



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

П Р И К А З

03 апреля 2018

Донецк

№ 516

Об утверждении методических рекомендаций «Методы диагностики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций»

С целью развития приоритетных направлений, совершенствования организации и проведения лабораторной диагностики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций, во исполнение ст. 44 Закона Донецкой Народной Республики «Об обеспечении санитарного и эпидемического благополучия населения» от 18.05.2015 № 40 I НС, руководствуясь подпунктом 7.12 пункта 7 пунктами 11, 13 Положения о Министерстве здравоохранения Донецкой Народной Республики, утвержденного Постановлением Совета Министров Донецкой Народной Республики от 10 января 2015 года № 1-33,

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить методические рекомендации «Методы лабораторной диагностики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций» (прилагаются).

2. Главному врачу Республиканского центра санитарно-эпидемиологического надзора Государственной санитарно-эпидемиологической службы Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики довести Методические рекомендации «Методы диагностики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций» до сведения территориальных подразделений Государственной санитарно-эпидемиологической службы Министерства здравоохранения Донецкой

Народной Республики, учреждения здравоохранения Донецкой Народной Республики.

3. Контроль за исполнением настоящего Приказа возложить на директора Департамента организации оказания медицинской помощи Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики

Министр



А.А. Оприщенко

УТВЕРЖДЕНЫ
Приказом Министерства здравоохранения
Донецкой Народной Республики
от 03 апреля 2018 № 516

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ»**

Настоящие Методические рекомендации «Методы лабораторной диагностики гриппа и ОРВИ» (далее - Методические рекомендации) устанавливают требования к выполнению лабораторной диагностики гриппа и ОРВИ, сбор, хранение, транспортировку образцов для диагностики гриппа. Предназначены для использования врачами-вирусологами вирусологической лаборатории, медицинским персоналом учреждений здравоохранения Донецкой Народной Республики.

I. ВВЕДЕНИЕ

Грипп - острое вирусное заболевание, относящееся к наиболее распространенным и социально значимым болезням. Ежегодно грипп и другие ОРВИ занимают первое место среди всех инфекционных заболеваний. Сезонные вспышки гриппа, как правило, продолжаются 6-8 недель, при этом заболевает каждый десятый взрослый. По данным ВОЗ дети до 3 лет болеют ОРВИ от 4 до 12 раз в год, дошкольники – до 6 раз, школьники - 3 раза, взрослые - 2 раза в год. От гриппа и его осложнений ежегодно в мире погибает до 500 тыс. человек. Ежегодные вспышки гриппа наносят большой медико-социальный ущерб и комплексное негативное влияние на общество, чем пандемия, развивающаяся 1 раз в 10 лет.

Текущая глобальная ситуация в области гриппа характеризуется рядом тенденций, зависящих от внешних факторов, и которые необходимо постоянно отслеживать. Они включают в себя: увеличение разнообразия вирусов гриппа животных и птиц, которые при совместной циркуляции во внешней среде обмениваются генетическим материалом, в результате чего создаются новые вирулентные штаммы; продолжающиеся случаи инфицирования людей высокопатогенными вирусами гриппа: H7N9 в Китае; резкое увеличение числа случаев заражения людей вирусом H5N1 в Египте и т. д.

С целью своевременного определения начала эпидемического подъема заболеваемости и организации противоэпидемических мероприятий по предупреждению распространения гриппа и ОРВИ с 40-й недели года на всех

административных территориях Донецкой Народной Республики ежегодно вводится еженедельный эпидемиологический мониторинг заболеваемости населения респираторными инфекциями.

Неотъемлемой составной частью эпидмониторинга является вирусологический мониторинг, основная цель которого – своевременное прогнозирование эпидситуации путем изучения этиологической структуры циркулирующих вирусов гриппа, состояния коллективного иммунитета и заболеваемости среди различных групп населения.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Перечень и сроки отбора биологического материала для исследования

Важным моментом исследования является правильный выбор, отбор, хранение и использование биологического материала. Биологический материал должен соответствовать конкретной нозологии заболевания.

Для диагностики ОРВИ преимущественно используется биологический материал из дыхательных путей: мазки из задней стенки ротоглотки и мазки из носа. Максимальная концентрация вирусов в слизистой оболочке носоглотки и задней стенки ротоглотки достигается на 2-й, 3-й день (не позднее 72 часов) от момента появления симптомов заболевания. В связи с этим, отбирать материал для исследования предпочтительно именно в эти сроки или в первый день госпитализации, по возможности до начала противовирусной терапии. В качестве ретроспективной диагностики материалом для исследования могут служить парные сыворотки крови от больных для определения наличия прироста антител к различным типам вируса гриппа и/или парагриппа. При этом первая сыворотка крови отбирается у больного в первые 3 дня заболевания, а вторая - через 10-14 дней после начала заболевания.

В случае летального исхода с целью определения этиологии инфекции отбор проб проводится не позднее 24 часов от момента смерти. Исследуется посмертный (аутопсийный) материал следующих органов: участки пораженных легких, трахеи, бронхов.

