

**Рекомендации
по надзору за вирусом полиомиелита
в окружающей среде**



Вакцины и биологические препараты
Всемирная Организация здравоохранения
2003

WHO/V&B/03.03
Оригинал английский

**Рекомендации
по надзору за вирусом полиомиелита
в окружающей среде**

Вакцины и биологические препараты
Всемирная Организация Здравоохранения
2003

СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ.....	4
РЕЗЮМЕ	5
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. СОСТАВЛЕНИЕ ПЛАНА НАДЗОРА ЗА ВИРУСОМ ПОЛИОМИЕЛИТА В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ.....	7
2.1 Определение групп населения, для обследования которых предпринимается надзор	7
2.2 Компоненты национального плана надзора	8
2.3 Продолжительность и сроки сбора проб в различных условиях.....	8
2.4 Принципы выбора мест для взятия проб	9
2.5 Принципы сбора проб и его материальное обеспечение.....	9
2.6 Обработка проб в лаборатории	11
2.6.1 Лабораторная обработка одномоментных проб.....	11
2.6.2 Лабораторная обработка проб сточной воды, полученных методом адсорбции	12
2.7 Выявление полиовируса в пробах из окружающей среды.....	12
2.8 Характеристика выделенных штаммов полиовируса	13
2.9 Представление сообщений о результатах лабораторных исследований	14
2.10 Интерпретация результатов и их значения	14
ЛИТЕРАТУРА.....	16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	24

Сокращения

ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения
ВТД	- внутритиповая дифференциация выделенных штаммов полиовируса для определения их близости к дикому или вакцинному вирусу
ИПВ	- инактивированная полиовирусная вакцина
МЗ	- Министерство здравоохранения
НДИ	- национальные дни иммунизации
НПЛ	- национальная полиовирусная лаборатория
ОВП	- острый вялый паралич
ОПВ	- оральная полиовирусная вакцина
ПВ	- полиовирус
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
РПИ	- расширенная программа иммунизации ВОЗ
РРЛ	- региональная референс-лаборатория
ТЦИД ₅₀	- тканевая цитоингибирующая доза (пятидесятипроцентная).

Резюме

Надзор за острыми вялыми параличами (ОВП) считается «золотым стандартом» эпидемиологического надзора в программе ликвидации полиомиелита. В определенных обстоятельствах ценная дополнительная информация может быть получена при помощи надзора за окружающей средой. Однако из-за специфических сложностей и необходимости привлечения дополнительных ресурсов обследование окружающей среды следует ограничивать и проводить в обоснованно выбранных районах, где предполагаются недочёты в проведении надзора за ОВП и где существуют условия, которые увеличивают риск циркуляции полиовируса среди населения (например, низкий охват детей прививками или риск завоза полиовируса). Обследование окружающей среды следует начинать только после тщательного планирования всех его этапов и всесторонней оценки потенциальных выгод и негативных факторов.

В прошлые годы для наблюдения за энтеровирусами в окружающей среде использовались различные способы сбора проб и их обработки. Однако в опубликованных на эту тему материалах нет достаточных сравнительных данных для убедительного подтверждения преимуществ какого-либо из способов для выявления низких уровней циркуляции полиовируса среди населения. Поэтому в странах, уже проводящих надзор за окружающей средой, целесообразно продолжать пользоваться принятой схемой исследований при соблюдении других рекомендаций настоящего руководства и при положительной оценке используемых методов.

Странам, планирующим начать проведение надзора за окружающей средой, нужно заранее провести консультации с соответствующим региональным бюро ВОЗ и использовать приводимые ниже рекомендации в планах предстоящей работы. В частности, до начала этой работы необходимо получить полную уверенность в наличии достаточных лабораторных ресурсов, возможности предварительного обучения персонала и аттестации используемых лабораторных методов. План надзора за окружающей средой должен содержать чёткие указания о конкретной ответственности за представление сообщений и отчётов, чтобы гарантировать согласованное использование всей эпидемиологической информации о возможной циркуляции полиовируса среди населения.

1. Введение

Исследование проб фекалий от больных, выявленных в процессе эпидемиологического надзора за острыми вялыми параличами (ОВП), позволяет установить конкретных носителей выделенных штаммов полиовируса и провести дальнейшее изучение этих носителей и соответствующей группы населения. Эпидемиологический надзор за ОВП считается «золотым стандартом» программы ликвидации полиомиелита.

Исследование комбинированных проб фекалий в процессе надзора за окружающей средой позволяет установить связь полиовируса, выделяемого неизвестными лицами, с группой населения, которая обслуживается соответствующей частью системы сточных вод. Надзор за окружающей средой может дать также ценную дополнительную информацию, в частности, для групп городского населения, где не осуществляется эпидемиологический надзор за ОВП (или проведение его ставится под сомнение), подозревается постоянная циркуляция полиовируса или может иметь место его частая реинтродукция.

Логическое обоснование проведения надзора за окружающей средой базируется на характерной картине экскреции полиовируса с фекалиями. Инфицированные лица выделяют полиовирус с фекалиями в течение нескольких недель вне зависимости от наличия клинических симптомов. Большое число выделяемых с фекалиями частиц полиовируса сохраняет в окружающей среде инфекционность в течение различного времени в зависимости от конкретных условий. Вирус может быть обнаружен разными лабораторными методами с использованием концентрации, очистки и идентификации.

Надзор за окружающей средой успешно использовался для слежения за циркуляцией энтеровирусов и оценки масштаба или продолжительности циркуляции эпидемического полиовируса в отдельных группах населения. В некоторых странах дикий полиовирус обнаруживался в окружающей среде при отсутствии выявленных случаев ОВП. Надзор за окружающей средой может служить потенциальным средством наблюдения за циркуляцией полиовирусов происхождения и оценки коллективного иммунитета в группах населения, вакцинированных инактивированной полиовирусной вакциной (ИПВ).

Эффективный надзор за окружающей средой требует научно обоснованного проведения, специальной лабораторной подготовки, а также полевых и лабораторных ресурсов. Первым шагом в выработке решения о включении надзора за окружающей средой в местные или национальные программы должна быть оценка его роли в комплексе региональных и национальных задач эпидемиологического надзора за полиомиелитом. Ниже приводятся рекомендации, которые содержат информацию, помогающую странам в оценке положительных сторон надзора за окружающей средой, в разработке эффективного плана, в выборе соответствующих методов, в интерпретации полученных данных и в выработке эффективных действий программы с учётом получаемых результатов надзора.

