

Инструкция предназначена для специалистов научно-исследовательских институтов, научно-практических центров, центров гигиены и эпидемиологии и общественного здоровья и других учреждений, занимающихся лабораторным контролем и эпидемиологическим надзором за циркуляцией сезонных вирусов гриппа и вирусов с пандемическими свойствами.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению:

- обследование лиц из групп высокого риска инфицирования вирусом гриппа, а также больных с тяжелыми формами респираторных инфекций и контактных лиц (по эпидпоказаниям),
- изучение иммуногенности гриппозных вакцин.

Противопоказания:

- – отсутствие условий для работы с возбудителями третьей группы патогенности

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) составляют значительный процент в инфекционной патологии человека. Возбудителями ОРВИ являются хорошо изученные представители вирусов респираторной группы (вирусы гриппа, парагриппа, аденовирусы, респираторно-синцитиальный). Вирусы респираторной группы активно циркулируют, главным образом, в осеннее-весенний период. и вызывают у человека трудно различимые по клинической картине заболевания. Кроме того, заболевания, вызываемые вирусами этой группы, мало отличаются по длительности инкубационного периода. Наиболее значимым среди респираторных вирусов являются вирусы гриппа, эпидемическое распространение

которых наносит существенный урон не только здоровью человека, но и народному хозяйству.

В целях принятия своевременных и адекватных мер для лечения и проведения профилактических мероприятий важно выявить этиологический агент, вызвавший спорадическое респираторное заболевание или вспышку. Поэтому особое значение придается методам лабораторной диагностики, позволяющим в короткие сроки и с высокой специфичностью выявить вирусы гриппа. Обычно для выявления вирусов гриппа в клинических образцах широко используется метод флуоресцирующих антител. Данный метод позволяет быстро провести индикацию вирусного антигена в материале от больного, но в силу недостаточно высокой чувствительности может использоваться лишь для скрининговых оценочных исследований в целях рутинного эпиднадзора. В качестве диагностического метода для быстрого выявления вирусного антигена в клинических образцах ВОЗ рекомендует использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР), отличающуюся высокой специфичностью и позволяющую относительно быстро получить ответ. Однако этот метод требует специального оборудования, дорогостоящих реактивов, специалистов высокой квалификации. Метод может быть использован как для рутинного эпиднадзора за ОРВИ, так и для дозорного надзора. Диагностическими методами, рекомендованными ВОЗ, на основании которых может быть дано лабораторное заключение, являются также выделение вируса гриппа в культуре клеток/развивающихся куриных эмбрионах и серологические методы - реакция торможения гемагглютинации (РТГА) и реакция нейтрализации (РН). Серологические методы редко используются для диагностики острой гриппозной инфекции, однако демонстрация выраженного возрастания титра антител (более/равное 4-х кратному) в период между острой фазой и выздоровлением, может позволить определить недавно перенесенную ин-

фекцию даже в случае отрицательного результата при попытке выделения вируса. Не считая диагностической ценности, серологические методы, такие как РТГА, РН вируса, являются фундаментальными в эпидемиологических, иммунологических исследованиях и при изучении иммуногенности вакцин. Однако эти методы требуют более длительного времени для получения окончательного ответа по сравнению с ПЦР.

Настоящая инструкция преследует цель стандартизации исследований по диагностике гриппа и ОРВИ и интерпретации полученных результатов, а также демонстрирует возможность получения более быстрого представления о циркуляции вирусов гриппа и других респираторных вирусов при комплексном использовании диагностических методов.

1 Используемые определения

Гриппоподобное заболевание (ГПЗ) – внезапное появление температуры $> 38^{\circ}\text{C}$ и кашель или боли в горле при отсутствии других диагнозов.

Острая респираторная инфекция (ОРИ) – внезапное появление одного из следующих четырех симптомов: кашель, боли в горле, одышка, острый насморк.

Тяжелая острая респираторная инфекция (ТОРИ) – заболевание, начавшееся в течение предыдущих 7 дней, требующее госпитализации и выражающееся следующими симптомами: температура $> 38^{\circ}\text{C}$, кашель/боли в горле, одышка/затрудненное дыхание.

Подтвержденный случай (сезонный/пандемический грипп). Подтвержденным случаем гриппа считается заболевание, при котором симптомы ГПЗ/ОРИ подтверждаются положительным лабораторным исследованием на грипп (сезонный/пандемический) одним из следующих методов :

- *ПЦР в режиме реального времени;*
- *выделение вируса в культуре клеток;*
- *серологический (парные сыворотки).*

Вероятный случай (только для пандемических вирусов). У человека имеет место ГПЗ, при этом результат ОТ-ПЦР положительный на грипп типа А, но отрицательный на сезонные подтипы Н1 или Н3.

Подозрительный случай (только для пандемических вирусов):

- У человека имеет место ГПЗ, и этот человек тесно контактировал с лицом с подтвержденной инфекцией, вызванной вирусом гриппа с пандемическим потенциалом, в то время, когда это лицо находилось в состоянии болезни, **ИЛИ**

- У человека имеет место ГПЗ, и известно, что этот человек недавно контактировал с животным с подтвержденной или подозреваемой инфекцией, вызванной вирусом с пандемическим потенциалом, **ИЛИ**

- У человека имеет место ГПЗ, и этот человек совершил поездку в район, где имеют место подтвержденные случаи заболевания, вызванного вирусом гриппа с пандемическим потенциалом.

