

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения -
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В. Гаевский

2014 г.

Регистрационный №021-1213

**АЛГОРИТМ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ**

Инструкция по применению

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

Авторы: Амвросьева Т.В., Поклонская Н.В., Богуш З.Ф., Дедюля К.Л.,
Казинец О.Н.

Минск, 2013

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) предназначена для врачей-вирусологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей лабораторной диагностики, врачей-гигиенистов, врачей-инфекционистов.

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 анализатор иммуноферментный или мультискан;
- 4 вода для молекулярной биологии (свободная от РНК/ДНКаз);
- 5 ДНК-маркер 50-1000 пар оснований;
- 6 иономер (рН-121);
- 7 источник тока для электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 8 комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле (агароза, концентрированный буфер для электрофореза с бромидом этидия);
- 9 камера для горизонтального электрофореза (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 10 ламинарный бокс или ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- 11 набор гребенок и емкостей для заливки гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 12 набор для выделения РНК/ДНК с помощью сорбции на силикатном носителе;
- 13 набор для обратной транскрипции: обратная транскриптаза и буфер для обратной транскрипции;
- 14 набор реагентов для амплификации кДНК ротавирусов;
- 15 набор реагентов для амплификации кДНК норовирусов человека 1 и 2 геногрупп;

- 16 набор реагентов для амплификации кДНК астровирусов;
- 17 набор реагентов для амплификации ДНК аденовирусов;
- 18 набор реагентов для амплификации кДНК энтеровирусов;
- 19 наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным фильтром в штативах, стерильные, с маркировкой “RNAse, DNAse free” (0,5 мкл – 10 мкл, 2 мкл – 20 мкл, 20 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл);
- 20 одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,5; 0,2 мл, с маркировкой “RNAse, DNAse free”);
- 21 перекись водорода (ТУ 6-02-570-75 ОСЧ);
- 22 пипетки стеклянные на 1, 5, 10 мл;
- 23 посуда лабораторная (колбы, пробирки);
- 24 препарат для ДНК-деконтаминации (ДП-2Т или аналоги);
- 25 система документирования гелей (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 26 система для автоматической промывки планшетов;
- 27 стерильные плоскодонные 96-луночные пластиковые планшеты;
- 28 тест-система для выявления антигенов ротавирусов человека методом ИФА;
- 29 тест-система для выявления антигенов норовирусов человека 1 и 2 геногрупп методом ИФА;
- 30 тест-система для выявления антигенов астровирусов человека методом ИФА;
- 31 тест-система для выявления антигенов аденовирусов 40 и 41 типов методом ИФА;
- 32 тест-система для выявления антигенов энтеровирусов методом ИФА;
- 33 набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства (ТУ РБ 100558032. 048 – 2001 изм. «2»);

- 34 набор для изоляции вирусов из питьевой воды (ТУ ВУ 100558032. 227 - 2013);
- 35 термостат, регулируемый до $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 36 термоциклер;
- 37 твердотельный термостат (для пробирок типа «Эппендорф»);
- 38 трансиллюминатор (в случае применения ПЦР тест-систем с электрофоретическим учетом результатов);
- 39 хлороформ (х.ч.) (ТУ 2631-02-11291058-96);
- 40 центрифуга рефрижераторная на 1-5 тыс. об./мин;
- 41 центрифуга лабораторная высокоскоростная с охлаждением (с ротором для пробирок типа «Эппендорф»);
- 42 центрифуга-вортекс;
- 43 холодильник-морозильник ($-18 - -20^{\circ}\text{C}$, $+4 - +8^{\circ}\text{C}$);
- 44 этиловый спирт ректифицированный (этанол, ГОСТ 5962-67).

2 Объекты санитарно-вирусологического контроля питьевой воды (ПВ)

Санитарно-вирусологический контроль ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения включает отбор и исследование проб, отобранных из

- *водоисточников* (поверхностных и подземных) перед подачей воды в распределительную сеть на уровне водопроводной станции II подъема (на одиночных подземных водозаборах/скважинах плановый отбор проб не обязателен);

- *распределительной сети* в местах водоразбора в конечных точках зоны влияния водозаборов из открытых водоисточников и подземных групповых (питающихся группой скважин) водозаборов.