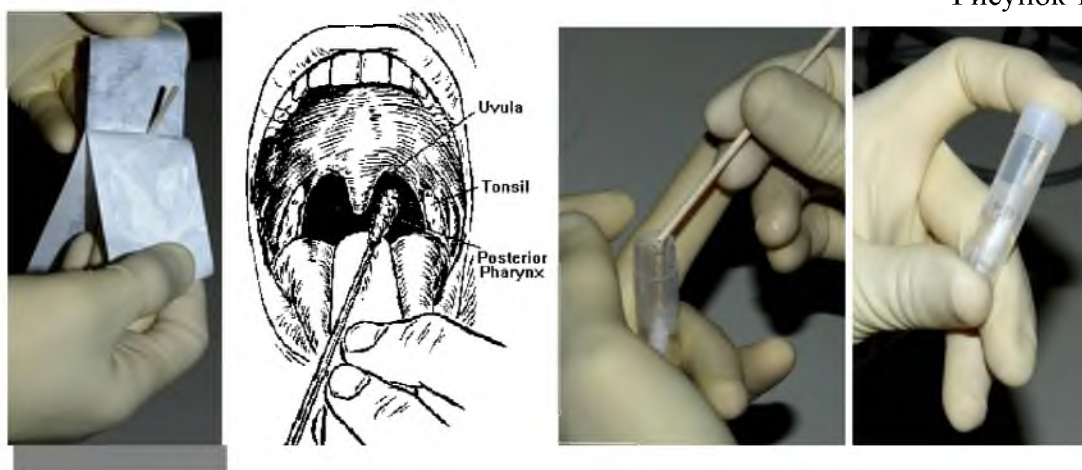
2.2. Методика отбора биологического материала

Мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки берут после полоскания полости рта кипяченой водой комнатной температуры. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. В течение 6-ти часов перед процедурой нельзя использовать медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку и препараты для рассасывания во рту.

Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным тампоном на пластиковом аппликаторе (допустимо использовать сухой стерильный зонд из полистирола с вязким тампоном). Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см

(детям 0,5-1 см), делают вращательное движение, извлекают вдоль наружной стенки носа. Образцы из обоих носовых ходов отбираются одним тампоном. После забора материала конец зонда с тампоном опускают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой, свободный конец зонда отламывают, опустив рукоятку зонда вниз, пробирку герметично закрывают.

Мазки из ротоглотки берут сухим стерильным зондом из полистирола с вязким тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки (рисунок 1), при этом просят пациента сказать "ааа" для поднятия язычка, аккуратно прижимая язык пациента шпателем. При взятии мазка не касаться тампоном внутренней поверхности щек и языка. После забора материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку с транспортной средой и зондом с мазком из носоглотки. Свободный конец зонда отламывают, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Если пациент находится на интубации, можно взять аспират из трахеи или отобрать образец во время бронхоальвеолярного лаважа. Допускается хранение таких образцов в течение 1-3 суток при температуре от + 2 до +8°C, более длительно – при температуре не выше минус 16°C.



Аутопсийный материал должен быть нативным, без фиксации формалином. Забор осуществляют стерильным индивидуальным для каждого органа инструментом из зоны поврежденной ткани объемом 1-3 см³. Отобранный материал помещают в одноразовые стерильные пластиковые контейнеры (или криопробирки) с герметично закручивающейся крышкой.

Если в трахею умершего вставлена эндотрахеальная трубка, необходимо взять мазок глубокого эндотрахеального аспирата. Если позволяют условия, берется образец ткани поврежденных легких с помощью надреза или биопсии. Участки, находящиеся на границе с интерстициальными инфильтратами, - наиболее вероятные места репродукции вируса и получения наилучших диагностических результатов.

Транспортной средой (ТС) при отборе носоглоточных мазков для диагностики гриппа и ОРВИ может служить:

1. Раствор натрия хлорида 0,9% (физиологический раствор рН 7,2-7,4). Данный раствор готовится на базе учреждений здравоохранения. Срок его хранения при температуре от +4 °С до +8 °С до выпадения осадка, но не более двух недель. Данная транспортная среда используется для диагностики методом ПЦР.

2. Раствор Хенкса с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и пенициллином из расчета по 400 Ед/мл в каждую пробирку. Данная транспортная среда готовится на базе вирусологической лаборатории в случае планирования выделения живого вируса гриппа на культуре клеток с целью его глубокого молекулярно-генетического исследования с последующей эпидемиологической оценкой. По предварительному согласованию транспортная среда передается специалистам лечебных учреждений, производящим отбор проб.

Отбор образцов сывороток крови производят из венозной крови в асептических условиях. Первый образец отбирают в острой фазе заболевания, второй - через 10-14 дней (в период выздоровления). Объем каждой пробы сыворотки должен быть приблизительно 1 мл.

2.3. Маркировка материала и оформление направления для лабораторного исследования.

На этикетке пробирок (контейнеров) с материалом указывается: порядковый номер образца, соответствующий номеру в сопроводительном документе, фамилия и инициалы пациента, тип биоматериала. В сопроводительном документе (направлении) к биоматериалу необходимо обозначить:

- наименование учреждения, которое направляет биоматериал на исследования, телефон, адрес электронной почты;
- фамилию и имя обследуемого лица;
- возраст или дату рождения;
- пол;
- дату взятия биоматериала для лабораторного исследования;
- тип материала;
- дату заболевания, госпитализации;
- предварительный клинический диагноз или повод к обследованию;
- степень тяжести заболевания;
- данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован / не вакцинирован / нет данных);
- ФИО, должность сотрудника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным сотрудником.

2.4. Транспортирование биологического материала.

Флаконы и пробирки с образцами (первичная упаковка) необходимо транспортировать в вертикальном положении в штативах в специальных контейнерах. Вокруг пробирок необходимо поместить влагопоглощающий

материал: вату или салфетки, на случай разлития жидкости. Первичные емкости с образцами и влагопоглощающим материалом необходимо поместить в дополнительную водонепроницаемую упаковку, например плотный целлофан (вторичная упаковка). Штативы или спец. контейнеры с флаконами транспортируются в сумке-холодильнике или контейнере с холодowymi элементами (третичная упаковка). В контейнер рекомендовано поместить одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение требуемой температуры.

Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.