Биологическая безопасность - система медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего персонала, населения и окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов

Существует четыре уровня биобезопасности (BSL-1, BSL-2, BSL-3, BSL-4), которые представляют собой комбинации указаний по проведению работ в лаборатории и соответствующих методов, оборудования, обеспечивающих безопасную работу, и конструктивных особенностей лабораторных помещений. Работу с вирусами гриппа (в зависимости от эпидемической ситуации) проводят в условиях BSL-2, BSL-3).

- **Второй уровень биобезопасности BSL-2 (P-3;)** рекомендуется для лабораторий, которые проводят работу с возбудителями III-IV групп патогенности в специализированных ламинарных шкафах 2-го уровня защиты.

Персонал лабораторий пользуется стандартными средствами индивидуальной защиты (халат, перчатки, маска)

• **Третий уровень биобезопасности BSL3 (P-2)** - в лаборатории проводятся специальные исследования, связанные с накоплением возбудителя II- III группы патогенности. Лаборатория расположена в отдельном блоке с контролируемой системой вентиляции, оснащена специализированными ламинарными шкафами 3-го уровня защиты, защитным оборудованием для всех процедур. Доступ в лабораторию ограничен. Персонал лабораторий пользуется стандартными средствами индивидуальной защиты (халат, перчатки, маска).

2 Сбор, хранение и транспортировка образцов для лабораторной диагностики

Успешное выявление и выделение вирусов из клинических образцов зависит от качества забора материала, сроков доставки материала в лабораторию и соблюдения температурного режима при хранении и транспортировке. Инкубационный период при гриппе составляет обычно 2-3 дня, на протяжении которых больной человек выделяет вирус и представляет определенную опасность для окружающих. Оптимальным сроком забора материала являются первые три дня от момента заболевания. Вместе с тем, больной человек (в зависимости от возраста или наличия сопутствующих хронических заболеваний) может выделять вирус в окружающую среду на протяжении 7-ми дней и более. Эти факторы также оказывают существенное влияние на качество диагностики гриппа. Вирусы гриппа чувствительны к высыханию, неблагоприятному рН среды и изменяющемуся осмотическому потенциалу, что требует неукоснительного соблюде-

ния правил забора и транспортировки клинического образца в лабораторию (Приложение 1).

Для диагностики гриппа используются следующие **образцы**: аспират из носоглотки; мазок из носа; мазок из носоглотки; смыв из носовой полости; парные сыворотки.

По клиническим показаниям могут быть добавлены: трахеальный аспират, бронхоальвеолярный лаваж, биоптат легочной ткани; ткани легкого, трахеи, головного мозга, взятые *post mortem*.

Забор материала для исследования осуществляет подготовленный медицинский персонал в средствах индивидуальной защиты органов дыхания (респиратор), защитных очках или щитках для защиты лица, бахилах, резиновых перчатках. Забор производят стерильными инструментами в стерильные одноразовые флаконы, пробирки, контейнеры.

Среда для транспортировки клинического образца: в 1 литр раствора Хенкса, содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), добавить: гентамицин (250 мг/л), нистатин ($0,5 \times 10^6$ МЕ/л).

Упаковка, маркировка, условия хранения и транспортирование материала для проведения лабораторной диагностики гриппа осуществляются в соответствии с Руководством №-11-7-13-2002 от 30.12.2002 года «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов 1- 4 групп патогенности».

Клинический образец необходимо помещать в среду для транспортировки вирусов сразу же после забора образца и доставлять в лабораторию с соблюдением холодовой цепи (4°C). Если образец не может быть доставлен в лабораторию сразу после забора, то допускается его хранение при 4° в течение 24 часов. В случае невозможности исследования образца в течение 48 часов после доставки в лабораторию, он должен храниться в замороженном состоянии при температуре от -70° С и ниже. Каждый об-

разец перед замораживанием при температуре -70°C для долгосрочного хранения может быть разделен на части для дополнительного тестирования, повторного тестирования или архивации. Необходимо не допускать повторного замораживания/оттаивания при транспортировке во избежание потери инфекционности образца. По этой причине не следует хранить образец в обычной бытовой морозильной камере (-20°C) с циклом замораживания/оттаивания; пробу лучше держать на льду даже в течение целой недели, чем подвергать ее постоянному замораживанию и размораживанию.

Все транспортируемые образцы должны быть упакованы в тройную упаковку. Упаковка должна выдерживать удары и нагрузки, имеющие место при транспортировке. Упаковка должна быть выполнена с учетом предотвращения любой утечки содержимого.

Первичные емкости должны быть защищены от утечки и их объем не должен превышать 500 мл. Между первичной емкостью и вторичной упаковкой должен находиться абсорбирующий материал; если несколько первичных емкостей помещаются во вторичную упаковку, каждая из них должна быть отдельно завернута или отделена таким образом, чтобы исключить контакт между ними. Абсорбирующего материала должно быть достаточно, чтобы полностью впитать все содержимое первичных емкостей, а вторичная упаковка должна быть защищена от протечек. Первичная емкость или вторичная упаковка должны выдерживать внутреннее давление, при разнице давления не менее 95 КПа (0,05 бар). Объем внешней упаковки не должен превышать 4 литра.

