

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Организация и проведение
лабораторной диагностики заболеваний,
вызванных высоковирулентными
штаммами вируса гриппа птиц типа А
(ВГПА), у людей**

**Методические указания
МУК 4.2.2136—06**

Издание официальное

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Организация и проведение
лабораторной диагностики заболеваний,
вызванных высоковирулентными штаммами
вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей**

**Методические указания
МУК 4.2.2136—06**

ББК 51.9

064

064 **Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей: Методические указания.**—М.: **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.**—23 с.

ISBN 5—7508—0635—9

1. Разработаны: ФГУЗ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Г. А. Шипулин, А. Т. Подколзин, С. Б. Яцышина), ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (В. В. Кутырев, А. Н. Куличенко, С. А. Щербакова, И. Н. Шарова, Т. Ю. Красовская, М. Н. Ляпин, Н. А. Осина), ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (И. Г. Дроздов, А. Н. Сергеев, С. В. Нетесов, А. П. Агафонов, А. М. Шестопапов, Е. А. Ставский, М. А. Сулопаров, А. Ю. Алексеев, А. Г. Дурыманов, С. И. Золотых, Ю. Н. Рассадкин, В. А. Терновой).

2. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 ноября 2006 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.9

ISBN 5—7508—0635—9

© Роспотребнадзор, 2007

© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Список сокращений

ВГПА – вирус гриппа птиц типа А
Биобезопасность – биологическая безопасность
ЛПУ – лечебно-профилактические учреждения
МФА – метод иммунофлуоресцирующих антител
ОТ-ПЦР – метод обратной транскрипции – полимеразной цепной
реакции

Содержание

1. Область применения	5
2. Общие требования	5
3. Координация деятельности учреждений, осуществляющих диагностику ВГПА	6
4. Правила сбора клинического (секционного) материала	7
5. Упаковка и транспортирование образцов	8
6. Порядок проведения лабораторных исследований	9
7. Обеспечение биобезопасности при проведении лабораторных диагностических исследований	12
8. Библиографические источники	13
<i>Приложение 1. Координаты референс-лаборатории, осуществляющей дополнительное подтверждающее тестирование ВГПА</i>	14
<i>Приложение 2. Способы взятия, условия хранения и транспортирования клинического материала для лабораторной диагностики ВГПА</i>	15
<i>Приложение 3. Перечень вирусологических лабораторий и лабораторий учреждений противочумной системы Роспотребнадзора, проводящих первичный скрининг на ВГПА</i>	20
<i>Приложение 4. Стабилизирующая среда для хранения и транспортирования материала</i>	23

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко

9 ноября 2006 г.

Дата введения: с момента утверждения

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Организация и проведение
лабораторной диагностики заболеваний, вызванных
высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц
типа А (ВГПА), у людей**

**Методические указания
МУК 4.2.2136—06**

1. Область применения

1.1. В настоящих методических указаниях определены порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и выполнения лабораторных исследований биологического материала от больных (и умерших) пациентов при лабораторной диагностике заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА).

1.2. Методические указания предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лечебно-профилактических и других организаций, независимо от организационно-правовой формы.

2. Общие требования

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов

I—IV групп патогенности», МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

3. Координация деятельности учреждений, осуществляющих диагностику ВГПА

3.1. При эпизоотическом неблагополучии в России и за рубежом по ВГПА и при отсутствии лабораторно подтвержденных случаев заболевания людей на данной территории:

3.1.1. Забор материала от пациентов (или умерших) с подозрением на инфекцию ВГПА проводят в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ).

3.1.2. Первичное исследование материала от больного осуществляют на базе вирусологических лабораторий ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации или лабораторий учреждений противочумной системы Роспотребнадзора (прилож. 3) с обязательным применением двух методов – ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцирующих антител (МФА).

Применяемые на этом этапе тест-системы должны обеспечивать первичную идентификацию возбудителя как вируса гриппа типа А и дифференциацию штаммов этого вируса по типу гемагглютинина (например Н5).