2. Составление плана надзора за вирусом полиомиелита в окружающей среде

2.1 Определение групп населения, для обследования которых предпринимается надзор

Правильно проводимый надзор за окружающей средой предоставляет наилучшие возможности для получения важной информации о циркуляции полиовируса, если предполагается, что эффективность эпидемиологического надзора за ОВП не является оптимальной, и группа населения, в которой ведётся обследование, обладает одной или несколькими из перечисленных особенностей:

- недостаточный охват иммунизацией (известный или предполагаемый), осуществляемой обычным путём или с включением дополнительных мероприятий (например, НДИ), проводившихся в прошлом или недавно;
- сведения о недавней циркуляции в обследуемой группе населения дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения;
- существующий риск заноса дикого полиовируса лицами, пересекающими границу, или путём контакта с другими группами населения, в которых циркулирует полиовирус.

Необходимо провести консультации с местными руководителями санитарно-инженерных служб, чтобы оценить возможности сбора представительных проб окружающей среды, происходящих из тех групп населения, которые предполагается обследовать. Нужно тщательно изучить существующие пути движения бытовой сточной воды. Предпочтение следует отдавать канализационным коллекторам сточных вод, которые обслуживают обследуемое население, поскольку это позволяет следить за большими группами людей, собирая пробы в одном месте - в крупном коллекторе. Другие виды удаления сточных вод (как, например, открытые канавы или каналы) в ряде случаев помогли выявить циркуляцию дикого полиовируса в обследуемых группах населения, хотя обследование проб из таких источников может оказаться менее чувствительным по сравнению с обследованием проб из крупных канализационных коллекторов.

Большой объём сточных вод, приходящих в крупный коллектор, может снизить чувствительность обследования, поскольку она зависит от концентрации вируса в каждой отдельной пробе сточной воды. Для обнаружения полиовируса в конкретной пробе необходимо некоторое минимальное число инфицированных полиовирусом лиц, фекалии которых попадают в сточные воды. В больших городах может оказаться необходимым разбить обследуемое население на группы и обследовать небольшие фрагменты этих групп. В условиях города полиовирус быстро распространяется среди восприимчивых лиц, поэтому обследование небольших групп городского населения считается достаточно представительным.

2.2 Компоненты национального плана надзора

После того, как в стране принято решение проводить надзор за окружающей средой, необходимо разработать всесторонний детальный план, который утверждается министерством здравоохранения. В разработке этого плана используют опыт национальной расширенной программы иммунизации, национальной полиовирусной лаборатории, санитарно-инженерных служб и других региональных и местных организаций. На ранних стадиях разработки плана целесообразно получить консультацию от регионального бюро ВОЗ.

План должен включать следующие элементы:

- продолжительность и сроки сбора проб;
- детали, характеризующие места, намеченные для сбора проб (численность и расположение населения, к которому пробы будут относиться);
- ответственность за сбор проб, инструкции по сбору, материальное обеспечение;
- лабораторные возможности - помещение, персонал, оборудование и реактивы;
- протоколы обработки проб и идентификации выделенных штаммов вируса;
- ведение документации и отчётности (содержание отчётов, схема представления отчётности);
- обучение персонала и обеспечение качества работы;
- предполагаемые действия, связанные с получением тех или иных результатов лабораторных исследований.

Важно учесть при планировании и финансовых расчётах, что обработка и исследование проб из окружающей среды будут составлять значительный объём лабораторной работы. В противном случае и сам надзор за окружающей средой и его лабораторное обеспечение могут пострадать из-за недостатка ресурсов.

2.3 Продолжительность и сроки сбора проб в различных условиях

Надзор за окружающей средой может быть предпринят с различными целями. Если целью является получение дополнительных сведений для прекращения циркуляции дикого полиовируса среди населения, то наиболее подходящей станет программа долговременного регулярного сбора проб. Предпочтительная частота сбора - две пробы в месяц (в крайних случаях - одна проба). Сбор проб следует проводить не менее одного года, наилучшей схемой нужно считать трёхлетние регулярные сборы проб со времени последнего обнаружения дикого полиовируса. Если обследование окружающей среды обусловлено известной или подозреваемой реинтродукцией дикого полиовируса или появлением случаев полиомиелита, вызванных циркулирующим полиовирусом вакцинного происхождения, первоначальный план может быть рассчитан на более короткое время (но не менее 12 месяцев) и предусматривать

более частые сборы проб и более точный выбор группы населения, на которую рассчитано планируемое обследование. Это обследование обязательно должно сопровождаться максимально интенсивным надзором за ОВП (см. Приложение 4). Независимо от цели предполагается, что значительная часть проб будет содержать полиовирус, происходящий от ОПВ, в тех странах, где ОПВ применяется в программах иммунизации. Надзор за окружающей средой может в этих случаях служить потенциальным подходом к слежению за «молчаливой» циркуляцией полиовирусов вакцинного происхождения среди населения. Даты сбора проб должны согласовываться с лицами, ответственными за материальное обеспечение, а также с национальными полиовирусными лабораториями (НПЛ), чтобы избежать ненужного увеличения интервала между сбором проб и их лабораторным исследованием.

2.4 Принципы выбора мест для взятия проб

К рекомендуемым местам сбора проб относятся места впуска сточных вод в очистные сооружения или крупные канализационные коллекторы. Индустриальные сточные воды могут содержать вещества, токсичные для культур клеток или угнетающие размножение вируса. Это следует принимать во внимание при выборе мест сбора проб. При отсутствии системы канализации возникают трудности в подыскании мест сбора проб, и надзор за окружающей средой можно организовать только в тех случаях, когда основные пути удаления бытовых отходов или стоков, содержащих фекалии человека, хорошо известны. Если система канализации отсутствует, надзор за окружающей средой (имея в виду определенные группы населения) может осуществляться через хорошо спланированное исследование систематически собираемых проб фекалий.

Места, выбранные для регулярного сбора проб, должны представлять определенную группу населения, отличающуюся повышенным риском инфицирования полиовирусом. Желательный размер такой группы от 100000 до 300000 человек. Если работа проводится с меньшими группами населения, и места сбора проб расположены достаточно близко друг к другу, можно рассмотреть возможность исследования объединенных проб, чтобы уменьшить объём лабораторной работы. В тех случаях, когда обследуемая группа больше оптимального размера, соответствующее понижение чувствительности системы обследования можно компенсировать более частым сбором проб, учитывая при этом, что соответственно увеличится объём лабораторной работы.