Для авиа-транспортировки внешний размер готовой упаковки должен быть не менее 10 см.

Образцы вирусов гриппа не должны храниться или перевозиться в сухом льду (твердом диоксиде углерода), если они не запаяны в стекло

или не запечатаны, не закрыты и не запаяны в двойную пластиковую упаковку. Такая упаковка образца объясняется тем, что углекислый газ при проникновении в пробирки способен быстро инактивировать вирусы гриппа.

Забор клинического образца.

Назофарингеальные мазки. Для забора назофарингеальных мазков используют пластиковые палочки с синтетическим тампоном. Деревянные палочки с хлопковыми тампонами не рекомендуется использовать. Оптимальным сроком забора клинического материала, предназначенного для выявления вируса гриппа, являются первые 3 дня после появления симптомов заболевания (Приложение 1).

Забор производят следующим образом: после удаления слизи из носовых ходов поочередно в обе полости носа больного на глубину 2 см по наружной стенке носа вводят тампон. Затем тампон направляют слегка вниз и вводят его в нижний носовой ход, прижимают наружную стенку носа и вращательным движением тщательно снимают слущенный эпителий (Приложение 2).

Тампоны погружают в пробирку с 2-3 мл транспортной среды. В эту же пробирку можно поместить и тампон, которым брали мазок с задней стенки глотки. Взятый материал в течение 1-4 часов доставляют в лабораторию с соблюдением холодовой цепи (4°C).

Доставленный в лабораторию маркированный материал (в ламинарном боксе 2-го класса защиты) делят:

- для постановки ОТ-ПЦР – 0,5мл,
- для культуральных исследований – 0,5 -0,6 мл,
- для иммунофлуоресцентных исследований 0,5-0,6 мл,

- контрольный образец - 0,5 -0,6 мл.

Контрольный образец хранят при -70°C .

При проведении лабораторных исследований назофарингеальных мазков следует учитывать, что инфицированные клетки респираторного эпителия в клинических образцах очень неустойчивы и легко повреждаются. Поэтому образцы должны храниться на льду по ходу обработки в лаборатории и не должны центрифугироваться более, чем при 500 об/мин.

Парные сыворотки должны быть получены на острой стадии заболевания и не менее 2-3-х недель после получения первой сыворотки. Взятую кровь можно хранить при комнатной температуре в течение ночи. Забор сыворотки следует проводить пипеткой в ламинарном шкафу 1-2 класса защиты. Сыворотку можно хранить при температуре 4°C в течение недели. В случае необходимости длительного хранения расфасованную сыворотку следует хранить при -20°C .

Материалы, взятые post mortem. Фрагменты легких, трахеи (область бифуркации), мозга (область обонятельной луковицы), объемом 1 см^3 , изъятые в день смерти больного, помещают в сухие стерильные флаконы и доставляют в холодовом режиме в лабораторию. После промывки физиологическим раствором из полученных материалов готовят 10% суспензию, для чего в фарфоровой ступке растирают фрагменты тканей со стерильным стеклянным песком, добавляют 10-ти кратное количество раствора Хенкса. Полученную суспензию центрифугируют в течение 10 минут при 1000-2000 об/мин, собирают надосадочную жидкость и используют ее для выделения вируса гриппа (в культуре клеток или в куриных эмбрионах (КЭ)) и/или для выявления РНК вируса гриппа методом ОТ-ПЦР.

3.Общая характеристика методов лабораторной диагностики гриппа

3.1 Методы экспресс-диагностики гриппа

Методы быстрой диагностики направлены на выявление вирусного антигена в материале, полученном от больного с подозрением на грипп.

Методы экспресс-диагностики основаны на иммунологических реакциях (метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический метод (ИХМ)) и молекулярно-биологических реакциях (ПЦР классическая и с детекцией в режиме реального времени).

Метод флуоресцирующих антител

Метод относится к оценочным и может быть использован при проведении мониторинговых исследований, а также для сокращения сроков выявления репродукции вируса в культуре клеток. Результат исследования назофарингеального мазка МФА может быть получен в течение 3 часов после доставки образца в лабораторию.

Постановка.

Для получения осадка клеток цилиндрического эпителия пробирки с тампонами в транспортной среде энергично встряхивают, тампоны отжимают и удаляют. Полученную суспензию клеток центрифугируют в течение 5-7 минут при 500 - 2000 об/мин (в зависимости от вида клинического образца). Надосадочную жидкость удаляют, осадок суспендируют в нескольких каплях оставшейся жидкости и используют для приготовления мазков, которые наносят на тщательно обезжиренные стекла с лунками. Стекла маркируют, наносят в лунки суспензию клеток, высушивают при комнатной температуре под вентилятором. Затем мазки фиксируют охлажденными до 2-4°С химически чистым безводным ацетоном или 96%

спиртом. Полученные препараты окрашивают флуоресцирующими антителами и учитывают результат в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

Мазки от каждого больного окрашивают антителами к вирусам гриппа А(Н1N1), А(Н3N2), В, парагриппа 1,2,3 типов, РС-вирусу, аденовирусам. Максимальный срок хранения окрашенных образцов при температуре 4°С составляет 24 часа.