3 Вирусологические показатели качества ПВ

В качестве санитарно-показательных (индикаторных) агентов при оценке ПВ по вирусологическим показателям используются энтеровирусы. Санитарно-вирусологический контроль ПВ предусматривает следующие

исследования, периодичность и порядок проведения которых регламентируются Приложением 1 к настоящей инструкции:

- обнаружение антигенов (АГ) энтеровирусов;
- обнаружение АГ потенциальных вирусов-контаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.);
- обнаружение энтеровирусной РНК;
- выявления инфекционных энтеровирусов (вирусов полиомиелита, серогрупп ЕСНО, Коксаки А и В);
- обнаружение генетического материала (РНК, ДНК) других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи – норо, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.

При плановом (текущем) и производственном санитарно-вирусологическом контроле ПВ рутинно контролируемые показателями являются АГ энтеровирусов и/или РНК энтеровирусов. При обнаружении в пробе АГ и/или РНК энтеровирусов проводится их определение в повторно взятой в экстренном порядке (в течение суток) пробе. При обнаружении хотя бы одного из данных показателей в повторно взятой пробе проводятся дальнейшие исследования по выявлению инфекционных энтеровирусов путем выделения их в культурах чувствительных клеток или методом интегрированной с культурой клеток полимеразной цепной реакции (ИКК-ПЦР), а также организуются и осуществляются дополнительные санитарно-вирусологические исследования с целью установления источника и причины вирусной контаминации ПВ в соответствии с п. 4 настоящей инструкции.

В условиях осуществления внепланового санитарно-вирусологического контроля, кроме исследований по выявлению индикаторных энтеровирусов, при необходимости проводится детекция более широкого спектра потенциальных вирусов-контаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) или конкретного

установленного возбудителя регистрируемой инфекции с использованием методов ПЦР и/или ИФА.

4 Алгоритм осуществления санитарно-вирусологического контроля ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Порядок и методы проведения санитарно-вирусологических исследований ПВ схематично изображены на рис.1.



Рис. 1 Схема индикации вирусов-контаминантов ПВ

5 Отбор и концентрирование проб.

Отбор проб осуществляется в спецодежде (халате и резиновых перчатках). После окончания работы перчатки обрабатываются спиртом, а халаты стерилизуются. Пробы маркируются с указанием населенного пункта, точки отбора, даты (число, месяц, год), должности и Ф.И.О. производившего отбор. Материал доставляет в лабораторию в максимально короткий срок (не более 6 часов). Доставленный материал немедленно обрабатывается. В порядке исключения допускается его хранение при температуре $+4^0 \pm 0,5^0$ С одни сутки. Каждой пробе присваивается идентификационный номер, под которым она регистрируется в лабораторном журнале. Далее этим номером маркируют все ёмкости (пробирки, флаконы с культурой клеток и пр.), используемые для исследования и хранения данной пробы в данной лаборатории.

Отбор проб проводится проточным методом, основанным на пропускании через вирус-улавливающий сорбирующий фильтр струи ПВ в объеме 1000 л. Для этого используются специальные средства в виде «Набора для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства (ТУ РБ 100558032. 048 – 2001 изм. 2)» или «Набора для изоляции вирусов из питьевой воды (ТУ ВУ 100558032. 227-2014)» в строгом соответствии с прилагаемой к ним инструкцией. Дальнейшая элюция сорбированного вирусного материала и его концентрирование осуществляются с использованием того же Набора, которым пользовались при отборе пробы в строгом соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

5.2 Сортировка проб

После проведения пробоподготовки каждый образец ПВ делится на 4 аликвоты, одна из которых используется для выделения ЭВ на культурах клеток, вторая – для ПЦР-исследований, третья – для ИФА исследований, четвертая - хранится при -20^0 С (как исходный материал)

5.3 Обнаружение антигенов вирусов с помощью ИФА

Для ИФА исследований по выявлению антигенов энтеровирусов и, при необходимости, антигенов других вирусов-контаминантов ПВ необходимо дополнительное концентрирование проб с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ), которое проводится в соответствии с п. 5.3.2.1 «Инструкции по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег.№134-1204 от 12.04.2005 г.). ИФА исследования осуществляются с использованием соответствующих тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке, в соответствии с инструкцией производителя.