2.5 Принципы сбора проб и его материальное обеспечение

В плане должно быть чётко указано, кто ответственен за сбор проб в каждом месте их сбора. Этот сбор может быть организован местными или центральными учреждениями - через министерство здравоохранения или НПЛ (в зависимости от того, что эффективнее в конкретных обстоятельствах). Включение в эту работу уже действующих программ сбора и исследования проб сточных вод целесообразно везде, где это возможно. Лица, ведущие сбор проб, должны быть обучены и получить письменные инструкции по сбору.

Существуют два принципиальных способа сбора проб материалов внешней среды для вирусологического исследования, обозначаемые как «захват» (grab) и «ловушка» (trap). По первому методу (далее обозначается как одномоментный) некоторое количество сточной воды берут в месте сбора в определенное время

или, предпочтительнее, серию проб собирают в разное заранее намеченное время, чтобы затем составить смешанную пробу, соответствующую времени сбора отдельных проб. Многие очистные сооружения оснащены автоматическим оборудованием для сбора проб с регулярными интервалами в течение суток или в часы наибольшего сброса в канализацию бытовых сточных вод. Можно проводить ручной сбор одномоментных проб, из которых затем будут готовиться смешанные пробы, однако в этом случае трудно гарантировать постоянное точное повторение однообразных процедур. Если автоматическое оборудование отсутствует и время наибольшего сброса бытовых сточных вод неизвестно, для исследования используют однократные пробы, которые собирают в одном и том же месте в определённое время.

Рекомендуемый объём этого вида проб - один литр. В принципе, чем больший объём сточных вод исследуется, тем выше теоретическая чувствительность выявления циркуляции полиовируса в обследуемой группе населения. Однако в практических условиях с объёмами, превышающими один литр, в лаборатории трудно работать, поэтому при необходимости пробы большого объёма можно заменить несколькими параллельными пробами меньшего объёма. Нужно иметь в виду, что большие объёмы проб или увеличение числа обычных проб (параллельные пробы) увеличивают время и объём исследований и могут обусловить уменьшение точек сбора проб сточных вод. Рекомендации по сбору одномоментных проб изложены в Приложении 1.

Пробы по типу «ловушек» (далее обозначаются как адсорбционные) собирают при помощи мешочков, наполненных абсорбирующим материалом, которые погружают в ток сточной воды и подвешивают на прочной нити. Через день (или более длительный срок) мешочек извлекают и направляют в лабораторию, где проводят элюцию абсорбированного материала и исследуют его на наличие полиовируса.

Пробы одномоментные предпочтительнее адсорбционных погружных, поскольку они более пригодны для количественных расчётов чувствительности системы, а длительный опыт показывает, что в программах, использующих концентрированные одномоментные пробы, полиовирусы и другие энтеровирусы обнаруживают более часто, чем в программах, использующих адсорбционный метод. Если одномоментные пробы оказываются неподходящими, можно испробовать адсорбционный метод, в котором используют стандартизованное количество макропористого стекла, помещённого в водопроницаемый мешочек (Приложение 2). Марлевые тампоны не рекомендуются, поскольку трудно обеспечить необходимую стандартизацию абсорбента. Независимо от избранного метода сбора собранные пробы следует немедленно поместить на холод и держать охлаждёнными во время транспортировки в НПЛ, которое не должно превышать 48 часов после сбора. Лаборатория должна быть заранее предупреждена о направлении проб и подтвердить их получение.

Примечание. Альтернативным методом сбора смешанных проб может служить сбор содержимого первичного отстойника в системе очистных сооружений, если среднее время переброски стока составляет меньше 24 часов. Однако, несмотря на теоретическую основательность, данные в пользу преимуществ этого подхода по сравнению с методом простого одномоментного взятия пробы из сборного канализационного коллектора весьма скудны. Часовые колебания мощности потока бытовых сточных вод могут оказаться значительными (а необходимость сбора смешанных проб, приуроченных к определенному времени, быть реальной) в тех случаях, когда обследуемое население относительно невелико, и место сбора проб находится поблизости от жилой территории.

2.6 Обработка проб в лаборатории

Концентрация полиовируса в пробах из окружающей среды даже после процедур концентрирования обычно ниже, чем в пробах фекалий от лиц, инфицированных полиовирусом. Обработка проб того и другого типа в лаборатории включает этапы, на которых может образовываться аэрозоль, поэтому следует принимать все меры предосторожности, чтобы исключить перекрестное инфицирование проб. Обработка и исследование проб из окружающей среды не должны быть помехой для работы с материалами, собирающимися по программе ОВП. Рекомендуется, чтобы для работы с пробами из окружающей среды и с пробами по программе ОВП были предусмотрены отдельные группы персонала и отдельные помещения.

2.6.1 Лабораторная обработка одномоментных проб

Половину собранной пробы сточных вод (500 мл) перед введением в культуру клеток подвергают концентрированию, чтобы повысить вероятность выделения вируса. Вторая половина пробы хранится при 4°C как резерв до успешного введения в культуру клеток концентрированного материала первой половины. Первым этапом любого способа концентрации служит осветление пробы - удаление более крупных твёрдых взвешенных частиц при помощи центрифугирования (Приложение 1). Полиовирус может быть частично связан этими частицами, поэтому осадок хранят при 4°C, чтобы потом объединить с надосадочной жидкостью.

Одним из часто используемых методов концентрации проб сточных вод служит метод двухфазного разделения (Приложение 1). Заданный объём осветлённой сточной воды смешивают с выбранными объёмами двух полимеров - декстрана и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Гомогенную смесь этих ингредиентов, полученную путём энергичного встряхивания, оставляют на ночь при 4°C в делительной воронке. Это позволяет полимерам разделиться и сформировать в воронке два отчётливых слоя (две фазы). Энтеровирусы накапливаются в меньшем нижнем слое или на границе двух фаз (интерфаза). Нижний слой и интерфазу собирают капельным способом. Осадок первоначального центрифугирования вносят в этот концентрат, взвесь обрабатывают хлороформом и проверяют наличие в ней вируса. Описанным способом проба концентрируется в 50-100 раз.

Этот метод достаточно прост и может использоваться в любой НПЛ, где проведено необходимое обучение персонала, имеется в наличии необходимое оборудование и обеспечено постоянное снабжение необходимыми реактивами.

Примечание. Для концентрации проб сточных вод успешно используют и другие методы; принципиальная характеристика двух из них приводится ниже.

Преципитация при помощи полиэтиленгликоля включает обработку проб на высокоскоростной центрифуге с ротором для больших объёмов. На одной центрифуге в течение рабочего дня можно обработать максимально три пробы. Средняя затрата времени на обработку одной пробы этим методом больше, чем на обработку методом двухфазного разделения.

Ультрафильтрация для концентрирования проб может применяться при наличии специального оборудования.

