ анализа, что позволяет с использованием одного метода определить серотип ПВ (1, 2 или 3) и провести его внутритиповую дифференциацию (Рис. 2). Проведение серотипирования вируса в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток при применении ускоренной схемы рекомендуется только в случае присутствия в пробе смеси ПВ нескольких серотипов или смеси ПВ и неполиомиелитного энтеровируса. Поскольку для проведения внутритиповой дифференциации с использованием метода, основанного на обнаружении антигенных различий диких и вакцинных ПВ (с использованием МкАт), необходимо предшествующее разделение смесей до монотипов, сероидентификация используется для подтверждения чистоты их разделения.

4.3. Внутритиповая дифференциация полиовируса с использованием ПЦР-ПДРФ анализа

Метод включает три стадии: экстракцию РНК, амплификацию с помощью ПЦР области генома, кодирующей основной капсидный белок ПВ (VP1), рестрикционный анализ. Постановка метода осуществляется в соответствии с инструкцией «Рестрикционный анализ структурной и неструктурной областей генома полиовирусов для внутритиповой дифференциации и выявления рекомбинантных штаммов», №077-0708, утвержденной МЗ РБ 13.11.2008 г.

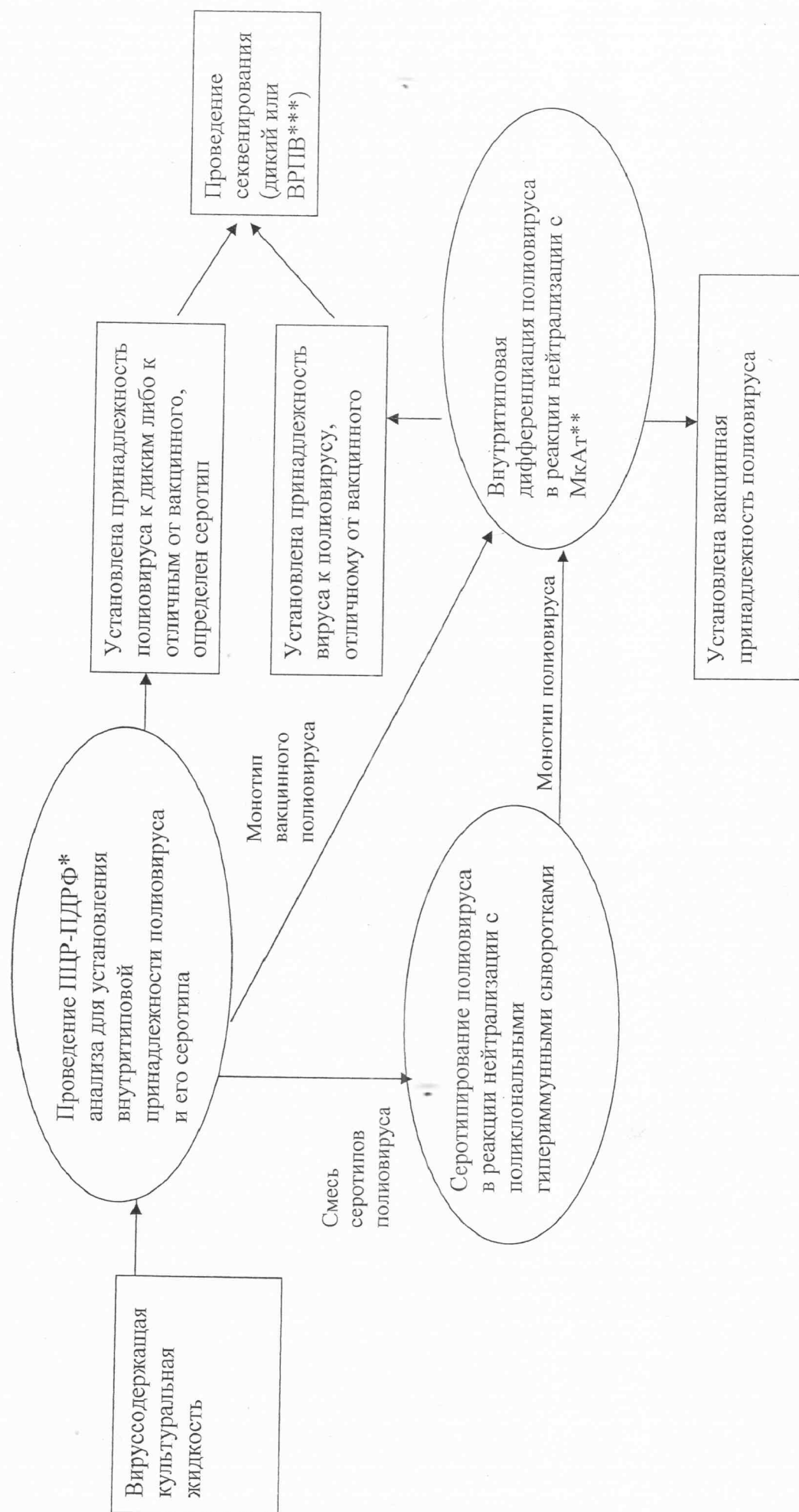


Рисунок 2. Ускоренная внутритиповая дифференциация, основанная на выявлении генетических и антигенных различий диких и вакцинных полиовирусов

* - анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генома, ** - моноклональные антитела, *** - вакцино-родственный полиовирус

4.4. Сероидентификация полиовирусов

Сероидентификация проводится с использованием реакции нейтрализации вируса гипериммунными поликлональными сыворотками к ПВ 1, 2 и 3 серотипов производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (Москва, Россия) либо Института Общественного Здравоохранения и Окружающей среды (Билтховен, Нидерланды). Постановка реакции нейтрализации осуществляется в той же культуре клеток, на которой был выделен вирус.

- *Приготовление диагностических сывороток.* Диагностические сыворотки разводятся согласно инструкции производителя. В реакции используют смеси сывороток: 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3. Трехвалентная сыворотка входит в стандартный набор гипериммунных сывороток. Смеси сывороток к двум типам ПВ готовят в лаборатории. Для этого вначале готовят рабочее разведение моновалентной сыворотки в двойной концентрации по отношению к титру, указанному на этикетке ампулы. Затем две сыворотки соединяют в равных объемах, в результате чего титр каждой из них уменьшается вдвое, и таким образом достигается соответствие титру, указанному на этикетке.