Необходимое оборудование и материалы: 3-х или 8-луночные предметные стекла, термостат, вентилятор, бидистиллированная вода, спирт 96% или химически чистый безводный ацетон, люминисцентный микроскоп, флуоресцирующие антитела, центрифуга, пипетки.

Иммуноферментный анализ

Метод относится к категории оценочных и используется для ранней дифференциальной диагностики гриппа типа А или В, других возбудителей ОРВИ путем выявления вирусных антигенов в клиническом материале, полученном от больных с симптомами ГПЗ/ОРВИ. Результат может быть получен в течение 7 - 24 часов.

Преимуществом ИФА по сравнению с МФА является более высокая чувствительность, а также возможность одновременного анализа большего числа клинических образцов и объективный количественный учет результатов.

При использовании данного метода клинический материал подвергают двукратному замораживанию-оттаиванию для высвобождения клеточных антигенов. Образцы можно хранить при температуре от -15°С до -25°С в течение 3-4 недель. Проведение анализа и учет результатов выполняются в соответствии с инструкциями производителя тест-систем.

Необходимое оборудование и материалы: планшеты для иммуферментного анализа однократного применения, многоканальный иммуноферментный анализатор, одноканальные микропипетки с переменным объемом на 10-50 мкл и на 50-250 мкл, а также многоканальные микропипетки на 50-300 мкл, термостат, бытовой холодильник, лабораторная центрифуга, пробирки, иммуноферментные тест-системы для выявления антигенов вирусов гриппа типа А или В, адено-, РС-вирусов.

Иммунохроматографический метод

Метод относится к категории оценочных и может быть использован для ранней дифференциальной диагностики гриппа типа А и В, РС-вируса и др. вирусных антигенов в клиническом материале, а также для визуализации репродукции вируса в культуре клеток и КЭ. Результат при анализе клинического образца может быть получен в течение 20 минут после забора материала («у постели больного») и исключает необходимость доставки образца в лабораторию, наличия сложного оборудования и обученных специалистов.

Проведение анализа и учет результатов выполняются в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к используемым тест-системам.

Необходимое оборудование: диагностические тест-системы.

Реакция полимеразной цепной реакции

Метод характеризуется высокой чувствительностью и предназначен для выявления и субтипирования генетического материала вирусов гриппа и других возбудителей ОРВИ в клиническом материале, а также в качестве критерия для отбора образцов при выделении вирусов. Результат может быть получен в течение 24-48 часов. Метод является подтверждающим лабораторным тестом. Наибольшей чувствительностью и меньшей веро-

ятностью контаминации обладает метод постановки ПЦР в режиме реального времени. Выявление РНК вирусов гриппа позволяет назначать специфическую противовирусную терапию и организовать соответствующие профилактические мероприятия. Однако отрицательный результат не всегда объясняется отсутствием вируса в клиническом образце и может быть обусловлен недостаточным содержанием вируса в пробе. В сомнительных случаях (отрицательный результат ПЦР при наличии выраженных клинических симптомов гриппа) возможно инфицирование клиническим образцом культуры клеток/КЭ и повторная постановка ПЦР с полученным лабораторным материалом (культуральная жидкость инфицированных культур клеток или аллантоисная жидкостью инфицированных КЭ). Постановка и учет результатов реакции производится в соответствии с инструкцией производителя диагностической тест-системы.

Лаборатории, выявившие в клиническом материале РНК нетипируемого вируса гриппа А, должны передать образцы в НЦГ (Государственное учреждение «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», тел. 237 62 95, gribkova@belriem.by) для дальнейшей идентификации и характеристики вируса.

Необходимое оборудование и материалы: диагностические тест-системы, одноканальные микропипетки с переменным объемом на 0,5 -10, 10-200 мкл и на 100-500 мкл, наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз; штативы для наконечников и микропробирок; бытовой холодильник, термостат для микропробирок; ламинарный бокс 2-го класса защиты, вортекс, микроцентрифуга, микропробирки с плотнозакрывающейся крышкой 1,5 мл; ПЦР-пробирки 0,2мл; амплификатор; ПЦР-бокс; халаты и обувь для каждой зоны, латексные перчатки без талька.

3.2 Серологические исследования

проводятся при наличии парных сывороток. Используются РТГА и реакция микронеитрализации (РН). Оба метода относятся к подтверждающим лабораторным методам.

РТГА проводится с использованием набора реактивов для постановки РТГА. Четырехкратный прирост титров антител в сыворотках, относящихся к периоду острого заболевания и периоду выздоровления, является диагностическим критерием. Эти исследования особенно важны для ретроспективной расшифровки вспышек на национальном уровне, в закрытых коллективах. При изучении иммунного статуса населения защитным титром считается титр антител в РТГА 1:40 и выше. РТГА также может быть использована для типирования выделенных вирусов гриппа и оценки поствакцинального иммунитета.

Сыворотка может содержать специфические и неспецифические ингибиторы гемагглютинации и во избежание ложноположительных результатов сыворотки перед исследованием необходимо обработать рецептор-разрушающим ферментом (чаще используется нейраминидаза нехолерного вибриона) в соотношении 1 объем сыворотки: 3 объема РРФ. Смесь инкубируют 12-18 часов при 37°C. После инкубации сыворотки прогревают на водяной бане при 56°C в течение 30 минут для разрушения фермента и термолабильных ингибиторов гемагглютинации (ГА). К прогретой сыворотке добавляют 6 объемов физиологического раствора, таким образом, получают исходное разведение сыворотки 1:10.