При использовании любого из этих двух методов можно достичь более чем стократной концентрации, однако, при работе с пробами сточных вод в оценке концентрации необходимо учитывать следующее: 1) токсические компоненты пробы также могут концентрироваться; 2) выделяемость вируса из концентрированного материала не возрастает пропорционально концентрации; 3) если при более высоком концентрировании переходят на использование меньшего числа флаконов (пробирок) с культурой клеток для выделения вируса, то выявление и разделение смесей разных вирусов может стать более сложным.

Какой бы метод концентрации не использовался, он должен пройти в лаборатории аттестацию и оценку при помощи «пиковых проб» (spiking experiments). Их описание приводится в Приложении 1 - оценка степени концентрации. Хорошим методом следует считать тот, который позволяет обнаружить 10-20 ТЦИД₅₀ полиовируса в 500 мл пробы сточной воды.

2.6.2 Лабораторная обработка проб сточной воды, полученных методом адсорбции

Разработана методика элюции для высвобождения полиовируса, адсорбированного на измельчённом макропористом стекле в мешочках для сбора проб (Приложение 2). Стеклопудру переносят в маленькую стеклянную колонку и последовательно споласкивают буферным раствором. Элюат обрабатывают хлороформом и вводят в культуру клеток.

Для аттестации этого метода в лаборатории также используют «пиковую пробу» (Приложение 1).

2.7 Выявление полиовируса в пробах из окружающей среды

Концентраты проб сточных вод и элюаты, полученные из проб, собранных методом адсорбции, исследуют на присутствие полиовируса так же, как исследуют пробы фекалий. Однако с учётом специфической природы проб в методику исследований рекомендуется внести некоторые модификации. Для проведения в последующем проверочных исследований одну четверть обработанной пробы (не менее 1 мл) замораживают и хранят при -20°C. Для оптимального исследования большую часть остающейся обработанной пробы вводят в культуры клеток L20B и RD(A).

Для исследования одной пробы используют культуру клеток площадью не меньше 75 см². Это эквивалентно трём флаконам ёмкостью 50 мл (около 25 см² клеточной поверхности в каждом). Два из них должны быть с культурой клеток L20B и один - с клетками RD(A). После замены ростовой среды на 4,5 мл поддерживающей среды в каждый флакон вносят по 0,5 мл обработанной пробы сточной воды. Если для исследования одной пробы используют более 3 флаконов, то лучше увеличить число флаконов с клетками L20B, чем RD(A), поскольку клетки L20B избирательно чувствительны к полиовирусу. Пробы из окружающей среды часто содержат большое количество энтеровирусов неполиовирусной природы, которые могут маскировать рост полиовируса в клетках RD(A). Однако выявление неполиовирусных энтеровирусов в клетках RD(A) служит внутренним контролем полевых и лабораторных методов.

Поддержание инфицированных культур и слежение за ними должны быть такими же, как и при исследовании клинических проб (см. Руководство ВОЗ по лабораторным исследованиям полиовирусов), включая и немые пассажи (если

необходимо), перекрестные пассажи штаммов, выделенных на клетках RD(A), в клетках L20B (пассажи в пробирочных культурах) и серологическое типирование выделенных штаммов с использованием стандартизованного набора иммунных сывороток, рекомендованного ВОЗ. Штаммы, выделенные на клетках L20B, должны обследоваться в первую очередь, поскольку пробы из окружающей среды часто содержат трудно разделяемые смеси энтеровирусов неполиовирусной природы.

Примечание. Использование описанных выше флаконных культур клеток повышает риск потери тех компонентов вирусных смесей, которые присутствуют там в малых количествах. Частично снизить такой риск может помочь использование серии пробирочных культур клеток вместо единичных флаконных, однако, при этом значительно возрастает объём лабораторной работы. Было показано, что выделение штаммов вирусов из проб окружающей среды методом бляшек устраняет этот риск, особенно если этот метод сочетается с пассажем вирусного штамма при повышенной температуре с целью избирательного выделения дикого полиовируса и быстрого его изучения. Для проведения исследований по такой схеме необходимо организовать обучение персонала и иметь отдельный надёжный термостат для работы с повышенной температурой.

2.8 Характеристика выделенных штаммов полиовируса

Прежде всего должна быть установлена природа каждого из штаммов полиовируса, выделенных из проб окружающей среды (дикий или вакцинный полиовирус). Рекомендуется провести эти исследования в региональной полиовирусной лаборатории, аккредитованной ВОЗ, в течение 14 дней после выделения штамма полиовируса. В этих лабораториях в настоящее время в первую очередь исследуют штаммы полиовируса, выделенные от случаев ОВП и контактировавших с ними лиц. Надзор за окружающей средой значительно увеличит объём исследований в лаборатории, особенно с применением теста ВТД, так как в странах, где используют ОПВ, следует ожидать выделения значительного числа полиовирусных штаммов вакцинного происхождения. Поэтому при планировании работы должно быть предусмотрено материальное обеспечение исследований в реакции ВТД. Следует иметь в виду, что штаммы полиовируса, выделенные при параллельных исследованиях проб из окружающей среды, могут оказаться не идентичными, даже если относятся к одному серотипу, а представлять смесь вирусов - вируса, сходного с вакцинным, и вируса, отличного от вакцинного. Резервное количество материала пробы должно сохраняться в национальной полиовирусной лаборатории для направления в региональную референс-лабораторию, если потребуется провести повторные исследования.

Штаммы полиовируса, исследование которых даёт противоречивые результаты внутритиповой серодифференциации антигенными и генетическими методами, могут быть циркулирующими полиовирусами вакцинного происхождения. Для дальнейшего изучения нужно провести их секвенирование, как это делается со штаммами, выделенными из клинических материалов. Пробы материалов из окружающей среды часто содержат смеси полиовирусов, что может осложнить интерпретацию результатов внутритиповой серодифференциации.

2.9 Представление сообщений о результатах лабораторных исследований

Представление в МЗ и ВОЗ сообщений о результатах лабораторных исследований по надзору за окружающей средой должно проводиться в соответствии с рекомендациями по отчётности для клинического надзора с учётом необходимости регулярных сообщений о проведенной работе и полученных результатах и немедленных извещений о выделениях дикого полиовируса. В плане работы нужно описать, как ведётся отчётность, и указать, кто является ответственным за сообщения о результатах работы.