Таблица № 1. Приемлемость различных условий хранения и транспортировки образцов для разных видов исследования

Условия хранения/транспортировка	Мазки или другие образцы в ТС для изоляции вируса	Мазки или другие образцы в ТС для ПЦР
-70°С или сухой лед (-80°С) или жидкий азот (N ₂)	Настоятельно рекомендовано	
-20°С	Не рекомендовано	Приемлемо
+4°С	Разрешено для хранения на срок до 6 часов	Приемлемо, но не более 48 часов
Комнатная температура	Не рекомендовано	Приемлемо на протяжении 1-2 часов

а) Необходимо избегать повторного замораживания и размораживания образцов.

б) Если образцы для изоляции вируса находятся в транспортной среде, то доставка в лабораторию должна осуществляться в течение 48 часов. При этом их необходимо хранить при +4°С, а если предусматривается, что они будут храниться более длительное время, то их необходимо заморозить при -70°С. Замораживание при -20°С не рекомендовано, поскольку вирус плохо переносит медленное замораживание до такой температуры, и результат впоследствии может быть негативным.

2.5. Оценка приемлемости образцов

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с образцами биологического материала, их целостность и соблюдение условий транспортировки, зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений.

В случае непригодности доставленного образца (немаркированные или несущие неверную маркировку, без указания даты получения материала; хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа биологического материала; с нарушением целостности и/или герметичности тары (пробирок и др.)) необходимо уведомить сотрудника, направившего пробы для исследования, по контактному телефону и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

2.6. Целесообразность выбора лиц, подлежащих лабораторной диагностике

Лабораторное обследование в целях идентификации возбудителя гриппа и ОРВИ проводится в обязательном порядке при:

- госпитализации больного по поводу острой респираторной инфекции верхних и нижних дыхательных путей (тяжелые и необычные формы заболевания);

- заболевании лиц с высоким риском неблагоприятного исхода гриппа и ОРВИ (в том числе детей до 1 года, беременных, лиц с хроническими заболеваниями сердца, легких, метаболическим синдромом и других);

- регистрации очагов ОРВИ с множественными случаями заболеваний в организованных коллективах детей и взрослых с числом заболевших 5 и более человек в один инкубационный период, заболевании лиц из организаций с круглосуточным пребыванием.

В период эпидемических подъемов заболеваемости гриппом окончательный диагноз "грипп" может быть установлен как на основании лабораторного подтверждения, так и на основании клинических и эпидемиологических данных.

III. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА И ДРУГИХ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

В лабораторной диагностике вирусных инфекций выделяют три основных подхода:

1. Непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот (прямые методы диагностики).

2. Изоляция и идентификация вируса из клинического материала.

3. Серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител (≥ 4 раз) в течение болезни.

Культура клеток — метод, позволяющий выделить живой вирус с возможностью подвергнуть его глубокому молекулярно-генетическому анализу — длительный (недели) и требующий специальных условий.

Прямые методы — методы, позволяющие выявить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту непосредственно в клиническом материале — являются наиболее быстрыми (2–24 ч).

Непрямые методы — выделение вируса (один из самых старых и трудоемких методов диагностики).

Для подтверждения диагноза "грипп" и ОРВИ используются различные стандартизованные в Российской Федерации, Украине и др. странах методы лабораторной диагностики, в том числе:

- обнаружение РНК или ДНК вирусов гриппа и других ОРВИ (респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа 1-4 типов, коронавирус, риновирус, аденовирус, бокавирус) при исследовании мазков из носоглотки и задней стенки глотки методом ПЦР;

- выявление антигенов вируса гриппа при исследовании мазков из носоглотки методами иммунофлуоресцентного и иммунохроматологического анализов;

- выделение вирусов гриппа методом заражения куриных эмбрионов или перевиваемых культур клеток из отделяемого слизистой носа вирусологическим методом;

- серологическое исследование парных сывороток в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) на предмет увеличения уровня (титра) специфических антител во второй сыворотке (по сравнению с первой) в 4 и более раз при их одновременном исследовании.

Современные методы верификации вирусной этиологии заболевания обладают своими преимуществами и недостатками:

Таблица № 2. Сравнение различных подходов к диагностике ОРВИ

Методы диагностики	Время	Преимущества	Недостатки
Культура клеток	Дни - недели	- Высокая специфичность и чувствительность; - возможность дальнейшей работы с выделенным вирусом	- Необходимость в специальном оборудовании; - длительность
Прямые (электронная микроскопия, иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), радиоиммунологический анализ, молекулярные (полимеразная цепная реакция - ПЦР) и цитологические методы)	Часы - 1 день	- Быстрота; - применимость для вирусов, которые сложно культивировать	- Риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов; - сложность одновременного проведения большого количества исследований
Серологические (реакция связывания комплимента (РСК), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция торможения гемагглютинации (РТГА),	Недели	- Определение иммунного ответа на вирус; - применимость для вирусов, которые сложно культивировать	- Возможность перекрестных реакций; - во многих случаях необходимы парные сыворотки крови

На сегодняшний день преимущество отдается таким методам лабораторной диагностики гриппа и других ОРВИ как ПЦР и выделение вирусов на культуре клеток. Серологический метод используется как дополнительный для ретроспективной диагностики.

3.1. Исследование материала методом ПЦР

Подготовка материала для исследования методом ПЦР

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся пипеточными дозаторами переменных объемов с использованием одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл (тип «эпендорф») и наконечников с аэрозольным барьером (фильтром). Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должны обеззараживаться.

Мазки и смывы не требуют предварительной обработки.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс. об/мин. в течение 5-10 минут. Супернатант используют для экстракции РНК.