3.1.3. Подтверждающее тестирование положительных образцов осуществляется в референс-лаборатории – ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора также с обязательным использованием двух методов: ОТ-ПЦР и вирусологического исследования. Результаты анализов в каждом случае передают в ЛПУ, направившее материал на исследование, и в учреждения Роспотребнадзора (управление Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации и ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации) в день получения результата.

3.1.4. При получении положительных результатов подтверждающего тестирования референс-лаборатория проводит изоляцию вируса, изучение его свойств и депонирование.

3.1.5. Полученную в ходе исследования комплементарную ДНК, образующуюся в результате реакции обратной транскрипции РНК, подвергают молекулярно-генетическому исследованию в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Максимальное внимание должно уделяться случаям ВГПА с предположительной передачей от человека человеку. Регистрация подобных

случаев требует незамедлительного проведения комплекса противоэпидемических мероприятий и изучения генетических особенностей изолята ВГПА.

3.2. При наличии лабораторно подтвержденных случаев заболевания людей ВГПА на данной территории:

3.2.1. Забор материала проводят в ЛПУ при подозрении на заболевание ВГПА.

3.2.2. Первичное исследование материала осуществляют на базе вирусологических лабораторий ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации или лабораторий учреждений противочумной системы Роспотребнадзора (прилож. 3) с использованием ОТ-ПЦР исследований.

3.2.3. Обязательное подтверждающее тестирование в референс-лаборатории не проводится. Направление материала в референс-лабораторию осуществляется в случаях возникновения противоречивых результатов при первичном тестировании.

4. Правила сбора клинического (секционного) материала

4.1. Сбор клинического материала и его упаковку осуществляет медицинский работник лечебно-профилактического учреждения, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность ВГПА. Забор производят в стерильные одноразовые флаконы, пробирки, контейнеры стерильными инструментами. Все виды работ проводят с соблюдением противоэпидемического режима, согласно СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

4.2. Упаковка, условия хранения и транспортирования материала для проведения лабораторной диагностики ВГПА должны соответствовать требованиям СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности» и настоящих методических указаний (прилож. 2).

4.3. Для исследования забирают следующие виды клинического материала:

- смывы из полости носа и ротоглотки (для ОТ-ПЦР-анализа);
- мазки из полости носа (для МФА и ОТ-ПЦР-анализа) и ротоглотки (для ОТ-ПЦР-анализа);

- носоглоточное отделяемое (для выделения вируса, ОТ-ПЦР-анализа);
- фекалии (для ОТ-ПЦР-анализа).

Перечисленные выше процедуры по забору клинического материала врачи осуществляют в противочумных костюмах IV типа (или длинном хирургическом халате, с завязками на спине, шапочках), дополненных ватно-марлевыми повязками или респираторами типа ШБ-1 (или РБ) «Лепесток-200». На руки надевают резиновые перчатки, защитные очки.

Целесообразно также включать в исследование аспираты из трахеи, бронхоальвеолярный лаваж и биоптаты легких при возможности их забора. Данные процедуры осуществляет врачебный персонал, одетый в противочумный костюм I типа (или длинный хирургический халат, с завязками на спине, дополненный фартуком, бахилами, косынкой, очками, ватно-марлевой повязкой или респиратором типа ШБ-1 (или РБ) «Лепесток-200» и перчатками).

Выбор времени забора клинического материала очень важен, так как наиболее высокое содержание вируса в дыхательных органах человека регистрируется в течение первых четырех дней после появления признаков заболевания. Образцы должны быть собраны в течение 3 сут. после появления клинических признаков, указанных в п. 6.1.

Для постмортальной диагностики используют аутопаты легких, трахеи и селезенки.

От одного больного должно забираться не менее трех видов клинического материала. Обязательно следует забирать мазки из полости носа и ротоглотки и носоглоточное отделяемое. Каждый образец материала помещают в отдельную транспортную емкость.