2.10 Интерпретация результатов и их значения

Путь полиовируса от инфицированного человека через окружающую среду в культуру клеток в национальной полиовирусной лаборатории весьма сложен, поэтому результаты, получаемые при проведении надзора за окружающей средой, следует интерпретировать с большой осторожностью. Одним из критериев удовлетворительного проведения программы надзора может служить обнаружение в пробах сточных вод неполиовирусных энтеровирусов. Эти вирусы обнаруживают не менее чем в 30 % концентрированных одномоментных проб сточных вод и не менее чем в 10 % проб, полученных адсорбцией на макропористом стекле. Там, где население прививается ОПВ, надзор за окружающей средой должен обнаруживать также вакцинные полиовирусы особенно в период проведения национальных дней иммунизации и других прививочных кампаний и некоторое время после их завершения.

Большое число полиовирусов вакцинного происхождения, обнаруживаемых в сточных водах, может теоретически маскировать малые количества дикого полиовируса, если используются стандартные методы без специальных приёмов, повышающих их избирательность по отношению к дикому полиовирусу. Однако практический опыт даёт множество примеров удачного выделения дикого полиовируса во время проведения НДИ и сразу вслед за их проведением, поэтому нет необходимости прерывать надзор за окружающей средой из-за кампании прививок ОПВ.

Выделение дикого полиовируса из пробы окружающей среды равнозначно выявлению случая паралитического полиомиелита, вызванного диким полиовирусом, и обосновывает аналогичные действия, которые должны установить, связано ли появление дикого полиовируса с его недавним заносом на обследуемую территорию или имеет место циркуляция дикого полиовируса среди населения (Приложение 4). Необходимо усилить эпиднадзор за ОВП среди населения (Приложение 4), организовать более частое взятие проб из окружающей среды, а возможно пересмотреть схему надзора за окружающей средой и провести подготовку к усилению работы по иммунизации. Находки вируса в окружающей среде должны оцениваться в сопоставлении с другой эпидемиологической информацией. По предлагаемым программам действий целесообразно провести консультации с региональным бюро ВОЗ.

Выделение дикого полиовируса из проб окружающей среды обычно означает, что определенное число жителей обследуемого района выделяет вирус. Отрицательные результаты оценить более трудно и их следует рассматривать в сопоставлении со схемой взятия проб и эффективностью лабораторных исследований. Теоретический максимум чувствительности метода проб

окружающей среды можно рассчитать с использованием некоторых допущений (Приложение 3). Увеличение кратности взятия проб повышает вероятность выявления низких уровней циркуляции среди населения дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения. Если такое обследование рекомендуемыми методами проводится регулярно и показатели качества обследования удовлетворительны, то отрицательные результаты выделения полиовируса в течение 12 месяцев указывают на отсутствие его циркуляции среди населения. Если полиовирус из проб окружающей среды не выделяется в течение трёх последовательных лет, то вероятность его присутствия среди населения обследуемой территории крайне мала. Однако, если существует значительный риск заноса дикого полиовируса, такое заключение необходимо делать с учётом этого обстоятельства.

Литература

- Albertson P. Two-phase separation of viruses. In: Maramorosch K., Koprowski H. eds. *Methods of virology*. New York, Academic Press Inc., 1967, 303-21.
- Alexander J.P. Jr. Gary H.E. Jr, Pallansch M.A. Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *Journal of infectious diseases*, 1997, 175 (Suppl 1), 176-82.
- Van der Avoort H.G. et al. Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type outbreak in The Netherlands. *Epidemiology and infection*, 1995, 114, 481-91.
- Baeva L. et al. Using different sorbents for the concentration of enteroviruses. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology and immunology*, 1990, 2, 199-205.
- Bottiger M. and Herrstrom E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics. Experience over two decades in Sweden. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 1992, 24, 151-155.
- Conyn van Spaendock M.A.E. et al. Circulation of poliovirus during the poliomyelitis outbreak in the Netherlands in 1992-1993. *American journal of epidemiology*, 1996, 143, 929-35.
- Dowdle W.R. and Birmingham M.E. The biologic principles of poliovirus eradication. *Journal of infectious diseases*, 1997, 175 (Suppl.1), 286-92.
- Horstmann D.M. et al. Enterovirus surveillance following community-wide oral poliovirus vaccination program: a seven year study. *American journal of epidemiology*, 1973, 97, 173-186.
- Hovi T. et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet*, 1986, 2, 1427-1432.
- Hovi T. et al. Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. *Epidemiology and infection*, 2001, 127, 101-106.
- Kew O.M. et al. The role of virologic surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. In: Kurstak E. ed. *Control of virus diseases*. New York, Marcel Dekker, 1993, 215-246.
- Конторович В.Б., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Ширман Г.А., Казанцева В.А. Метод концентрирования вирусов в водных объектах окружающей среды. *Вопросы вирусологии*, 1996, 1, 40-42.
- Manor Y. et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *Journal of clinical biology*, 1999, 37, 1670-5.
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip over 50 years. *Annual review of microbiology*, 1995, 49, 461-87.

Miyamura K. et al. Poliovirus surveillance: isolation of poliovirus in Japan 1980-1991. A report of the national epidemiological surveillance agents in Japan. *Journal of medical science and biology*, 1992, 45, 203-214.

Nelson D.B., Circo R., Evans A.S. Strategic viral surveillance of sewage during and following an oral poliovirus vaccine campaign. *American journal of epidemiology*, 1967, 86, 641-652.

Poyry T., Stenvik M., Hovi T. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Applied and environmental microbiology*, 1988, 54, 371-374.

Ranta J., Hovi T., Arjas E. Poliovirus surveillance by examining sewage water specimens: Studies on detection probability using simulation models. *Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis*, 2001, 21, 1087-1096.

Rao V.C., Metcalf T.G., Melnick J.L., Human viruses in sediments, sludges and soils. *Bull. WHO*, 1986, 64, 1-14.

Shieh Y.-S.C., Wait D., Tai L., Sobsey M.D. Methods to remove inhibitors in sewage and other faecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, 1995, 54, 61-66.

Shulman L.M., et al. Resolution of the pathways of poliovirus type 1 transmission during an outbreak. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38, 945-952.

Tambini G. et al. Direct detection of wild poliovirus circulation by stool survey of healthy children and analysis of community wastewater. *Journal of infectious diseases*, 1993, 168, 1510-1514.

World Health Organization. Polio Laboratory Manual (available on the Internet at http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/PolioManual%20Version_May_01.pdf).

Приложение 1

Сбор и концентрация одномоментных проб сточных вод

А. Сбор одномоментных проб сточных вод

Национальный план надзора за окружающей средой должен содержать чёткие детализованные инструкции по следующим разделам работы.