Исследование материала методом ПЦР

Диагностика методом ПЦР может проводиться только в лабораториях ПЦР-диагностики, устроенных в соответствии с действующей нормативной документацией и имеющих разрешение на работу с микроорганизмами 3-4 групп патогенности.

Все процедуры с образованием аэрозолей должны выполняться в специальных ламинарных боксах.

Работать следует в спецодежде: одноразовых перчатках, халатах с закрытой передней частью и рукавами, полностью закрывающими предплечья, шапочках, бахилах или сменной обуви, хирургической маске.

Центрифугирование образцов следует проводить при закрытых роторах в боксах биобезопасности.

После работы с образцами рабочие поверхности и оборудование должны быть продезинфицированы.

После внесения подготовленных проб в пробирки с лизирующим раствором и соответствующей экспозиции материал не перестает быть опасным для персонала.

Помещения, в которых проводится постановка ПЦР, а также поверхности столов до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению.

ПЦР-анализ проводится согласно инструкции и методических рекомендаций, прилагающихся к используемой тест-системе.

Внимание! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые материалы, которые имеют специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Готовый экстракт РНК можно хранить при температуре минус 18±2°C в течение недели или при температуре минус 70°C в течение года.

Использование позитивных и негативных контролей обязательно на всех этапах исследований!

3.2. Выделение и культивирование вирусов гриппа на культуре клеток MDCK

Целью изоляции вирусов гриппа от больных гриппом людей с успехом используется культура клеток MDCK, полученная из почки здоровой самки кокер-спаниеля в сентябре 1958 года (S.H.Madin, N.B.Darby). По морфологии данная культура представляет собой эпителиоподобные клетки.

Ведение культуры клеток MDCK

Работа с культурой клеток начинается с подготовки необходимых ингредиентов: ростовой среды, поддерживающей среды, раствора трипсина.

Ростовая среда: к 500 мл среды Игла MEM добавить:

- 55 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ТЭС)
- 5,5 мл глутамина
- 5,5 мл П/С (пенициллин/стрептомицин)

Раствор можно хранить при +4°C в течение 2 недель.

Раствор трипсина:

К 100 мл дистиллированной воды добавить 200 мг трипсина фирмы Sigma (номер каталога T-1426) 2 мг/мл = 0,2% вес/объем. Профильтровать раствор через 0,1 мкм мембранный фильтр. Разлить по 1 мл в пробирки с плотно прилегающими крышками. Срок использования – 2 года от момента приготовления. Хранить замороженным при -20°C.

Раствор для промывки:

К 300 мл раствора Хенкса добавить 0,15 мл подготовленного раствора трипсина. Этот раствор следует готовить каждый день (ex tempore).

Раствор пригоден для работы только в течение одного дня.

Поддерживающая среда:

К 500 мл среды Игла MEM добавить:

- 5,4 мл глутамина
- 5,4 мл П/С (пенициллин+стрептомицин)
- 13,5 мл ТСА (телячий сывороточный альбумин)
- 13,5 мл NEPES (солевой раствор)

Приготовленную поддерживающую среду можно хранить при температуре +4°C в течение недели.

В день заражения клеток к 100 мл поддерживающей среды следует добавить 0,2 мл раствора трипсина. Этот раствор пригоден для использования только на протяжении одного рабочего дня.

Добавление трипсина в раствор для промывки и в поддерживающую среду улучшает расщепление гемагглютинина вируса гриппа, ослабляет межклеточные связи и лучше адсорбируют вирус на их поверхности.

3.2.1. Культивирование и субкультивирование культуры клеток MDCK

Клетки культуры MDCK сохраняют высокую чувствительность к вирусам гриппа А и В в течение 60-80 пассажей. Однако после 61 пассажа вид культуры изменяется, она начинает напоминать переплетение паутины, цельного монослоя получить невозможно. Это затрудняет наблюдение за культурой на предмет появления цитопатического действия (ЦПД). Поэтому оптимально использовать культуру клеток MDCK до 61 пассажа, включительно.

Субкультивирование проводят каждые 4-7 дней для предотвращения старения культуры клеток и снижения ее чувствительности к вирусам гриппа.

Все растворы при работе с ними должны быть теплыми (35 - 37°C).

С матраса с монослоем клеток MDCK сливают ростовую среду и отмывают клетки небольшим объемом одного из растворов:

- трипсин EDTA или 1 флакон химопсина + 500 мл раствора Версена.

Легким покачиванием отмывают клеточный монослой в течение одной минуты, затем сливают. Процедуру повторяют, после чего вносят те же растворы в объеме, который покрывает монослой клеток, и помещают в термостат при 37°C на 30 минут или более, до момента начала отслоения клеток. Для ускорения этого процесса допускается постукивание рукой по стенке матраса. После отслоения клеток для остановки дальнейшего действия ферментов в него вносят небольшой объем равных частей телячьей эмбриональной сыворотки и основной среды. Суспензию клеток аккуратно пипетируют и проводят подсчет клеток в камере Горяева.

В зависимости от поставленных задач и необходимости иметь монослой клеток, рекомендуется подготовить следующие концентрации клеток:

100 000 кл/мл – 72 часа инкубации;

200 000 кл/мл – 48 часов инкубации;

400 000 кл/мл – 24 часа инкубации;

Готовую суспензию клеток разводят до нужной концентрации ростовой средой, разливают по матрасам или флаконам (пробиркам) и помещают в термостат (37°C) для роста монослоя.

3.2.2. Заражение культуры клеток MDCK клиническим материалом

Перед заражением с целью обогащения проб внутриклеточным антигеном необходимо провести их замораживание-размораживание (при -70°C или в жидком азоте). Затем добавить в смыв гентамицин: к 2 мл смыва добавляют 0,2 мл гентамицина 4%. При первичном заражении используют пробирки с монослоем клеток.