Рабочей дозой антигена, используемого для реакции, является титр вируса в РГА 1:8.

За титр сыворотки принимается последнее разведение сыворотки, при котором полностью ингибируется гемагглютинация.

Необходимое оборудование: набор реактивов для постановки РТГА, планшеты для серологических исследований, одно- и многоканальные

автоматические микропипетки с переменным объемом до 50 мкл, накопники, физиологический раствор, суспензия эритроцитов человека I(0) группы крови или кур.

Реакция микронеutralизации (PMH). В связи с использованием живого вируса при постановке реакции необходимо соблюдать условия биобезопасности. Постановка реакции может осуществляться только в лабораториях, соответствующих уровню BSL-3 в случае работы с пандемическим вирусом, и BSL-2 - при работе с сезонными вирусами гриппа.

Постановка PMH. PMH является высокочувствительным и специфическим тестом, используемым для идентификации вирус-специфических антител. Постановка реакции осуществляется в две стадии. На первой стадии осуществляется взаимодействие вируса с соответствующими антителами. На второй стадии реакции смесь вируса с антителами вводится в соответствующую систему (клеточные культуры). Отсутствие инфекционности оценивается как положительная реакция нейтрализации и свидетельствует о наличии вирус-специфических антител в сыворотке. Вирус-нейтрализующий тест дает наиболее точный ответ на вопрос: могут ли антитела нейтрализовать данный штамм вируса. Традиционная РН для гриппа, основанная на ингибировании цитопатического действия вируса, репродуцирующегося в культуре МДСК, трудоемка и требует времени для получения ответа, однако в сочетании с принципами экспресс-диагностики результат можно получить в течение 2-х дней.

Заболевание гриппом считается лабораторно установленным в следующих случаях:

- 4-х кратный и более прирост титра антител к вирусу гриппа во второй сыворотке (титр не ниже 1:80), взятой на стадии реконвалесценции, по отношению к первой, взятой в острой стадии заболевания;

- титр антител 1:80 и выше при исследовании одиночной сыворотки, взятой не ранее 14 суток от начала заболевания

Необходимое оборудование: культура клеток МДСК, CO₂-инкубатор, стерильные культуральные планшеты, одно- и многоканальные автоматические микропипетки с переменным объемом до 300 мкл, наконечники.

3.3 Методы выделения вирусов гриппа

Первичная обработка клинического образца

Перед инфицированием культуры клеток или куриных эмбрионов (КЭ) клинический образец необходимо обработать ультразвуком (30 сек. при 12 КГц) или дважды провести процедуру замораживания/оттаивания с целью обогащения образца внутриклеточным антигеном. После энергичного встряхивания флакона с образцом необходимо отжать тампон о стенки флакона и удалить тампон.

Выделение вируса гриппа в культуре клеток

Метод позволяет выделить вирус, провести его субтипирование, изучение антигенных, фенотипических и генетических свойств, а также определить его чувствительность к лекарственным препаратам. При классической постановке, требующей проведения 3-х последовательных пассажей клинического образца в случае отсутствия признаков репродукции вируса на первом пассаже, результат может быть получен через 21 день. Учет репродукции вируса проводится в реакции гемагглютинации, а субтип вируса устанавливается в РТГА. При выявлении репродукции вируса с помощью ИХМ, МФА или ОТ-ПЦР методов время получения результата может быть сокращено до 48 часов.

Для выделения вирусов гриппа, чаще используют культуру клеток МДСК. При использовании культуры клеток для выделения вирусов

гриппа необходимо использовать культуру клеток не старше 30-го пассажа. Клинические образцы для выделения вирусов необходимо охлаждать сразу после взятия и незамедлительно инокулировать в клеточные культуры, поскольку при хранении материала инфекционная активность вирусов падает. При отсутствии монослойной культуры на момент поступления клинических образцов, последние могут храниться в лаборатории до заражения при +4°C не более 2 дней. Для более длительного хранения они должны быть заморожены при температуре не выше -70°C. Для сохранения инфекционности вируса следует избегать повторного замораживания/оттаивания образца.

Порядок инфицирования культуры клеток

Необходимое количество сред и растворов готовят непосредственно перед употреблением в зависимости от количества исследуемых образцов. Все растворы перед использованием должны быть подогреты до температуры 35-37°C.

Для выделения вируса необходимо оценить состояние монослоя, который должен быть сливным. В каждом эксперименте предусматривают два контрольных флакона: со сменой и без смены среды.

ВНИМАНИЕ! Уровень биологической безопасности при работе с сезонным и пандемическим вирусами приведены в главе «Условия биобезопасности»

Из всех флаконов с монослоем, кроме контроля без смены среды, аккуратно отсасывают среду роста, и дважды отмывают (по 2 мл) теплым раствором среды ДМЕМ (без сыворотки!). Во флаконы вносят по 0,2 мл образца (на одну пробу используют два флакона). В контрольный флакон со сменой среды добавляют 0,2 мл среды ДМЕМ.

Адсорбцию вируса на монослое проводят в течение 1 часа при 37°C.

Затем во флаконы добавляют по 1 мл теплой ДМЕМ (без сыворотки), содержащей ТРСК-трипсин в конечной концентрации 2 мкг/мл.