Места сбора проб и лица, ответственные за сбор

Пробы сточных вод могут собираться на очистных сооружениях, предпочтительно из канала входного коллектора, или (если население, от которого собираются сточные воды, представляется слишком большим) из крупных коллекторов сточных вод канализационной сети. Доступность намеченных точек сбора проб должна быть обсуждена и согласована с представителями местных санитарно-инженерных учреждений.

Детали обеспечения работы флаконами для сбора проб и распределение ответственности

В работе используют прочные стеклянные или пластиковые флаконы ёмкостью 1,0 -1,5 литра. Они должны быть чисто вымыты, однако стерилизация их не обязательна. Форма сосуда (бутылка, банка и т.д.) не играет большой роли, но он должен плотно закрываться и соответствовать контейнеру, в котором пробы будут транспортироваться. Каждый флакон должен иметь чёткий идентификационный код и сопровождаться заполненной формой, указывающей место и время сбора пробы.

Методика сбора проб в каждом из намеченных мест

Если нет возможности автоматического сбора проб, каждую пробу берут вручную из серединной части канализационного коллектора или потока сточных вод при помощи ведра или другого подходящего для этой цели сосуда. Комбинированные пробы также можно готовить вручную, собирая меньшие объёмы сточной воды через определённые интервалы времени, чтобы захватить период наибольшего сброса бытовых сточных вод, или объединяя пробы, представляющие небольшие (субоптимальные) группы населения. Пробу (один литр сточной воды) помещают во флакон, плотно закрывают, протирают поверхность флакона раствором дезинфектанта и переносят в холодный транспортный контейнер.

Транспортировка проб

Лица, ответственные за транспортировку проб, должны быть указаны в соответствующих документах по фамилии. Посылку с пробами до отправки сохраняют при 4°C. Во время транспортировки в пересылочном контейнере должна поддерживаться такая же температура. Контейнер снабжается ярлыком (наклейкой) с указанием названия и адреса лаборатории, куда направляют пробы.

В. Концентрация проб сточных вод методом двухфазного разделения

Реактивы для 4 проб по 0,5 л:

1. 22% декстран (по весу)
 - 40 г декстрана Т40 Amersham-Pharmacia (продукция других производителей может быть также вполне пригодной, но не была аттестована);
 - 142 мл стерильной дистиллированной воды.

Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 недели при 4° С.

2. 29% ПЭГ 6000 (по весу)
 - 363 г ПЭГ 6000 Fluka А6 (продукция других производителей может быть также вполне пригодной, но не была аттестована);
 - 888 мл стерильной дистиллированной воды.

Для растворения используют магнитную мешалку. Готовый раствор можно хранить 2 недели при 4° С. Раствор можно автоклавировать (15 мин при 45° С).

3. 150 мл (примерно) 5M NaCl.
4. 1N NaOH и 1N HCl для установки pH.
5. Бумажные индикаторы для измерения pH (с интервалом в 0,5 единицы или меньшим интервалом).

Концентрирование пробы объёмом 0,5 л

1. Жидкость пробы центрифугируют (если необходимо, пробу делят на несколько порций) в течение 10 мин при 1000 g*. Надосадочную жидкость переносят из пробирок в колбу Эрленмейера ёмкостью 1 л. Осадок хранят при 4°С.

2. Доводят pH надосадочной жидкости до нейтрального уровня (pH 7 - 7,5). Обычно для этого требуется несколько миллилитров 1N раствора NaOH. Измеряют конечный объём надосадочной жидкости.

3. К 500 мл надосадочной жидкости добавляют 39,5 мл 22% раствора декстрана, 287 мл 29% раствора ПЭГ 6000 и 35 мл 5N раствора NaCl. Тщательно перемешивают и выдерживают 1 час при 4°С при непрерывном встряхивании или

* g - относительная сила центрифугирования; для перевода в число оборотов в минуту используют формулу $g = (11,7 \times 10^{-7})RN^2$, где R - радиус (мм) от оси центрифуги до крайней точки доньшка пробирки, а N - скорость центрифуги в оборотах в минуту.

перемешивании, используя прибор горизонтального встряхивания или магнитную мешалку.

4. Для каждой пробы подготавливают стерильную коническую делительную воронку и закрепляют её в штативе. Смазывают скользящие поверхности кранов, но так, чтобы не закрыть в них отверстия. Проверяют плотность кранов небольшим количеством стерильной воды. Смесь, приготовленную, как указано в пункте 3, переливают в воронку и оставляют на ночь при 4°C.

5. Осторожно открывают кран воронки, медленно выпускают жидкость и собирают нижний её слой и промежуточную фазу в стерильную пробирку (обычно 5-10 мл от каждой пробы объемом 0,5 л).

6. Ресуспендируют осадок (см. п.1) в этой жидкости (см. п.5). Добавляют хлороформ (20 % от объёма жидкости) и проводят экстрагирование при тщательном встряхивании в течение 1 мин. Центрифугируют так же, как и фекальные пробы, отбирают верхнюю водную фазу в стерильную пробирку и добавляют антибиотики (пенициллин G и стрептомицин до конечной концентрации в 100 МЕ/мл и 100 мг/мл соответственно).

7. 1 мл экстрагированного концентрата помещают при -20°C (-70°C, если есть возможность) для возможного дальнейшего исследования. Остаток экстрагированного концентрата вводят в однослойную культуру клеток L20B или RD(A) во флаконах ёмкостью 50 мл (площадь культуры соответствует 25 см²).

С. Оценка степени концентрации

Метод двухфазного разделения позволяет концентрировать пробу сточной воды в 50-100 раз, однако более точно его возможности должны быть определены проверочными экспериментами в каждой лаборатории, которая планирует его использование. Для этого известное количество вакцинного полиовируса типа 1 (штамм Сэбина) смешивают с отобранной пробой сточной воды, эту смесь концентрируют и устанавливают содержание полиовируса в жидкости пробы после концентрирования.

1. Готовят стандартную серию 10-кратных последовательных разведений материала, содержащего полиовирус типа 1 (штамм Сэбина) в известном титре. Рассчитывают разведение и объём жидкости с содержанием 20 ТЦИД₅₀ в 100 мл и в 1 мл. Проводят стандартное титрование микрометодом на панели с лунками для проверки титра полиовируса типа 1 в исходном материале.

2. 1 литр пробы сточной воды делят на две равные части, к одной из которых добавляют 20 ТЦИД₅₀ полиовируса и проводят концентрирование обеих частей пробы, как описано выше.

3. После экстрагирования хлороформом готовят на поддерживающей среде разведения концентрата 1:3 (0,7 мл концентрата и 1,4 мл среды) и 1:10 (0,2 мл концентрата и 1,8 мл среды) и замораживают их при -20°C.