Первичное заражение MDCK

Сливают ростовую среду и трижды отмывают клетки 1,0 мл раствором Хенкса с трипсином. Среду удаляют и на 2-3 флакона вносят по 0,2 мл исследуемой пробы. Инкубируют 30-60 мин. при 34°C. Затем во все флаконы вносят по 1мл поддерживающей среды с добавлением трипсина и инкубируют

при 34°C в термостате (желательно с подачей 5% CO₂), контролируя каждый день состояние монослоя.

На 2-4 сутки проводят контроль постановкой реакции гемагглютинации (РГА) с 0,75% суспензией эритроцитов человека 0-группы крови или эритроцитов морской свинки или петуха. Для РГА стерильно отбирают по 50 мкл культуральной жидкости и 50 мкл 0,75% суспензии эритроцитов. При наличии агглютинации проводят раститровку культуральной жидкости, для определения титра вирусного антигена.

При отсутствии выраженного ЦПД и негативного результата РГА пробы выдерживают 6-7 дней, затем замораживают-размораживают при температуре -70°C или в жидком азоте и проводят следующий пассаж. Обычно делают до 3-х пассажей, после чего проба считается негативной.

При выраженном ЦПД и положительной РГА проба считается положительной и следующий этап - это закрепление и накопление вируса в большом объеме.

Между заражениями пробы лучше сохранять при температуре -70°C и ниже. Если таких условий нет, то можно хранить в течение 1-2 дней в холодильнике при температуре +4°C.

3.2.3. Накопление вируса

Накопление вирусов проводят на культуральных матрасах или во флаконах с монослоем клеток MDCK площадью 25 см² и больше.

Перед заражением монослой клеток отмывают дважды основной средой в объеме 5 мл, а потом вносят вируссодержащую жидкость в объеме 0,5 мл. Аккуратными движениями распределяют вируссодержащую жидкость на поверхности монослоя клеток и ставят на инкубацию при 34°C на 30-60 мин., периодически покачивая матрас. После этого добавляют поддерживающую среду в объеме 10-12 мл и ставят в термостат (34°C), контролируя наличие ЦПД.

При выраженном ЦПД (разрыв монослоя, закругление и сползание клеток) их необходимо перенести в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500-2000 об/мин 10-15 мин. Отобрать супернатант в стерильные пробирки и использовать для типирования в РТГА с диагностическими сыворотками.

3.3. Реакция торможения гемагглютинации

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) является серологическим методом, который основывается на определении прироста титра антител в парных сыворотках крови от больных. Данный метод используется для диагностики гриппа и парагриппозной инфекции. Для проведения РТГА с гриппозными антигенами используют 1% суспензию эритроцитов петуха или человека 0(1) группы крови и диагностикумы из штаммов, резистентных к неспецифическим сывороточным ингибиторам. Реакция включает следующие этапы работы: подготовка сывороток, подготовка рабочей дозы вируса,

подготовка суспензии эритроцитов, постановка реакции. Сыворотки человека содержат неспецифические ингибиторы, которые могут задерживать гемагглютинацию и искажать результат РТГА. Во избежание этого перед постановкой реакции с гриппозным диагностикумом парные сыворотки от больных разводят в 10 раз физиологическим раствором (ФР) и прогревают на водяной бане при температуре 56°C на протяжении 30 минут.

При постановке РТГА с парагриппозными антигенами для нейтрализации неспецифических ингибиторов сыворотки обрабатывают эритроцитами морской свинки и коалином. В этом случае сыворотку смешивают с 10% суспензией эритроцитов морской свинки в соотношении 1:5. После 30-минутной инкубации при +4°C смесь центрифугируют и к надосадочной жидкости добавляют равный объем 25% раствора коалина на ФР. Смесь активно встряхивают в термошейкере 20 минут а затем центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость – это сыворотка в разведении 1:10. В реакции используют 0,5% суспензию эритроцитов морской свинки.

В РТГА используют раствор диагностикума в рабочей дозе, который содержит 4 агглютинирующие единицы вируса (АЕ). Постановку реакции проводят как указано в инструкции к диагностическим сывороткам.

Диагностическим является четырехкратное увеличение титров антител во второй сыворотке (отобранной на 12-14 день заболевания) в сравнении с первой (отобранной в первые 3 дня заболевания).

3.4. Метод иммунофлуоресцентной диагностики гриппа и других ОРЗ

Иммунофлуоресцентный метод (ИФМ) используют для быстрой диагностики гриппа, парагриппа, аденовирусной, РС-вирусной инфекций, а также смешанных инфекций. В основе метода лежит способность антигенов вступать в реакцию со специфическими противовирусными антителами, меченными флуорохромом.

Диагностика осуществляется в двух направлениях:

1. Выявление вирусного антигена в клетках цилиндрического эпителия слизистой оболочки носоглотки или в отпечатках от секционного материала.

2. Выявление вирусного антигена в культурах клеток, инфицированных материалом от больных.

Используют прямой и непрямой методы иммунофлуоресценции. При прямой модификации метода используют коммерческие флуоресцентные глобулины против вируса гриппа, парагриппа, аденовирусов, РС-вирусов и др. Для непрямого метода используют противовирусные иммунные сыворотки разных видов животных и соответствующие антивидовые флуоресцирующие глобулины.

С помощью ИФМ этиологический диагноз можно установить через 2-3 часа при исследовании препаратов от больных и через 24-48 часов – при заражении культур клеток. Эффективность исследований самая высокая в

острой фазе заболевания (первые 3 дня), но существенно зависит от качества отбора материала.