5.4 Обнаружение РНК энтеровирусов с помощью ПЦР

Обнаружение РНК энтеровирусов осуществляется при помощи ПЦР-тест-систем, зарегистрированных в установленном порядке. Проведение исследований осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

5.5 Обнаружение РНК/ДНК других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи с помощью ПЦР

Обнаружение РНК/ДНК других возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) проводится при помощи ПЦР-тест-систем различных производителей, предназначенных для санитарно-вирусологических исследований и зарегистрированных в установленном порядке. Проведение исследований осуществляется в соответствии с инструкцией производителя.

5.6 Выделение энтеровирусов в культурах клеток и их серотипирование

Выделение энтеровирусов, определение их инфекционного титра и серотипа (серотипирование) осуществляются стандартными методами в соответствии с п. 3 «Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций (рег.№ 133-1204 от 12.04.2005 г).

5.7 Обнаружение РНК инфекционных энтеровирусов с помощью ИКК-ПЦР

Исследования проводятся в соответствии с п. 5.3.4 «Инструкции по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (рег.№134-1204 от 12.04.2005 г.).

5.8 Молекулярное типирование энтеровирусов (вирусов-контаминантов) ПВ

Молекулярное типирование проводится при необходимости осуществления оперативной идентификации (установления серо-, генотипа) энтеровирусного агента, обнаруженного в ПВ с помощью ОТ-ПЦР, или в случае невозможности его выделения и серотипирования в культуре клеток с помощью реакции нейтрализации. В связи с тем, что данные высокотехнологичные исследования требуют специального оборудования, материалов и обученных специалистов, как правило, они проводятся на базе специализированных для этих работ лабораторий РНПЦ ЭМ в рамках молекулярно-эпидемиологических исследований в соответствии с Инструкцией по применению «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции (рег.165-1208 от 11.06.2009 г.).

6 Критерии оценки эпидемической безопасности ПВ и интерпретация полученных результатов

Оценка эпидемической безопасности питьевой воды осуществляется исходя из показателей и их нормативов, изложенных в таблице 1.

Таблица 1

Показатели	Нормативы
АГ энтеровирусов	Отсутствие в 1000 л воды
АГ возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи	Отсутствие в 1000 л воды

(норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.)	
РНК энтеровирусов	Отсутствие в 1000 л воды
РНК (ДНК) возбудителей вирусных инфекций человека с водным путем передачи (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.)	Отсутствие в 1000 л воды
Энтеровирусы в инфекционной форме	Отсутствие в 1000 л воды

При осуществлении *планового (текущего) санитарно-вирусологического контроля и производственного контроля* исследуемая ПВ признается эпидемически безопасной в отношении вирусных инфекций человека при отсутствии инфекционных энтеровирусов в 1000 литров ПВ и отсутствии их АГ и РНК в повторно взятой в экстренном порядке (в течение суток) пробе объемом 1000 литров.

В условиях проведения *внепланового санитарно-вирусологического контроля* исследуемая ПВ признается эпидемически безопасной в отношении вирусных инфекций человека при отрицательных значениях всех регламентируемых показателей в объеме 1000 литров, включая антигены и генетические маркеры (РНК, ДНК) детектируемых вирусных агентов.

7 Алгоритм установления водного пути передачи вирусной инфекции

Для получения лабораторных доказательств в пользу водного пути передачи вирусной инфекции необходимо проведение комплекса санитарно-вирусологических, клинико-диагностических и молекулярно-эпидемиологических исследований с целью:

- установить этиологию данной инфекции, что предполагает серо- и генотипическую идентификацию ее возбудителя;

- установить факт контаминации ПВ данным возбудителем;
- установить генетическую идентичность этиологического агента вирусной инфекции - вируса, выделенного из клинического материала пациента, и вируса-контаминанта ПВ - вируса, обнаруженного в пробе ПВ.

Данные исследования осуществляются в соответствии с Инструкцией по применению «Лабораторный контроль за возбудителями вирусных инфекций с водным и пищевым путями передачи» (рег. № 002-0213 от 13.06.2013).

8 Возможные проблемы при осуществлении санитарно-вирусологического контроля ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения и пути их устранения

8.1 Возможные проблемы при детекции РНК энтеровирусов с помощью ПЦР и ИКК-ПЦР

Наличие ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов (в соответствии с критериями, изложенными в инструкции на соответствующую тест-систему) свидетельствует о невозможности учета результатов реакции.

Пути устранения ложноотрицательных результатов:

- при проведении всех этапов исследований необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции;
- для разведения выделенной РНК применяется только обработанная диэтилпиروкарбонатом вода, или соответствующий РНК-элюент, входящий в состав набора, во избежание загрязнения препарата РНКазами.