4. Вносят по 0,5 мл обработанного хлороформом содержащего вирус концентрата в 5 флаконов с культурой клеток L20B и в 1 флакон с культурой клеток RD(A). В 2 флакона с культурой клеток L20B и в 1 флакон с культурой клеток RD(A) вносят по 0,5 мл концентрата, не содержащего вирус. После этого следят за развитием в слое клеток цитопатического эффекта и проводят серологическое типирование выявленного вируса.

5. Если полученный объём концентрата составляет 5 мл, то максимальное количество вируса в 0,5 мл жидкости, которую нужно внести во флакон ёмкостью 50 мл, составляет 2 ТЦИД₅₀. Если проверочное титрование показывает, что количество вируса, использованного для аттестации метода, соответствовало рассчитанному, то не менее чем в 2 из 6 флаконов, инокулированных материалом пробы, содержащей вирус, выявится присутствие полиовируса типа 1. Если в испытанной пробе полиовирус не обнаруживается, эксперимент повторяют с жидкостью, содержащей 100 ТЦИД₅₀. Если полиовирус обнаруживают в контрольной части пробы или во всех 6 флаконах, куда вносился концентрат вируссодержащей пробы, возвращаются к исследованию замороженных разведений (3 флакона на каждое разведение).

Другие методы концентрации могут аттестоваться в лаборатории тем же методом.

Приложение 2

Использование мешочков с сорбентом (макропористое стекло) для улавливания вируса - адсорбционный метод

А. Сбор проб

Во время сбора проб необходимо соблюдать определенные предосторожности, чтобы предотвратить перекрестную контаминацию. При работе в системе сточных вод мешочек с сорбентом фиксируют при помощи прочной рыболовной лески так, чтобы он постоянно находился в токе воды. Через 3-7 дней мешочек извлекают, помещают в отдельный пластиковый пакет или в стерильный флакон и транспортируют в лабораторию в охлажденном состоянии. Каждая проба должна быть маркирована (с указанием населенного пункта, места сбора, даты начала взятия пробы и продолжительности взятия). Пробы следует сохранять при 4°C не более 24 часов и переправлять в лабораторию также охлажденными.

В. Обработка проб

Мешочек с сорбентом помещают в стерильную чашку Петри. Верхушку мешка отрезают, сорбент (стекло) промывают при помощи стерильной пипетки стерильной дистиллированной водой (примерно 5 мл) в той же чашке Петри. Стекло помещают в колонку объемом 5-10 мл. Вирусы элюируют последовательно тремя порциями стерильных растворов по 3 мл каждого).

1. 0,05 М Трис - HCl pH 9,1.
2. 0,05 М Трис - HCl pH 9,1 с 0,5 М NaCl.
3. 3 % говяжий экстракт в 0,05 М Трис - HCl pH 9,1.

Каждую из 3 фракций (элюатов) собирают и исследуют. Все фракции обрабатывают хлороформом. С этой целью добавляют 2 объема хлороформа на один объем элюата, тщательно встряхивают 10 мин и центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин, чтобы разделить фазы. Водную фазу (верхнюю) переносят пипеткой в стерильный флакон, добавляют пенициллин и стрептомицин до конечной концентрации 100 МЕ/мл и 100 мг/мл соответственно.

С. Подготовка макропористого стекла

Для повышения сорбционной способности макропористого стекла его обрабатывают следующим образом:

- готовят смесь из 1 части H_2O_2 и 1 части 6 М HCl;
- добавляют 1 объем стекла к 1 объему этой смеси и кипятят в открытом сосуде в вытяжном шкафу в течение 1 часа;
- промывают стекло дистиллированной водой до нейтрального pH и высушивают при 100°C;
- помещают по 3 см³ обработанного стекла в мешочки (5 см x 7 см) из водонепроницаемого материала.

Д. Предварительная обработка стеклянных колонок

Для предотвращения нежелательной адсорбции вирусов на стенках колонки смачивают их внутреннюю поверхность раствором силикона (Sigmacote, SL-2), сливают эту жидкость и выдерживают колонки 1 час при 100° С. Слитую силиконовую жидкость можно использовать повторно.

Приложение 3

Теоретические соображения о чувствительности надзора за окружающей средой

Если применяют метод одномоментного сбора проб сточных вод, то теоретический максимум его чувствительности может быть рассчитан, используя некоторые допущения.

1. Все члены данной людской популяции связаны с объединённой канализационной сетью, и все полиовирусы, выбрасываемые с их фекалиями, попадают в эту сеть.

2. Попавший в сточные воды полиовирус в течение определенного времени способен обнаруживаться культурой клеток.

3. Среднее количество полиовируса, экскретируемого одним человеком в течение суток, составляет 10^7 инфекционных единиц.

4. Суточное количество стоков, выбрасываемых в систему сточных вод одним человеком, очень вариабельно, однако можно допустить, что оно составляет 100 литров.

5. Национальная полиовирусная лаборатория обнаруживает дикий полиовирус, если в исследуемых 2 мл фракции данной пробы содержится не менее двух инфекционных единиц полиовируса (1 ТЦИД₅₀ в 1 мл).

6. Возможное наличие вакциноподобных вирусов не обуславливает интерференции в системе выявления дикого полиовируса.

Если вышеперечисленные допущения принимаются, то суточный выброс вируса от одного человека (10^7 инфекционных единиц) может распределиться в 10^7 мл (10000 л), что соответствует суточному выбросу сточной воды от 100 человек, и система выявления вируса всё ещё сможет обнаруживать этот вирус без концентрации проб, допуская, что вирус равномерно распределяется в сточной воде, проба которой исследуется.

Если исследуемая проба концентрируется в 100 раз, то система обнаружения вируса может выявить одного инфицированного человека среди 10000 неинфицированных людей.

Таким образом, если исследуемое через сточные воды население составляет 100000 или более, то очевидно, что взятая проба сточных вод лишь случайно может оказаться содержащей полиовирус в тех случаях, когда один человек или немногие люди его выделают. Следует принять во внимание, что все вышеперечисленные допущения делаются при условии самого тщательного выполнения всех этапов исследования. Однако в реальной жизни такого не бывает. На практике это означает, что обнаружить завоз дикого полиовируса отдельным человеком при помощи обследования сточных вод весьма маловероятно. Повторное обнаружение дикого полиовируса в пробах сточных вод, которые собирают в одном из намеченных мест, почти гарантирует, что выявлена циркуляция вируса среди населения.