Флаконы инкубируют при 37°C, желательнее в термостате с подачей 5% CO₂, вплоть до 7 суток, ежедневно контролируя состояние монослоя на наличие вирусоспецифического цитопатического действия (ЦПД).

Через каждые 2-3 дня, начиная с 48 часов после заражения, размножение вируса контролируют также в реакции гемагглютинации. С этой целью из каждого флакона отбирают по 50 мкл культуральной жидкости и в реакции гемагглютинации определяют титр гемагглютинирующей активности. Реакция ставится микрометодом с 0,75% взвесью эритроцитов человека I(0) группы крови или с 1% взвесью эритроцитов кур.

При появлении выраженного ЦПД и/или гемагглютинирующей активности, культуральную среду собирают и используют для последующего типирования вируса в РТГА в присутствии специфических диагностических сывороток. РТГА ставится аналогично описанному выше титрованию сывороток, используя стандартизованные разведения изолятов вирусов. При учете результатов проводят сравнение титра изолята вируса с титрами контрольных референс-антигенов.

При отрицательном результате клетки разрушают двукратным замораживанием/оттаиванием, объединяют клеточный лизат от одного больного и производят следующий пассаж, контролируя репродукцию вируса по ЦПД и ГА. Если после трех пассажей ЦПД и ГА не определяются, то проба считается отрицательной.

В целях сокращения сроков исследования можно использовать сочетание методов выделения вируса гриппа на культуре клеток и визуализации репродукции вируса методом ПЦР, МФА или ИХМ. Такой подход позволяет сократить сроки выявления вируса до 48 часов и провести предварительное типирование/субтипирование изолята.

Необходимые материалы и оборудование

1. Культура клеток МДСК линии ССL 34;
2. Среда для выделения вируса: ДМЕМ, содержащая Трипсин – ТРСК (тип Х111 из поджелудочной железы быка) в конечной концентрации 2 мкг/мл;
3. Холодильник бытовой (4 ± 1)°С, рефрижератор ($- 70\pm 1$)°С, центрифуга лабораторная, термостат (37 ± 1)°С, микроскоп биологический МБИ-3 или инвертированный, пенициллиновые флаконы, флаконы культуральные 25см², пробки резиновые № 14- 14,5, стерильные пипетки на 1, 5 и 10 мл.
4. Для постановки реакции ГА и РТГА требуются: планшеты для иммунологических реакций; одноканальные и многоканальные микропипетки с переменным объемом на 2-200 мкл; взвесь эритроцитов человека I(0) группы крови 0,75% или 1% взвесь куриных эритроцитов; физиологический раствор; сыворотка диагностическая гриппозная.
5. Реактивы и оборудование для постановки ПЦР описаны в соответствующем разделе.

Выделение вируса гриппа на развивающихся куриных эмбрионах

Для выделения вирусов гриппа исследуемые материалы после их первичной обработки вводят по 0,2 мл в аллантоисную полость 10-дневных КЭ. *Не использовать КЭ бройлерных кур!*

Материалом от одного больного заражают 4 эмбриона. Зараженные эмбрионы инкубируют в термостате при 33°С для выделения вирусов гриппа типа В, и при -36°С для выделения вирусов гриппа типа А. После инкубации эмбрионы тщательно охлаждают в холодильнике при 4°С.

Индикацию вируса гриппа осуществляют микрометодом в реакции ГА путем добавления 50 мкл 1% суспензии эритроцитов кур или 0,75% суспензии эритроцитов I(0) группы крови человека к 50 мкл последова-

тельных двукратных разведений вирусосодержащей аллантоисной жидкости на физиологическом растворе. Реакцию ГА в зависимости от используемых эритроцитов учитывают после 30-60 -минутного оседания эритроцитов в лунках панелей при комнатной температуре.

При отсутствии агглютинации эритроцитов необходимо провести 2 дополнительных пассажа путем заражения эмбрионов аллантоисной жидкостью от предыдущего пассажа. В случае отрицательных результатов ГА после 3-х пассажей исследование материала прекращают и образец считают отрицательным.

С целью сокращения сроков исследования для визуализации инфекции и типирования/субтипирования также может быть использован метод ПЦР, ИХМ.

Таким образом, комплексное использование методов выделения вирусов гриппа в культуре клеток/КЭ и метода ПЦР позволяет не только сократить сроки выявления вируса, но и провести одновременно типирование/субтипирование вируса.

4. Условия биобезопасности

Выполняемые в лаборатории процедуры, которые могут привести к образованию инфекционных аэрозолей, должны проводиться в микробиологическом ламинарном шкафу 2-го класса. Для манипуляций с сезонным вирусом гриппа всегда следует надевать одноразовые перчатки и халат. Если образцы подозреваются на содержание пандемического вируса или иных патогенов, вызывающих тяжелые острые респираторные инфекции (ТОРИ), *их фасовка и обработка должны проводиться только* в лабораториях с уровнем безопасности BSL-2.

Лаборатории, соответствующие уровню биобезопасности BSL-2 (P-2, 2 уровень), могут выполнять *выделение* вирусов гриппа **только** из клини-

ческих образцов, в которых присутствие *сезонных* вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) или В было подтверждено ОТ-ПЦР. Клинические образцы, отрицательные на вирусы гриппа А и В в ОТ-ПЦР, могут тестироваться на наличие других респираторных вирусов методами МФА, ИФА, ИХМ, ПЦР.