4.4. Сбор материала производят в пробирки со стабилизирующей средой, приготовленной согласно прилож. 4, и/или в пробирки с транспортной средой, предоставляемой (или рекомендуемой) фирмой-производителем тест-систем.

4.5. Отправку материала в лабораторию осуществляют в транспортной таре со стабилизирующей средой (прилож. 4).

5. Упаковка и транспортирование образцов

5.1. Все материалы, доставляемые в лабораторию, должны быть герметично «дважды упакованы»:

1) в транспортную емкость (плотно закрывающиеся пластмассовые пробирки или флаконы с завинчивающимися крышками); плотно закрытый верхний конец транспортной емкости вместе с крышкой герметизи-

рукот различными пластификаторами (парафин, парафильм и др.); емкость маркируют;

2) в полиэтиленовый пакет подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки; полиэтиленовый пакет следует герметично заклеить или запаять.

5.1.1. Образцы от одного пациента могут быть упакованы в один полиэтиленовый пакет. Не допускается упаковывать образцы материалов от разных людей в один и тот же пакет.

5.1.2. В полиэтиленовый пакет вкладывают бланк направления с указанием: наименования направляющего учреждения, Ф.,И.,О. больного, возраста, места жительства, предварительного диагноза, эпидемиологического анамнеза, вида материала, даты и времени взятия материала.

5.2. Герметично закрытые полиэтиленовые пакеты помещают в термоизолирующий плотнозакрывающийся контейнер (термос), приспособленный для транспортирования биологических материалов.

5.2.1. В термоконтейнеры и термосы помещают охлаждающие элементы или пакеты со льдом. К наружной стенке термоконтейнера или термоса прикрепляют этикетку с указанием вида материала, условий транспортирования, названия пункта назначения. Сроки и условия транспортирования упакованных проб клинического материала указаны в прилож. 2.

5.3. Транспортирование проб клинического материала в референс-лабораторию, вирусологические лаборатории и лаборатории учреждений противочумной системы Роспотребнадзора осуществляется нарочным(и), информированным о правилах доставки материала в соответствии с п. 3.4. СП 1.2.036—95.

6. Порядок проведения лабораторных исследований

6.1. При отсутствии лабораторно подтвержденных случаев заболевания людей на данной территории лабораторные исследования с целью диагностики ВГПА следует проводить у пациентов с респираторными заболеваниями тяжелого течения и неясной этиологии:

а) при наличии как минимум двух из перечисленных симптомов

- фебрильная лихорадка с температурой тела выше 38 °С;
- сильный кашель;
- затрудненное дыхание или дыхательная недостаточность;
- водянистая диарея при отсутствии слизи и крови в фекалиях;

б) в комбинации хотя бы с одним из следующих эпидемиологических признаков в период 1—7 дней перед появлением симптомов;

- посещение мест регистрации заболевания ВГПА у птиц или людей;

- тесный контакт (в радиусе 1 м) с лицом, являющимся подозрительным, вероятным или подтвержденно-инфицированным ВГПА;

- контакт с погибшими, больными птицами (уход, убой, ощипывание, разделка тушек, подготовка к употреблению домашней или дикой птицы) или с их останками, а также объектами окружающей среды, контаминированными их фекалиями на территории, где в течение последнего месяца были заподозрены или подтверждены случаи инфекции ВГПА у животных или людей;

- манипуляции с образцами клинического материала (от животных или людей), подозрительными на зараженность ВГПА, в лаборатории или в иной обстановке;

- употребление сырых или недостаточно приготовленных продуктов из домашней птицы на территории, где в течение последнего месяца были заподозрены или подтверждены случаи инфекции ВГПА у животных или людей;

- тесный контакт с подтвержденно инфицированным ВГПА животным (например, кошка или свинья), но не домашними или дикими птицами.

Данный случай расценивается как подозрительный случай ВГПА.