Пути устранения ложноположительных результатов:

- соблюдение пространственного разделения рабочих зон, использование отдельных наборов посуды, пипеток и отдельных комплектов спецодежды для каждой из рабочих зон;

- строгий запрет на перенос оборудования, пипеток, расходных материалов, халатов из одной зоны в другую.

8.2 Возможные проблемы при осуществлении ИФА

Показатели оптической плотности положительного и отрицательного контроля не соответствуют установленным пороговым уровням. Пути устранения:

- строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

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

Пути устранения:

- строгое соблюдение температурного и временного режима прохождения реакции.

8.3 Возможные проблемы при выделении энтеровирусов в культурах клеток и их серотипировании

Невозможность выделить энтеровирусный цитопатический агент классическим культуральным методом и/или невозможность его серотипировать с помощью реакции нейтрализации в культуре клеток.

Пути устранения:

- выявление в исследуемой пробе энтеровирусной РНК методом ОТ-ПЦР;

- проведение молекулярного типирования энтеровирусного материала в положительный пробах.

8.4 Возможные проблемы при получении доказательств водного пути передачи вирусных инфекций с использованием биоинформационных методов анализа

Низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК-мишени для секвенирования.

Пути устранения:

-проведение 3 пассажей исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вируса если он является культивируемым (адено-, энтеровирусы).

Если вирусы-контаминанты ПВ являются некультивируемыми, или плохо культивируемыми (рота-, коро-, астровирусы), то их низкое содержание в пробах считается непреодолимым препятствием для секвенирования. В последнем случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации ПВ в совокупности с данными эпидемиологического расследования могут рассматриваться в качестве достаточных доказательств для установления водного пути передачи вирусной инфекции.

Приложение 1

Периодичность отбора проб и контролируемые вирусологические показатели при осуществлении санитарно-вирусологического контроля ПВ в системе централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Виды контроля	Водоисточники ¹⁾ , вирусологические показатели				Распределительная сеть ²⁾ , вирусологические показатели	
	Подземные		Поверхностные			
	Антиген (РНК) энтеровирусов ³⁾	Энтеровирусы ⁴⁾	Антиген (РНК) энтеровирусов ³⁾	Энтеровирусы ⁴⁾	АГ (РНК) энтеровирусов ³⁾	Энтеровирусы ⁴⁾
Плановый (текущий)	4 раза/год (1 раз в сезон)	При наличии антигена (РНК)	1 раз/месяц (ежемесячно)	При наличии антигена (РНК)	1 раз/месяц (ежемесячно)	При наличии антигена (РНК)
Внеплановый ⁵⁾	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)
Производственный	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)	В соответствии с разработанной рабочей программой	При наличии антигена (РНК)

Примечание:

- 1) Определение проводится перед подачей воды в распределительную сеть в пробах, отобранных на водопроводной станции II подъема. На одиночных подземных водозаборах (скважинах) плановый отбор проб не обязателен.
- 2) Определение проводится в пробах, отобранных в местах водоразбора в конечных точках зоны влияния водозаборов из открытых водоисточников и подземных групповых (питающихся группой скважин) водозаборов. Количество исследуемых проб – не менее 1 на каждый из указанных водозаборов.
- 3) При обнаружении в пробе питьевой воды АГ и/или РНК энтеровирусов проводится их определение в повторно взятой в экстренном порядке (в течение суток) пробе. При обнаружении АГ и/или РНК энтеровирусов в повторно взятой пробе воды, проводятся исследования по выявлению инфекционных энтеровирусов методом ИКК-ПЦР или путем выделения на культурах чувствительных клеток.
- 4) Исследования проводятся путем выделения вирусов в культурах чувствительных клеток или методом ИКК-ПЦР.
- 5) В определенных условиях (наличие данных о групповой заболеваемости вирусными инфекциями с водным путем передачи, сведений о заносе на данную территорию новых высокопатогенных вирусов и т.д.), кроме исследований по выявлению индикаторных энтеровирусов, проводится детекция более широкого спектра потенциальных вирус-контаминантов ПВ (норо-, рота-, адено-, сапо-, астровирусов, вирусов гепатитов А и Е и др.) или конкретного установленного возбудителя регистрируемой инфекции с использованием методов ПЦР и/или ИФА.

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.