Техника приготовления мазков для люминесцентной микроскопии

Пробирки с мазками хорошо стряхивают, тампоны тщательно отжимают о стенки пробирки и сбрасывают в дезраствор. Полученную суспензию клеток центрифугируют на протяжении 5-7 минут при 2000 об/мин. Для получения осадка клеток цилиндрического эпителия ФСБ сливают, осадок клеток ресуспензируют пастеровской пипеткой в нескольких каплях раствора, оставшемся на дне пробирки, и используют для приготовления мазков. На хорошо обезжиренные и сухие предметные стекла, которые до использования хранятся в этиловом спирте (96°) или в смеси Никифорова, наносят пастеровской пипеткой по одной капле каждую флуоресцентную сыворотку. Мазки высушивают при комнатной температуре. После этого их фиксируют в химически чистом безводном ацетоне, предварительно охлажденном до 2-4°С. Фиксированные мазки до окрашивания флуоресцентными глобулинами могут храниться в холодильнике при 4°С на протяжении недели.

Для исследования секционного материала используют кусочки трахеи, бронхов и легких размером 0,5 см, которые перед приготовлением препарата промывают в стерильном физиологическом растворе от крови. Со слизистой оболочки трахеи и бронхов препарат готовят путем соскребания скальпелем эпителиального покрова. Кусочки легких после промывания подсушивают фильтровальной бумагой, делают свежий разрез и для получения отпечатка прикладывают на тщательно обезжиренное предметное стекло. Препараты сушат и фиксируют в охлажденном ацетоне 5 минут.

Оценка результатов иммунофлуоресценции

При просмотре мазков обращают внимание на число и тип клеток, уровень их свечения, наличие флуоресцентных включений. В препаратах из носовой полости человека наиболее часто встречаются клетки цилиндрического и плоского эпителия, лейкоциты. Диагностическое значение имеет определение специфического (ярко зеленого) свечения не менее чем в 3-4 клетках цилиндрического эпителия, которые имеют бокалоподобную или округлую форму с соответствующим большим ядром и маленькой цитоплазматической зоной. Локализация свечения в клетках чаще всего цитоплазматическая, хотя при гриппе и аденовирусной инфекции может быть ядерная. При наличии у больного смешанной инфекции можно определить одновременно два разных вирусных антигена с типовой локализацией их для одной и второй вирусной инфекции. Лейкоциты и большие полигональные клетки с маленьким ядром (плоский эпителий) при анализе препаратов ко вниманию не берут.

IV. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ТРУДА МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА

Вирусологические исследования выполняются в учреждениях, имеющих разрешение на работу с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, лицензию на осуществление медицинской практики. Противоэпидемический режим в лаборатории должен быть обеспечен в соответствии с ГСП 9.9.5.-080-02 МЗ Украины, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Украины от 28.01.2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю» (до принятия другого действующего в ДНР нормативного документа). Лаборатории, которые проводят исследования методом ПЦР, должны соответствовать требованиям методических указаний 9.9.5.101-2003, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Украины от 09.07.2003 № 24 «Применение полимеразной цепной реакции для выявления возбудителей инфекционных заболеваний человека».

Исследование материала, содержащего микроорганизмы, связано с необходимостью соблюдения правил биологической безопасности с целью предотвращения контаминации исследуемых проб, помещений, оборудования и заражения персонала.

Для защиты медицинского персонала в учреждениях здравоохранения используются средства индивидуальной защиты (СИЗ).

К средствам индивидуальной защиты относят:

- средства для защиты органов дыхания (маски, респираторы);
- нестерильные перчатки из латекса (при аллергии на латекс их можно заменить перчатками из других материалов);
- защитные очки;
- защитный костюм;
- шапочку (косынку).



Одноразовые респираторы

с клапаном

без клапана

хирургическая маска

одноразовый респиратор с клапаном



Дезинфекция проводится дезинфицирующими средствами, зарегистрированными в установленном порядке, с учетом разрешенной сферы применения, согласно методической инструкции, при наличии сертификата качества. Действующее вещество применяемого дезинфицирующего средства

должно соответствовать требованиям, указанным в паспорте к медицинскому инструментарию и оборудованию, во избежание негативного влияния на ход лабораторных исследований и вредного воздействия на объект дезинфекции.

Гигиеническая обработка рук (с использованием антисептика) после выполнения медицинских манипуляций должна проводиться перед мытьем, а не наоборот, чтобы избежать контаминации окружающих поверхностей. Если кожу необходимо очистить от видимых загрязнений (в том числе органического происхождения), мытье рук является обязательным перед обработкой рук антисептиком.

Важным условием эффективности гигиенической обработки рук является соблюдение следующих правил:

при проведении гигиенической дезинфекции рук путем обработки спиртовым антисептиком необходимо нанести средство на сухую ладонь одной руки и растереть по всей поверхности кистей и пальцев обеих рук до их полного высыхания.

при мытье рук их сначала надо смочить водой, затем нанести необходимое количество моющего средства и тщательно мыть руки минимум в течение 15 с, чтобы обработать всю поверхность кистей и пальцев, затем смыть руки водой и тщательно высушить их с помощью одноразового полотенца, которое использовать для закрытия крана;

целесообразно пользоваться небольшими кусками мыла и применять подставки в виде решеток для его быстрого высыхания или жидкое мыло в дозаторах.

не рекомендуется использовать многоразовые тканевые полотенца.

V. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Внутренний контроль качества микробиологических исследований – это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий развития искомого микроорганизма, а также предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата. Соблюдение установленных требований обязательно при проведении всех видов микробиологических исследований.