Вероятный случай ВГПА – лицо, умершее от необъясненного острого респираторного заболевания, которое расценивается как эпидемиологически связанное по времени, месту и экспозиции с вероятным или подтвержденным случаем ВГПА, а также лицо, отвечающее критериям для подозрительного случая, и одному из дополнительных критериев:

а) инфильтраты или признаки острой пневмонии на рентгенограмме грудной клетки плюс признаки дыхательной недостаточности (гипоксемия, выраженное тахипноэ) или

б) положительный результат лабораторного подтверждения инфекции, вызванной вирусом гриппа А, но недостаточное лабораторное подтверждение инфекции ВГПА.

6.2. При наличии лабораторно подтвержденных случаев заболевания людей ВГПА на данной территории показанием к обследованию являются клинические симптомы, приведенные в п. 6.1. Дополнительные эпидемиологические признаки являются необязательными.

6.3. Исследование секционного материала от умерших на наличие вируса ВГПА проводят при:

- сходстве клинической картины заболевания, приведшего к летальному исходу, с описанной в п. 6.1 или невозможности исключения такой клинической картины в анамнезе и при наличии в анамнезе хотя бы одного из перечисленных в п.п. 6.1 дополнительных эпидемиологических признаков.

6.4. Исследования проводят с использованием диагностических тест-систем, разрешенных к применению в установленном порядке. Для выявления ВГПА методом ОТ-ПЦР предпочтение должно отдаваться диагностическим тест-системам, которые обеспечивают максимальную контаминационную безопасность исследований.

6.5. При проведении первичного тестирования на наличие вируса ВГПА должны исследоваться не менее 2 видов клинического материала (например: мазки из полости носа и из ротоглотки) с использованием как минимум двух методов – ОТ-ПЦР и МФА.

6.6. При получении отрицательных результатов исследования всех образцов выдается окончательный отрицательный ответ.

При отсутствии регистрации заболевания людей, вызванных ВГПА, на данной территории при получении хотя бы одного положительного результата при МФА исследовании или использовании ОТ-ПЦР выдается предварительный положительный ответ и образцы направляют для подтверждающего тестирования в референс-лабораторию.

В период регистрации заболевания людей, вызванных ВГПА на данной территории, обязательное подтверждающее тестирование не проводят, и при получении хотя бы одного положительного результата при использовании ОТ-ПЦР выдается окончательный положительный ответ.

6.7. При подтверждении в референс-лаборатории положительного результата первичного тестирования при исследовании хотя бы одного вида клинического материала выдается окончательный положительный ответ.

При получении в референс-лаборатории отрицательных результатов исследования двух видов клинического материала проводится повторное тестирование. При получении аналогичного результата выдается окончательный отрицательный ответ.

7. Обеспечение биобезопасности при проведении лабораторных диагностических исследований

7.1. Первичное исследование материала от больного, подозрительного на заражённость вирусом ВГПА, проводят в лабораториях, имеющих разрешение на работу с ПБА III—IV групп патогенности.

Подтверждающее тестирование осуществляется в референс-лаборатории.

7.2. Проведение работ, не связанных с накоплением вируса, образованием аэрозолей инфицированного материала (окраска и просмотр мазков, постановка серологических реакций с необеззараженным, диагностическим материалом, серологические исследования с необеззараженным материалом) осуществляют в противочумном костюме IV типа, дополненном ватно-марлевой повязкой или респиратором типа ШБ-1 (или РБ) «Лепесток-200» и резиновыми перчатками. Работы проводят в боксе биологической безопасности II класса.

7.3. Проведение работ по заражению культур клеток или куриных эмбрионов, а также связанных с возможностью образования аэрозоля осуществляют в боксах безопасности III класса. Работы проводят в противочумном костюме IV типа, дополненном ватно-марлевой повязкой или респиратором типа ШБ-1 (или РБ) «Лепесток-200» и резиновыми перчатками.

7.4. В лабораториях, проводящих диагностику заболеваний, вызванных ВГПА, должна быть аптечка экстренной профилактики, укомплектованная в соответствии с СП 1.3.1285—03 и дополнена двумя из следующих противовирусных препаратов: циклоферон, амиксин, ремантадин, альгирем, арбидол и озельтамивир (тамифлю).