- *Определение рабочего разведения вируса для реакции нейтрализации.* Если в культуре клеток вирусный ЦПЭ с поражением 75-100% монослоя развился на первые-вторые сутки, как правило, в этом случае его титр будет равен примерно 10^{-5} - 10^{-6} ТЦИД₅₀. Поскольку рабочее разведение вируса при исследовании его в реакции нейтрализации должно составлять 100 ТЦИД₅₀, для идентификации используют два рабочих разведения вируса – 10^{-3} и 10^{-4} . При этом в каждом опыте параллельно с постановкой реакции нейтрализации вируса гипериммунными сыворотками проводится контрольное титрование рабочего разведения вируса (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Если в результате проведенного титрования выясняется, что ни одно из выбранных разведений (ни 10^{-3} , ни 10^{-4}) не составляет 100 ТЦИД₅₀, опыт по идентификации вируса следует повторить с правильно выбранным рабочим разведением вируса.
- *Постановка реакции нейтрализации макрометодом.* Каждую из четырех смесей иммунных сывороток (к типам 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3) соединяют с рабочим разведением вируса в равных объемах (по 0,25 мл). Пробирки интенсивно встряхивают и инкубируют не менее 1 ч при +36⁰С.
- На каждую пробу используют по две пробирки культуры клеток. В пробирках со свежесформировавшимся (24-48-часовым)

монослоем клеток меняют ростовую среду на среду поддержки. Пробирки маркируют, затем в каждую пробирку вносят по 0,2 мл соответствующей смеси сывороток и вируса. Далее пробирки инкубируют при +36⁰С.

- *Учет результатов опыта.* Пробирки просматривают ежедневно. Окончательный учет результатов проводят, когда рабочее разведение вируса составит 100 ТЦИД₅₀. Тип полиовируса определяется по его способности нейтрализоваться соответствующими смесями иммунных сывороток. Интерпретация результатов представлена в таблице 2.

При проведении исследования микрометодом сохраняется тот же принцип постановки реакции нейтрализации. Каждую из четырех смесей иммунных сывороток (к типам 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3) соединяют с рабочим разведением вируса в равных объемах (по 50 мкл) в лунках планшета. После инкубации в течение 1 ч при +36⁰С в атмосфере 5% СО₂ во влажной камере вносят в каждую лунку по 100 мкл суспензии соответствующей культуры клеток в концентрации 200 000 кл/мл. Учет проводят ежедневно с помощью инвертированного микроскопа.