Основные направления организации внутреннего контроля качества:

1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения испытаний:

- контроль температурных режимов инкубации и хранения: контроль температуры в термостатах; контроль температуры в холодильниках;
- контроль параметров внешней среды производственных помещений, влияющих на проведение исследований (испытаний);
- контроль качества дезинфекции и стерилизации;
- контроль микробной обсемененности воздуха;

- контроль микробной обсемененности поверхностей;
- оценка эффективности ультрафиолетового бактерицидного излучения.
- 2. Контроль качества дистиллированной воды.
- 3. Контроль стерильности питательных сред и диагностических препаратов.
- 4. Контроль дезинфицирующих средств.
- 5. Проведение параллельных исследований.
- 6. Исследование контрольных образцов.
- 7. Внешний контроль качества.
- 5.1. Контроль за соблюдением требований к условиям проведения испытаний

Контроль температурных режимов инкубации и хранения:

1. Процедура контроля температуры в термостатах.

Контроль температурных режимов инкубации и хранения проводится непрерывно с помощью поверенных термометров или приборов автоматического считывания температуры (температурных логгеров TESTO 174). Цена деления термометра не должна превышать половины величины допустимого отклонения температуры инкубации, определенного нормативно-методической документацией.

Один раз в месяц проводится обеззараживание внутренней поверхности термостата, полок: части термостата, соприкасающиеся с исследуемыми объектами, протирают ветошью, смоченной раствором дезинфицирующего средства с моющим эффектом или протирают моющим средством с последующей обработкой 70° спиртом.

2. Процедура контроля температуры в холодильниках.

Контроль температуры в холодильниках проводят ежедневно, используя поверенный термометр или прибор автоматического считывания температуры (температурный логгер TESTO 174), помещая его в центр камеры холодильника. В холодильнике для хранения диагностических препаратов температуру измеряют на верхней и нижней полках.

В холодильнике для хранения проб и диагностических препаратов температура должна быть от +2°С до +8°С, морозильной камере от -16°С до -24°С. Один раз в день перед началом работы снимают показания контрольных термометров, результаты измерений заносят в журнал (контрольный лист).

Два раза в месяц холодильники внутри моют 3% раствором перекиси водорода с 0,5% раствором моющего средства двукратно с интервалом 15 мин. Через 1 час промывают теплой водой. Внутреннюю поверхность холодильника для хранения биоматериала обрабатывают 70° спиртом.

Контроль параметров внешней среды производственных помещений

Данная процедура включает контроль микроклимата в производственных помещениях (температуры, влажности, скорости движения воздуха), шума, освещенности, эффективности работы вентиляции и др. Контроль параметров внешней среды планируют и проводят с привлечением

специалистов лаборатории физических факторов и санитарно-гигиенической лаборатории.

Кратность проведения исследований не должна быть реже 1 раза в 5 лет при проведении процедуры аттестации рабочих мест.

Ежедневно проводится контроль температуры и относительной влажности воздуха в рабочих комнатах для проведения исследований. Перед началом работы снимают показания термометров и гигрометров, результаты измерений заносят в журнал.

Температура окружающего воздуха в рабочих помещениях для вирусологических исследований на культуре клеток, ПЦР-отделе, должна быть от +18°C до +27°C, в помещении для проведения ИФА - от +18°C до +25°C.

Не реже одного раза в квартал проводится контроль на загрязненность продуктами амплификации в комнатах, ламинарных и УФО боксах для ПЦР исследований.

Контроль качества стерилизации и дезинфекции

Для контроля режимов стерилизации необходимо использовать три вида контроля

Вид контроля	Кратность контроля
Химический	каждый цикл стерилизации
Физический	каждый цикл стерилизации
Биологический	1 раз в месяц

Химический контроль проводят в контрольных точках рабочей камеры автоклава с помощью бумажных индикаторных полосок. Число контрольных точек зависит от емкости камеры.

Емкость камеры парового стерилизатора (л)	Число контрольных точек в стерилизационной камере
100	5
100 - 750	11
Свыше 750	13

Для стерилизатора объемом до 100 л точки 1 и 2 находятся: для горизонтального автоклава 1-я - у загрузочной двери, 2-я - у противоположной стенки, для вертикального автоклава - в верхней и нижней части камеры соответственно. В точках 1 и 2 тесты располагают вне стерилизуемых изделий. В остальных точках тесты располагают в центре стерилизационных коробок или внутри стерилизуемых упаковок или используют упаковки с индикатором. Для стерилизаторов больших объемов тесты располагают согласно схеме, приводимой в инструкции по использованию индикаторов стерилизации.

Физический контроль основывается на снятии показаний с манометров и максимальных термометров. Максимальные термометры с диапазоном измерений от 0 до 150 град. в пакетах из упаковочной бумаги располагают в 1-

й и 2-й контрольных точках. Погрешность измерений не должна превышать 1°C.

Биологический контроль осуществляется 1 раз в месяц. При его выполнении используют коммерческие биотесты в соответствии с инструкцией по применению.

Контроль микробной обсемененности воздуха

Контроль воздуха на микробную обсемененность проводят в комнатах для проведения культуральных исследований, боксах или (и) в ламинарных укрытиях перед началом проведения работ не реже 1 раза в квартал. Исследование воздуха на обсемененность предусматривает определение общего содержания микроорганизмов в 1 куб. м воздуха при использовании седиментационного метода. В двух точках рабочей комнаты, бокса и (или) ламинарного шкафа, находящегося в «рабочем режиме» ставят открытые чашки Петри с питательным агаром на 15 мин. После экспозиции чашки закрывают, переворачивают и помещают в термостат. Посевы инкубируют при температуре (37 +/- 1) °C в течение (24 +/- 2) часов. После инкубации проводят учет количества выросших колоний микроорганизмов.