7.5. Режимы обеззараживания различных объектов при лабораторной диагностике ВГПА (в соответствии с СП 1.3.1285—03).

7.5.1. Обеззараживание поверхностей помещения (пол, стены, двери), оборудования, рабочих столов и другого — двукратным протиранием с интервалом 15 мин 6 %-м раствором перекиси водорода, 3 %-м раствором хлорамина (экспозиция 120 мин) или 0,1 %-м раствором ДП-2Т (1 таблетка на 1 л воды), либо любым дезинфицирующим средством, обладающим вирулицидной активностью, с последующей обработкой УФ в течение 60 мин.

Запрещено одновременное использование 6 %-го раствора перекиси водорода и 3 %-го раствора хлорамина в пределах одной лаборатории в связи с опасностью взрывоподобного характера протекания химической реакции при смешении этих растворов.

7.5.2. Обеззараживание защитной одежды осуществляют:

а) кипячением в 2 %-м растворе соды в течение 30 мин с момента закипания;

б) замачиванием на 30 мин при 50 °С в 3 %-м растворе перекиси водорода с 0,5 % моющего средства.

7.5.3. Обеззараживание перчаток – замачиванием на 60 мин в 6 %-м растворе перекиси водорода с 0,5 % моющего средства или в 3 %-м растворе хлорамина.

7.5.4. Обеззараживание лабораторной посуды, автоклавируемых дозаторов, наконечников, вирусосодержащих жидкостей, агарозного геля, инструментария из металла проводится методом автоклавирования – давление 2,0 кг/см² (0,2 Мпа), температура (132 ± 2) °С, время 45 мин.

7.5.5. Обеззараживание дозаторов – двукратным протиранием поверхностей дозатора с интервалом 15 мин 6 %-м раствором перекиси водорода, с последующей обработкой в парах формалина в течение 60 мин.

8. Библиографические источники

1. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

3. Методические указания МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

4. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 23.10.05 № 751 «Об утверждении Временного регламента взаимодействия территориальных управлений Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации и федеральных государственных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации».

5. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 31.03.05 № 373 «О совершенствовании системы эпидемиологического надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями».

**Координаты референс-лаборатории, осуществляющей
дополнительное подтверждающее тестирование ВГПА**

Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора [Адрес: 630559, п. Кольцово Новосибирской области. Тел.: (383)-336-60-10 или 336-75-40, факс: (383)-336-74-09].

Приложение 2
(обязательное)**Способы взятия, условия хранения и транспортирования
клинического материала для лабораторной диагностики ВГПА**

1. МАЗКИ ИЗ РОТОГЛОТКИ	
1.1. Сбор материала	Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида или раствора фосфатного буфера. Конец зонда отламывают или отрезают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают
1.2. Предобработка проб	Не требуется
1.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
1.4. Условия хранения материала	При температуре от 2 до 8 °С – в течение трех суток. При температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Температура хранения минус 20 °С не допускается
1.5. Условия транспортирования материала	В специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре: • 0—4 °С – не более трех суток; • минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Температура транспортирования минус 20 °С допускается только с учетом однократного замораживания и транспортирования – без размораживания не более 4 дней
2. МАЗКИ ИЗ ПОЛОСТИ НОСА	
2.1. Сбор материала	Мазки (слизь) берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Для метода иммунофлюоресценции забор материала для этого метода исследования производят перед другими манипуляциями. После взятия материала тампон помещают в пробирку с 2—3 мл 0,1 моль/л фосфатно-солевого буферного раствора. Для получения суспензии клеток тампоны в пробирке тщательно отжимают о стенки пробирки. Тампон удаляют. Пробирку закрывают