Только лаборатории, соответствующие уровню биобезопасности BSL-3, могут проводить выделение вирусов из образцов, в которых методом ОТ-ПЦР выявлен нетипируемый/пандемический вирус гриппа типа А.

5.Алгоритм исследования клинических образцов

В соответствии с приведенными принципами биобезопасности и имеющимся техническим оснащением, клинические образцы, взятые у пациентов с симптомами ГПЗ/ОРИ и ТОРИ, должны тестироваться на наличие сезонного гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) или В методом ОТ-ПЦР в базовых лабораториях НЦГ и зональных лабораториях системы эпиднадзора (приложение 3). Типирование и субтипирование вирусов гриппа методом ОТ-ПЦР может быть осуществлено за один или два последовательных этапа.

Базовые лаборатории НЦГ и зональные лаборатории проводят выделение сезонных вирусов гриппа из всех образцов, в которых методом ОТ-ПЦР выявлена РНК сезонного вируса гриппа. **Пытаться выделить вирусы с пандемическими свойствами и нетипируемый вирус можно только в лаборатории с уровнем биобезопасности BSL-3.**

Для подтверждения выделения и типирования изоляты сезонных вирусов гриппа, полученные базовыми лабораториями НЦГ, направляются в НЦГ (ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии», г.Минск, ул. Филимонова 23, тел 237 62 95) (Приложение 3).

При получении положительных результатов подтверждающего тестирования НЦГ проводит выделение вируса, изучение его свойств и депонирование в Специализированную Коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека. Кроме того, вирус направляется в диагностические центры ВОЗ. Транспортировка вирусов в Сотрудничающие центры ВОЗ осуществляется НЦГ в строгом соответствии с Международными медико-санитарными правилами.

Развивающиеся куриные эмбрионы, наряду с культурой клеток МДСК, являются традиционным «золотым стандартом» для выделения вирусов и должны предусматриваться при выделении вируса из клинических образцов для обеспечения определения антигена и потенциального производства вакцины.

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

К наиболее типичным техническим ошибкам при лабораторной диагностике гриппа, приводящим к получению недостоверных результатов, следует отнести нарушение правил и сроков забора материала, условий хранения и транспортировки, использование в качестве транспортных сред, не рекомендованных инструкцией сред, нарушение инструкций производителей диагностических препаратов.

Образцы, давшие сомнительный результат подвергаются повторному тестированию с соблюдением всех правил работы.

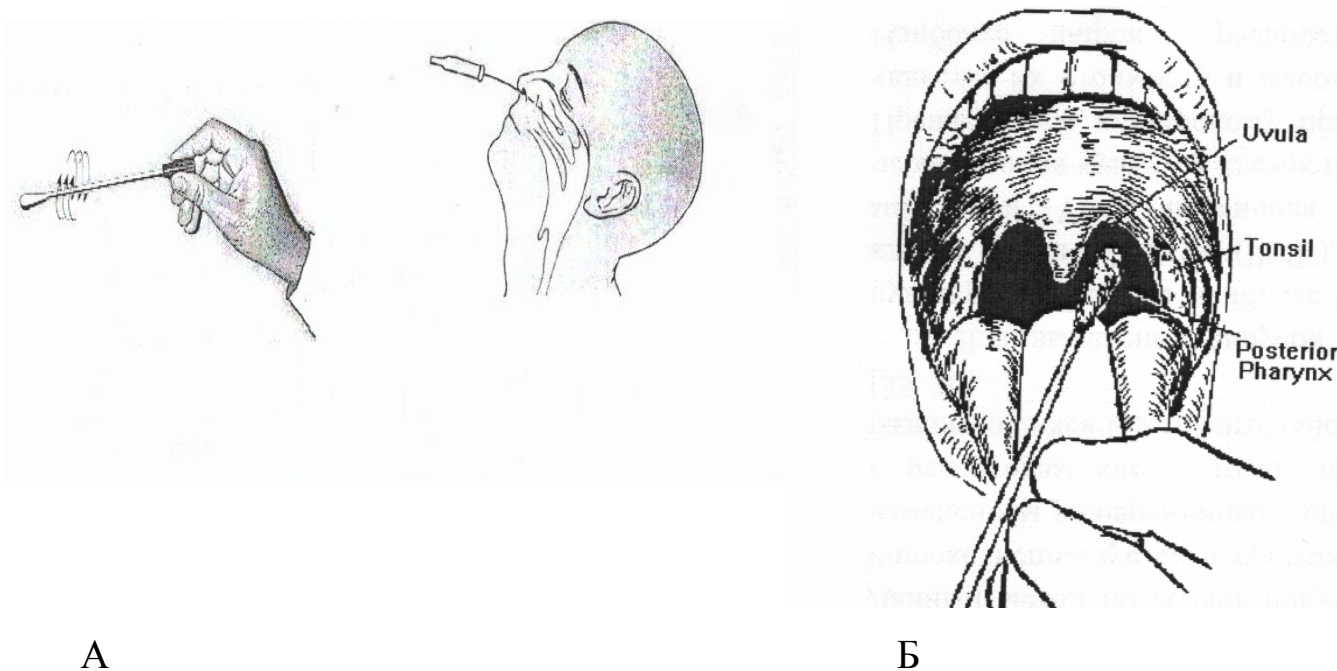
Забор, хранение и транспортировка клинических образцов