Контроль микробной обсемененности поверхностей проводится с целью проверки эффективности их дезинфекции. Бактериологическое исследование микробной обсемененности объектов внешней среды предусматривает определение золотистого стафилококка, синегнойной палочки и БГКП. Отбор проб с поверхностей различных объектов в культуральных боксах и ламинарных боксах осуществляют путем отбора смывов перед началом рабочего дня один раз в квартал, во всех остальных рабочих комнатах не реже одного раза в год. Смывы отбирают с поверхности рабочих столов и стен культуральных боксов, ламинарных и УФО боксов, рабочих комнат, с внутренних поверхностей термостатов, ламинарных шкафов и др.

Оценка эффективности ультрафиолетового бактерицидного излучения

В процессе работы мощность потока бактерицидного излучения лампы снижается. В связи с этим при выработке 1/3 ресурса (ресурс лампы указан в паспорте на лампу) время экспозиции необходимо увеличить в 1,2 раза, а после 2/3 номинального срока службы - в 1,3 раза. При выработке гарантированного срока службы лампа подлежит замене, даже если она функционирует. Для обеспечения качественной работы ультрафиолетовых ламп необходимо:

- фиксировать дату начала эксплуатации, вести учет времени работы лампы, вносить коррективы времени экспозиции и осуществлять замену согласно отработанному ресурсу лампы;
- не реже 1 раза в месяц (во время генеральной уборки) стеклянные поверхности бактерицидных ламп протирать в выключенном состоянии 70% спиртом.

Применение ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха считают эффективным, если уровень микробной

обсемененности после облучения не превышает допустимых пределов - пророст не более 3 колоний на чашке при использовании седиментационного метода.

5.2. Контроль качества дистиллированной воды

В вирусологической лаборатории дистиллированная вода используется для приготовления растворов, мытья лабораторной посуды, заправки паровых стерилизаторов. Для контроля по физико-химическим показателям дистиллированная вода должна исследоваться в санитарно-химической лаборатории не реже 1 раза в квартал.

5.3. Контроль стерильности питательных сред

Для контроля стерильности готовые вирусологические питательные среды, растворы трипсина и Версена помещают из холодильника в термостат при температуре 37°C на (48 +/- 2) ч. При отсутствии визуального помутнения, выпадении осадка, дополнительных примесей флаконы можно использовать в работе. После работы оставшиеся среды (растворы) помещаются в термостат для дополнительного контроля отсутствия контаминации при проведении вирусологических исследований.

5.4. Контроль дезинфицирующих средств

В вирусологической лаборатории с целью дезинфекции используются дезинфицирующие средства, разрешенные к применению и имеющие соответствующие документы. Контролю подвергаются все вновь поступившие партии дезинфицирующих средств.

5.5. Дублирование исследований (параллельные исследования)

В качестве объектов исследования зав. лабораторией не реже 1 раза в квартал выдает параллельно 2-м специалистам пробы клинического материала для проведения параллельных исследований. Целью такой работы является, как определение соответствия данного образца требованиям действующей нормативно-методической документации по вирусологическим показателям, так и достоверности проводимых исследований и полученных результатов. Подтверждением правильности выполнения считается совпадение результатов, полученных разными специалистами.

5.6. Исследование контрольных образцов

При диагностике на культуре клеток в каждой партии зараженных пробирок с монослоем культуры клеток должны присутствовать не менее двух контролей в виде незараженных пробирок. С одной стороны данные пробирки являются контролем стерильности питательной среды, а с другой – контролем за ростом и состоянием монослоя культуры клеток.

Каждую постановку реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с гриппозными диагностикумами необходимо сопровождать постановкой

контролей соответствующих диагностикумов и эритроцитов на физ. растворе в соответствии с инструкцией к диагностикумам.

При каждой постановке ПЦР обязательным является постановка негативных контролей при выделении нуклеиновых кислот, а также постановка всех указанных в инструкции к тест-системе контролей при амплификации.

Для выявления возможной контаминации ПЦР-отдела нуклеиновыми кислотами или продуктами амплификации проводят отбор контрольных смывов с рабочих поверхностей. Смывы отбирают стерильными ватными тампонами, смоченными стерильным физ. раствором. Отобранные смывы опускают в пробирку с физ. раствором и вращательными движениями смывают отобранный материал, отжимая излишек жидкости с тампона о стенки пробирки, затем тампон удаляют. Полученную суспензию центрифугируют при 12 тыс. об/мин. в течение 1 минуты, надосадок отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл и используют для выделения нуклеиновых кислот.

5.7. Внешний контроль качества

Внешний контроль качества осуществляется в форме участия в межлабораторных сличениях. В случае неудовлетворительной оценки полученных результатов в лаборатории необходимо принимать экстренные меры по устранению ошибок.

5.8. Обеспечение конфиденциальности информации при проведении вирусологических исследований

Прием проб и выдача результатов исследования осуществляются с помощью курьеров соответствующих учреждений здравоохранения при предъявлении ими служебного удостоверения. Результаты исследований выдаются на утвержденном бланке в соответствии с направлением на анализ.

Доступ к рабочим и регистрационным журналам лаборатории имеют только специалисты лаборатории. До окончания исследования запрещается предоставлять информацию о ходе исследования и выдавать предварительные результаты. Запрещается передавать информацию о результатах исследования с помощью телефонной связи, кроме сообщений для оперативных специалистов санитарно-эпидемиологической службы, при необходимости.

Ответственность за соблюдение конфиденциальности и защиты прав заказчика возложена на руководителя лаборатории. Требования в отношении соблюдения конфиденциальности информации, получаемой в процессе исследований, отражены в должностных инструкциях сотрудников лаборатории.