	Для ПЦР-анализа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую микропробирку с 500 мкл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида или раствора фосфатного буфера. Конец зонда отламывают или отрезают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают
2.2. Предобработка проб	Для метода иммунофлюоресценции клетки осаждают центрифугированием в течение 5—6 мин при 3 000 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно удаляют, а клеточный осадок ресуспендируют в нескольких каплях ФСБ и наносят на предметные стекла (не менее 3 шт.) отдельными каплями. Препарат высушивают и фиксируют 10 мин в охлажденном до 2—8 °С химически чистом ацетоне. Для ПЦР-анализа – не требуется
2.3. Метод исследования	МФА, ОТ-ПЦР
2.4. Условия хранения материала	Для метода иммунофлюоресценции фиксированные неокрашенные мазки можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 6—7 дней, при температуре минус 20 °С – до 6 мес. Для ПЦР-анализа – см. п. 1.4
2.5. Условия транспортирования материала	Для метода иммунофлюоресценции в термоконтейнере с охлаждающими элементами при температуре от 0 до 4 °С. Для ПЦР-анализа – см. п. 1.5
3. СМЫВЫ ИЗ ПОЛОСТИ НОСА	
3.1. Сбор материала	Сбор материала производят от больного в положении сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью одноразового шприца вводят по 3—5 мл теплого стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного обеззараживания автоклавированием
3.2. Предобработка проб	Не требуется
3.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
3.4. Условия хранения материала	См. п. 1.4
3.5. Условия транспортирования материала	См. п. 1.5

Продолжение прилож. 2

4. СМЫВЫ ИЗ РОТОГЛОТКИ	
4.1. Сбор материала	Перед сбором материала необходимо предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10—15 с) 8—10 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного обеззараживания автоклавированием
4.2. Пред-обработка проб	Не требуется
4.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
4.4. Условия хранения материала	См. п. 1.4
4.5. Условия транспортирования материала	См. п. 1.5
5. НОСОГЛОТОЧНОЕ ОТДЕЛЯЕМОЕ	
5.1. Сбор материала	<p>Производится натошак после взятия мазков из полости носа. Осуществляется двумя способами:</p> <p>Больной в три приема прополаскивает горло 10—15 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Смыв собирают в одноразовые полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками объемом 50 мл. Ватными тампонами, зажатыми пинцетом, протирают заднюю стенку глотки и носовые ходы. Ватные тампоны опускают во флакон со смывом.</p> <p>Сухим или слегка увлажненным 0,9 %-м раствором натрия хлорида тампоном, который удерживают с помощью пинцета, протирают заднюю стенку глотки и опускают его в пробирку с 5 мл стабилизирующей среды (прилож. 3). Процедуру повторяют 2—3 раза. Все тампоны от одного больного собирают в одну пробирку. После взятия материала с задней стенки глотки тщательно протирают носовые ходы небольшими ватными тампонами и опускают их в ту же пробирку. Пробирку закрывают</p>
5.2. Пред-обработка проб	Тампоны прополаскивают в стабилизирующей среде, в которой они содержались, отжимают о стенку сосуда и удаляют. Смыв отстаивают в холодильнике 40—60 мин. Центрифугирование и фильтрацию не проводят. Для выделения вируса используют среднюю часть отстоя, которую небольшими порциями переносят в 3 стерильные пробирки. Одну используют для выделения вируса, остальные замораживают при температуре минус 70 °С или в жидком азоте

5.3. Метод исследования	Выделение вируса
5.4. Условия хранения материала	При температуре от 2 до 8 °С – не более 3 дней. При температуре минус 70 °С или в жидком азоте – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Температура хранения минус 20 °С не допускается
5.5. Условия транспортирования материала	См. п. 1.5
6. ФЕКАЛИИ	
6.1. Сбор материала	Используют пробы фекалий массой (объемом) 1—3 г (1—3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей. Фекалии забирают из предварительно продезинфицированного горшка или подкладного судна. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с аэрозольным барьером или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон
6.2. Предобработка проб	При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию в виде прозрачной жидкости (при водянистой консистенции фекалий суспензию не готовят). Приготовление фекальной суспензии. В соответствующие пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,8 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида). В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии. При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10—20 %-й суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10—15 %. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30—40 мин. Приготовление осветленного экстракта фекалий. Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10 тыс. g (12 тыс об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf,