Забор клинического материала			
Клинический образец	Метод забора образца	Состав тр. среды	Время забора образца
Мазки из зева	забирает обученный медперсонал. Глотка должна быть хорошо освещена, язык должен быть прижат шпателем, чтобы не было слюны. Образец берется стерильным тампоном с задней стенки глотки, миндалин. Тампон немедленно помещают в пробирку, содержащую 2-3 мл транспортной среды	1 л. р-ра Хенкса, содержащий 0,5 % БСА, гентамицин 250мг, нистатин 0,5 x10 ⁶ МЕ.	Пробу забирают в течение 3-х дней от начала заболевания.
Мазки из носа	гибкий тонкий тампон вводят в ноздрю, тампон вращают 5 сек. и помещают в пробирку с тр. средой (2-3 мл), туда же помещают тампон, которым брали мазок из зева.	--//--	--//-- ---//-- ---//--
Назофарингеальный аспират	тонкий зонд вводят через ноздрю в носоглотку и аспирация производится шприцем. Если невозможно отсосать материал, больной запрокидывает голову назад, через зонд вводят 4-7 мл тр.среды, затем среду отсасывают и помещают в стерильную пробирку. Если материала меньше 2 мл, то добавляют тр.ср., если больше 2 мл, ничего не добавляют	--//--	--//-- ---//-- ---//--

Хранение и транспортировка клинического материала

Условия хранения	Условия транспортировки	По Минску	Из базовых лабораторий и дозорных пунктов
<p>+4°C – не более 48 часов;</p> <p>-70°C – более 48 часов (при невозможности исследования в течение 48 часов)</p>	<p>Мазки из носа и глотки, назофарингеальные смывы: образцы немедленно помещаются в тр.среду. Пробирки должны быть плотно закрыты, промаркированы. Транспортировка осуществляется в вертикальном положении пробирки при соблюдении медико-санитарных правил и холодной цепи.</p> <p>Не использовать пробирки с ватными пробками и пробирки со вставляющимися пластмассовыми пробками).</p> <p>В направлении на исследование сообщается дата заболевания и дата забора материала, эпиданамнез, клиническая симптоматика, тяжесть заболевания, прием противогриппозных препаратов</p>	<p>Доставляют в лабораторию в течение 24 часов с соблюдением холодной цепи.</p>	<p>Доставляются в лабораторию в течение 48 часов в условиях холодной цепи.</p>

Техника забора мазков



А

Б

Рисунок 1. – Техника забора мазка из носа (А) и зева (Б)

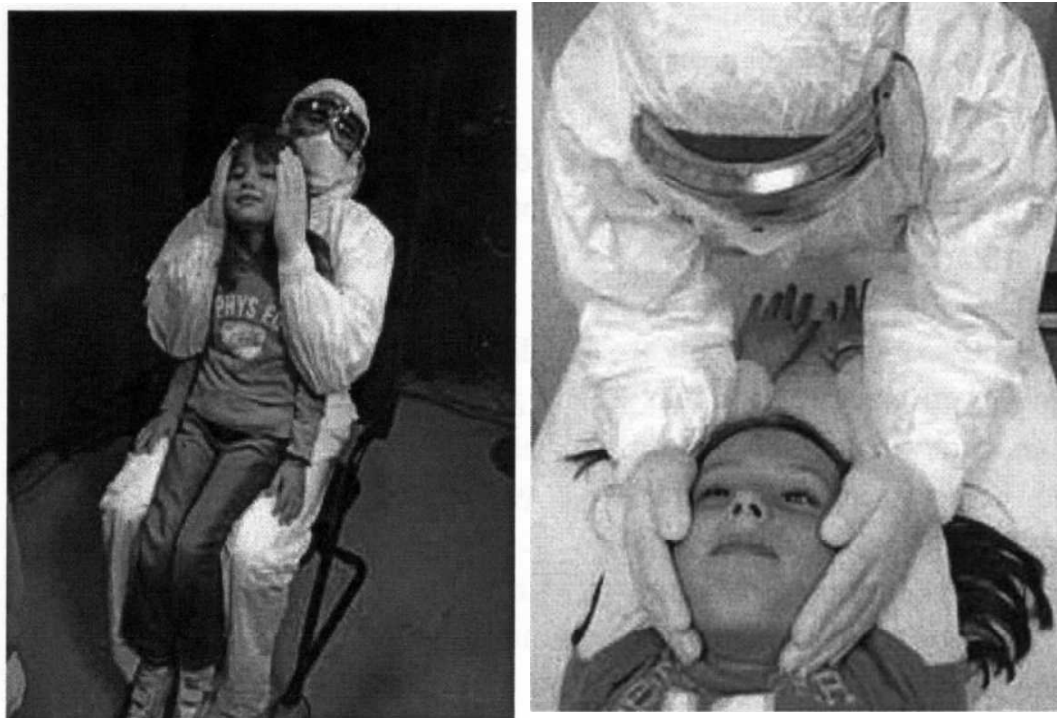


Рисунок 2 – Положение ребенка при заборе назофарингеальных мазков

Приложение 3

Алгоритм диагностики гриппа (сезонный/пандемический) базовыми лабораториями НЦГ