Приложение 4

Меры, которые следует принять в случае обнаружения в окружающей среде дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения

При обнаружении в окружающей среде дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения необходимо провести специальные исследования, чтобы оценить значение этих находок. Характер программы исследований и объём определяются рядом факторов, включающих следующее:

- статус страны: свободна от полиомиелита, недавно эндемична или эндемична в настоящее время;
- охват населения прививками против полиомиелита;
- качество проведения эпидемиологического надзора за ОВП;
- надёжность результатов лабораторных исследований и состояние выявления дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения в окружающей среде.

В странах, свободных от полиомиелита, дикие полиовирусы или полиовирусы вакцинного происхождения, выявленные программами надзора за ОВП или за окружающей средой, являются чрезвычайным событием, требующим немедленных исследований, чтобы определить, какова распространённость инфекции, и выработать план соответствующих иммунизационных мероприятий. В странах или районах, эндемичных или недавно бывших эндемичными по полиомиелиту, выделение из окружающей среды дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения может послужить основанием для проведения и усовершенствования эпидемиологического надзора и иммунизации, особенно при отсутствии паралитических случаев, выявленных обычным надзором за ОВП.

А. Исследования для выявления начавшейся вспышки

Исследования должны проводиться одновременно в нескольких направлениях, чтобы оценить значение дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения, выявленного при осуществлении надзора за окружающей средой. Для подтверждения начала и развития вспышки необходимо осуществить описанную ниже программу.

1. Сбор и передача информации

- В течение 24 часов после получения сведений о подозреваемой вспышке полиомиелита извещают все учреждения страны, составляющие и направляющие эпидемиологические отчёты. Быстрая связь в условиях возможной вспышки полиомиелита является ключевым моментом в организации необходимых действий и предупреждении распространения вспышки.
- Обращают внимание на необходимость усиления активного надзора за случаями ОВП и строгую ответственность за полноту и своевременность отчётных документов.

- В течение 48 часов информируют ВОЗ и ЮНИСЕФ, что начато изучение предполагаемой вспышки.

2. Усиление надзора за окружающей средой

- Проверяют сведения о населении, которое исследуется при помощи проб сточных вод, и решают, есть ли возможность повысить чувствительность обследования и увеличить вероятность выделения полиовируса, увеличивая частоту сбора проб и количество точек сбора. Заключение о имеющемся месте распространения дикого полиовируса может быть сделано на основании неоднократного его обнаружения в более часто собираемых пробах сточных вод (например, при еженедельном сборе).
- Исследуют пробы сточных вод, полученные в дополнительных местах их сбора для наблюдения за дополнительными группами населения.

3. Поиск лиц, инфицированных полиовирусом

- Проверяют текущие данные эпиднадзора, чтобы выяснить, не могли пройти незамеченным случаи (случаи) полиомиелита. Проверку ведут за предшествующие 12 месяцев, обращая особое внимание на индикаторы качества эпиднадзора (пропорция выявления неполиовирусных ОВП, своевременность и правильность сбора проб фекалий от случаев ОВП, пропорция случаев, пробы от которых исследованы в аккредитованной ВОЗ лаборатории, наличие результатов лабораторных исследований).
- Проверяют старые записи в медицинских учреждениях в районе подозреваемой вспышки и в соседних районах, чтобы установить, не было ли там случаев полиомиелита, о которых не направлялись сведения, и не было ли недостаточно обследованных случаев.
- Начинают активный поиск случаев полиомиелита в группах населения, где подозревают наличие таких случаев.
- Оценивают значение обследования фекальных проб, принимая во внимание соображения, относящиеся к планированию времени, представительности схемы сбора проб, организации материального обеспечения этого сбора и хранения проб, а также гарантии соответствующей лабораторной поддержки.

4. Оценка охвата иммунизацией против полиомиелита

- Проверяют охват прививками в ходе текущей и дополнительной иммунизации и оценивают вероятность поддержки циркуляции полиовируса восприимчивой к полиовирусной инфекции частью населения.
- Начинают предварительное планирование противоэпидемической иммунизации и рассматривают охват населения прививками, обращая особое внимание на материальное обеспечение, организационные и финансовые потребности.

5. Усиление вирусологических исследований

- Принимают меры для ускорения характеристики генома выделенного дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения, чтобы содействовать исследованию их возможного источника и вероятных путей их передачи.
- Запрашивают о возможности направления в аккредитованную ВОЗ лабораторию для дальнейших исследований всех негативных фекальных проб от случаев ОВП и ещё не типированных или нетипируемых штаммов вируса, выделенных из проб фекалий или из материалов окружающей среды.
- Особо помечают все штаммы полиовируса, пробы из окружающей среды и пробы фекалий из района подозреваемой вспышки для первоочередного исследования в лаборатории, аккредитованной ВОЗ.

В. Мероприятия при подтверждении вспышки дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения

Так рано, как только возможно, но не позднее одного месяца после выделения полиовируса принимают решение о том, подтверждена ли предполагаемая вспышка полиомиелита или достаточно обоснованно подозревается, чтобы планировать проведение иммунизации. Вспышка может считаться подтверждённой, если выявлено хотя бы одно из следующих подтверждающих её условий:

- дикий полиовирус или полиовирус вакцинного происхождения многократно обнаружен в пробах из окружающей среды (например, в течение нескольких недель или в нескольких местах);
- выделено значительное число генетически отличимых штаммов дикого полиовируса или полиовируса вакцинного происхождения;
- при проведении исследований после обнаружения дикого полиовируса в окружающей среде выявлены случаи паралитического полиомиелита, случаи, совпадающие с диагнозом полиомиелита, или обнаружены лица, инфицированные диким полиовирусом или полиовирусом вакцинного происхождения.

Если вспышка подтверждена, страна должна в течение 24 часов сообщить об этом в ВОЗ и ЮНИСЕФ, а существующие службы иммунизации или специальная руководящая группа экспертов в министерстве здравоохранения принимают на себя координационно-инструктивную роль в проведении необходимых мероприятий в масштабе страны. Эти мероприятия должны соответствовать характеру выявленной вспышки и включать следующее:

- все подразделения, осуществляющие эпидемиологический надзор, и ведущие больницы страны информируются о выявлении вспышки и получают дополнительную информацию и материалы, помогающие в выявлении и идентификации новых случаев;
- усиливается работа национальной системы эпидемиологического надзора, чтобы проверить не наблюдаются ли случаи полиомиелита в других районах страны;

- на национальном уровне устанавливается систематический контроль за отчётами служб эпидемиологического надзора;
- проводятся иммунизационные мероприятия, соответствующие по размерам и характеру имеющимся сведениям, полученным при изучении вспышки.