Продолжение прилож. 2

	Германия) в течение 5 мин. Супернатант (0,1 мл) смешивают с отрицательным контрольным образцом (ОКО) (0,1 мл) в соотношении 1 : 1 и используют непосредственно для выделения РНК. При необходимости хранения супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку
6.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
6.4. Условия хранения материала	См. п.1.4
6.5. Условия транспортирования материала	См. п.1.5
7. СЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ	
7.1. Сбор материала	В качестве секционного материала используются ткани легких, трахеи, сегментарных бронхов, селезенки. Секционный материал собирают в одноразовые полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками объемом 50 мл
7.2. Предобработка проб	Кусочки органов гомогенизируют в стерильных фарфоровых ступках и готовят 10 %-ю суспензию на стерильном 0,9 %-м растворе натрия хлорида или фосфатном буфере. Суспензию переносят в микропробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 000 об. в течение 30 с. Супернатант используют для выделения РНК
7.3. Метод исследования	ОТ-ПЦР
7.4. Условия хранения материала	См. п.1.4
7.5. Условия транспортирования материала	См. п.1.5

Перечень вирусологических лабораторий и лабораторий учреждений противочумной системы Роспотребнадзора, проводящих первичный скрининг на ВГПА

ФГУЗ «ЦГиЭ» в г. Санкт-Петербурге
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Карелия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Коми
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Архангельской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Вологодской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Калининградской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ленинградской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Мурманской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Новгородской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Псковской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Воронежской области
ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии»
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Белгородской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Брянской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» во Владимирской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ивановской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Калужской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Костромской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Курской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Липецкой области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Московской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Орловской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Рязанской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Смоленской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Тверской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Тульской области
ФГУЗ «Противочумный центр Роспотребнадзора»
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ярославской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Нижегородской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Самарской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Башкортостан
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Марий Эл

Продолжение прилож. 3

ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Мордовия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Татарстан
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Удмуртия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Чувашской Республике
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Кировской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Оренбургской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Пензенской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Пермском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Саратовской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ульяновской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ставропольском крае
Ставропольский противочумный НИИ
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ростовской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Краснодарском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Калмыкия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Кабардино-Балкарской Республике
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Дагестан
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Северная Осетия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Астраханской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Волгоградской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Адыгея
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Карачаево-Черкесской Республике
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Свердловской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Курганской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Тюменской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Челябинской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Омской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Красноярском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Алтайском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Бурятия
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Тыва
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Алтай
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Иркутской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Кемеровской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Новосибирской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Томской области

ФГУЗ «ЦГиЭ» в Читинской области
Хабаровская противочумная станция
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Хабаровском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Приморском крае
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Амурской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Магаданской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Республике Саха (Якутия)
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Камчатской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Сахалинской области
ФГУЗ «ЦГиЭ» в Еврейской автономной области

Стабилизирующая среда для хранения и транспортирования материала

Рекомендуется использование следующей стабилизирующей среды для хранения и транспортирования материала от людей для дальнейших вирусологических исследований.

Среда готовится в стерильных условиях, автоклавирование не допускается, можно стерилизовать фильтрованием через нитроцеллюлозный стерильный фильтр в стерильную же посуду.

Состав:

- среда для культур клеток № 199, содержащая 0,5 % BSA;
- пенициллин 2×10^6 ед./л, стрептомицин 200 мг/л, полимиксин В 2×10^6 ед./л, гентамицин 250 мг/л, нистатин $0,5 \times 10^6$ ед./л.

**Организация и проведение лабораторной диагностики
заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами
вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей**

**Методические указания
МУК 4.2.2136—06**

Редакторы Н. Е. Аكوпова, Л. С. Кучурова
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 25 12.06

Формат 60x88/16

Тираж 1000 экз.
(1-й завод 1—500 экз)

Печ. л. 1,5
Заказ 49

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер , д 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати издательским отделом и тиражирован
отделом информационно-технического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел /факс 952-50-89