Таблица 2

Интерпретация результатов реакции нейтрализации
с полиомиелитными диагностическими сыворотками

Смесь P1+P2+P3	Смесь P1+P2	Смесь P1+P3	Смесь P2+P3	Идентификация вируса
0	0	0	+	Полиовирус типа 1
0	0	+	0	Полиовирус типа 2
0	+	0	0	Полиовирус типа 3
0	0	+	+	Смесь типов 1 и 2
0	+	0	+	Смесь типов 1 и 3
0	+	+	0	Смесь типов 2 и 3
0	+	+	+	Смесь типов 1, 2 и 3
+	+	+	+	Не полиовирус или смесь полиовируса с другим энтеровирусом

Примечание : + = ЦПЭ; 0 = ЦПЭ нет

4.5. Внутритиповая дифференциация полиовируса с использованием моноклональных антител

Для осуществления внутритиповой дифференциации ПВ используется панель МкАт производства Института Пастера (Париж, Франция), специфичных в отношении вакцинных и диких ПВ1, ПВ2 и ПВ3. МкАт к ПВ1 реагируют с антигенным сайтом 3b, к ПВ2 и ПВ3 – с антигенным сайтом 1.

Постановка реакции нейтрализации осуществляется микрометодом.

- МкАт разводят питательной средой ДМЕМ с добавлением антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя.
- Проводят титрование исследуемых штаммов ПВ и референс-штаммов (вирусов Себина трех серотипов) с десятикратным шагом от 10^{-1} до 10^{-7} .
- По 50 мкл каждого разведения ПВ соединяют с равным объемом: питательной среды (контроль инфекционного титра вируса); рабочего разведения МкАт к вирусу Себина соответствующего серотипа; рабочего разведения МкАт к дикому ПВ соответствующего серотипа.
- Микропанели инкубируют в течение 2-4 ч при $+36^{\circ}\text{C}$.
- В каждую лунку вносят по 100 мкл суспензии клеток в концентрации 200 000 клеток/мл.
- Микропанели инкубируют при $+36^{\circ}\text{C}$ в атмосфере 5% CO_2 в течение 5 суток с ежедневным их просмотром с помощью инвертированного микроскопа.
- Окончательный учет результатов проводят на 5 сутки при поражении 75-100% клеток в лунках контроля вируса.
- Индекс нейтрализации (ИН) рассчитывается как разность логарифмов инфекционного титра вируса в отсутствии и присутствии соответствующих МкАт. $\text{ИН} \geq 2,0$ является показателем наличия антигенных детерминант, реагирующих с данным МкАт. Если с МкАт к вакцинному ПВ $\text{ИН} \geq 2,0$, а МкАт к дикому ПВ вирус не нейтрализуется, это свидетельствует о том, что вирус является вакцинным. В случае, если вирус не нейтрализуется, или недостаточно нейтрализуется МкАт к вакцинному вирусу, и нейтрализуется МкАт к дикому ПВ, это свидетельствует о том, что данный ПВ является отличным от вакцинного.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ УСКОРЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПОЛИОВИРУСОВ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ИХ ВНУТРИТИПОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ, ПРИЧИНЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Осложнения	Возможные причины и их устранение
Быстрая дегенерация клеток в течение одного-двух дней после инокуляции.	Может быть вызвана неспецифической токсичностью пробы. Пробирки замораживают при -20°C , оттаивают и 0,2 мл жидкости пассируют на клетках того же типа.
Гибель клеток	Бактериальная контаминация. Фекальную суспензию повторно обрабатывают хлороформом. Пассирование повторяют.
Нет отчетливого ЦПЭ при первом пассаже в клетках L20B	Немногие штаммы ПВ плохо размножаются в клетках L20B, в то же время они хорошо размножаются в клетках RD. Пробирки замораживают при -20°C , оттаивают и 0,2 мл жидкости пассируют в клетках RD, затем обследуют на клетках L20B повторно.
Все пробы в ПЦР отрицательны, включая положительный контроль	Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; непригоден реагент (реагенты)
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	РНК контрольных образцов деградировали или не были добавлены
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК