

## **Отбор клинических проб для ОТ-ПЦР и выделения вируса и отбор вирусов для отправки из Национальных центров гриппа в Сотрудничающие центры ВОЗ**

Глобальный вирусологический надзор за гриппом основывается на антигенной характеристике (методы торможения гемагглютинации и нейтрализации вируса), подкрепляемой генетическим секвенированием (главным образом гемагглютинина и нейраминидазы) вирусов гриппа, и результаты этих анализов формируют основу для оценки связанного с гриппом эпидемического/пандемического риска и отбора/создания сезонных/пандемических вакцинных вирусов. Для всего этого **необходимы изоляты вируса**. По этой причине выделение вирусов является одним из положений Круга обязанностей Национальных центров гриппа (НЦГ)<sup>1</sup> Глобальной сети по надзору за гриппом (ГСНГ).

В последние годы, и особенно во время пандемии гриппа А(Н1N1) 2009, широко использовались молекулярные технологии, и количество выполняющих выделение вируса лабораторий уменьшилось. Чтобы гарантировать, что в будущем лаборатории будут делиться соответствующими вирусами в рамках ГСНГ, этот документ был создан с целью помощи лабораториям в отборе клинических проб для выделения вируса и определения того, какими вирусными изолятами необходимо делиться в рамках ГСНГ путем отправки в Сотрудничающий Центр (СЦ) ВОЗ<sup>2</sup>. В этих рекомендациях также описывается, как сочетать использование ПЦР с выделением вируса.

### **Принципы отбора проб для выделения вирусов:**

- ПЦР может использоваться для быстрого выявления вируса гриппа в клинических пробах
- В зависимости от количества положительных проб и с учетом имеющейся эпидемиологической и клинической информации и соответствующих требований биобезопасности все или часть этих положительных проб может быть отобрана для выделения вируса.

Каждой стране в течение каждого сезона ВОЗ рекомендует отбирать следующие пробы

- Максимально возможное количество репрезентативных положительных проб следующих категорий:
  - Пробы от людей различных возрастных групп
  - Пробы, собранные в различных условиях и различных местах на всей территории страны;
  - Пробы, относящиеся к различным стадиям прогрессии активности гриппа, например, к началу, середине и концу эпидемии.
  - Пробы, относящиеся к тяжелым случаям заболевания
  - Пробы, собранные во время необычных вспышек, например, летом в странах с умеренным климатом
  - 5% отрицательных проб
- Специально для мониторинга чувствительности к противовирусным препаратам
  - Репрезентативные пробы, взятые от больных, проходящих лечение противовирусными препаратами
  - Пробы от больных с ослабленным иммунитетом, которые могут проходить лечение противовирусными препаратами, в течение продолжительного времени выделять вирус и в случае, когда лечение оказалось неэффективным.
  - Репрезентативные пробы, содержащие вирус, о котором известно, что он устойчив к противовирусным препаратам, что было определено, например, при помощи генетического анализа.

Рекомендованный способ сочетания использования ПЦР с выделением вируса проиллюстрирован на рисунке 1 (в оригинале текста рисунок отсутствовал) с учетом преимуществ каждой технологии, потребностей глобального вирусологического надзора за гриппом и применимости в отношении НЦГ.

<sup>1</sup> <http://www.who.int/csr/disease/influenza/TORNICs.pdf>

<sup>2</sup> <http://www.who.int/csr/disease/influenza/collabcentres/en/>

**Рекомендации для НЦГ по отбору клинических проб/вирусных изолятов для отправки в Сотрудничающий центр ВОЗ (СЦ ВОЗ) ГСНГ:**

НЦГ настоятельно рекомендуется осуществлять выделение вируса всегда, когда это возможно и регулярно отправлять репрезентативные вирусные изоляты в один из СЦ ВОЗ для их дальнейшей характеристики. Если лаборатории не имеют возможности осуществлять выделение вируса, или по запросу СЦ ВОЗ, эти лаборатории могут отправлять туда клинические пробы.

Критерии отбора проб и/или вирусных изолятов для отправки в СЦ ВОЗ:

- Примерно 5 репрезентативных свежих (собранных 4-6 недель назад) проб и/или вирусных изолятов, относящихся к каждой из следующих групп:
  - Пробы от людей различных возрастных групп (например, от детей, взрослых и пожилых людей)
  - Пробы, собранные в различных условиях и различных местах на всей территории страны
  - Пробы, относящиеся к различным стадиям прогрессии активности гриппа, например, к началу, середине и концу эпидемии.
- Все вирусы, дававшие титр ниже ожидавшегося в реакции торможения гемагглютинации с референс-набором ВОЗ или с антисывороткой овцы или хорька к вирусу гриппа
- Любой вирус, субтип которого не определяется, т.е. положительные на грипп А пробы, в которых вирус не может быть идентифицирован как вирус одного из известных циркулирующих субтипов, должен быть **как можно скорее** направлен в СЦ ВОЗ
- Подмножество клинических проб/вирусных изолятов от лиц, представляющих тяжелые случаи заболевания, а также относящихся к необычным вспышкам (не более пяти на одну вспышку)
- Специально для мониторинга чувствительности к противовирусным препаратам:
  - Репрезентативные пробы, взятые от больных, проходящих лечение противовирусными препаратами.
  - Пробы от больных с ослабленным иммунитетом, которые могут проходить лечение противовирусными препаратами, в течение продолжительного времени выделять вирус и в случае, когда лечение оказалось неэффективным.
  - Репрезентативные пробы, содержащие вирус, о котором известно, что он устойчив к противовирусным препаратам.
  - Вирусы, демонстрирующие при фенотипическом тестировании промежуточное значение  $IC_{50}$  для любого лекарственного препарата (т.е. те вирусы, которые при тестировании в данной лаборатории имеют повышенное значение  $IC_{50}$  в сравнении с диапазоном значений, характерным для нормальных чувствительных вирусов, но ниже диапазона, характерного для устойчивых).

**Отправку в СЦ ВОЗ рекомендуется осуществлять регулярно, от 2 до 4 раз в год, чтобы при отправке включать самые свежие клинические пробы/вирусные изоляты, и принимая во внимание график двух консультаций ВОЗ по выбору вакцинных штаммов в феврале и сентябре каждого года.**

- Если появляются новые антигенные варианты, важны пробы, взятые в начале сезона, поскольку они позволят своевременно получить необходимые реагенты для антигенной характеристики (особенно антисыворотку хорьков). Пробы, полученные до начала третьей недели января и до третьей недели августа, могут быть вовремя охарактеризованы соответственно к февральскому или сентябрьскому совещанию того же года.
- В такие периоды усиленного надзора, как период пандемии, пробы, в соответствии с рекомендациями СЦ ВОЗ, должны отправляться чаще.
- Тем НЦГ, у которых есть возможность использовать только метод ОТ-ПЦР, рекомендуется отбирать репрезентативные клинические пробы в соответствии с описанными выше критериями и направлять в СЦ ВОЗ.

**Хранение и транспортировка образцов**

- Обеспечить, чтобы пробы хранились при комнатной температуре/температуре холодильника (4°C) в течение минимального времени
- Подготовить аликвотные пробы для предотвращения многократных циклов замораживания/размораживания (которые могут привести к потере 1 log инфективности [вариабельности вируса] и, следовательно, потере целостности РНК в каждом цикле).
- Обеспечить заморозку пробы при температуре -70/80 °С, но не при -20 °С.
- С целью предотвращения плохой герметизации пробирок с образцами использовать соответствующие криососуды для хранения проб и транспортировки на сухом льду.
- Желательно хранить определенное число исходных клинических образцов, давших положительный результат при тестировании на грипп, в течение по крайней мере 2 лет при температуре -70/80 °С, но это зависит от национального законодательства и не является обязательным. Решающим лимитирующим фактором при хранении проб также является вместимость фризера.

Дополнительные рекомендации по хранению и транспортировке можно найти по указанным ниже ссылкам:

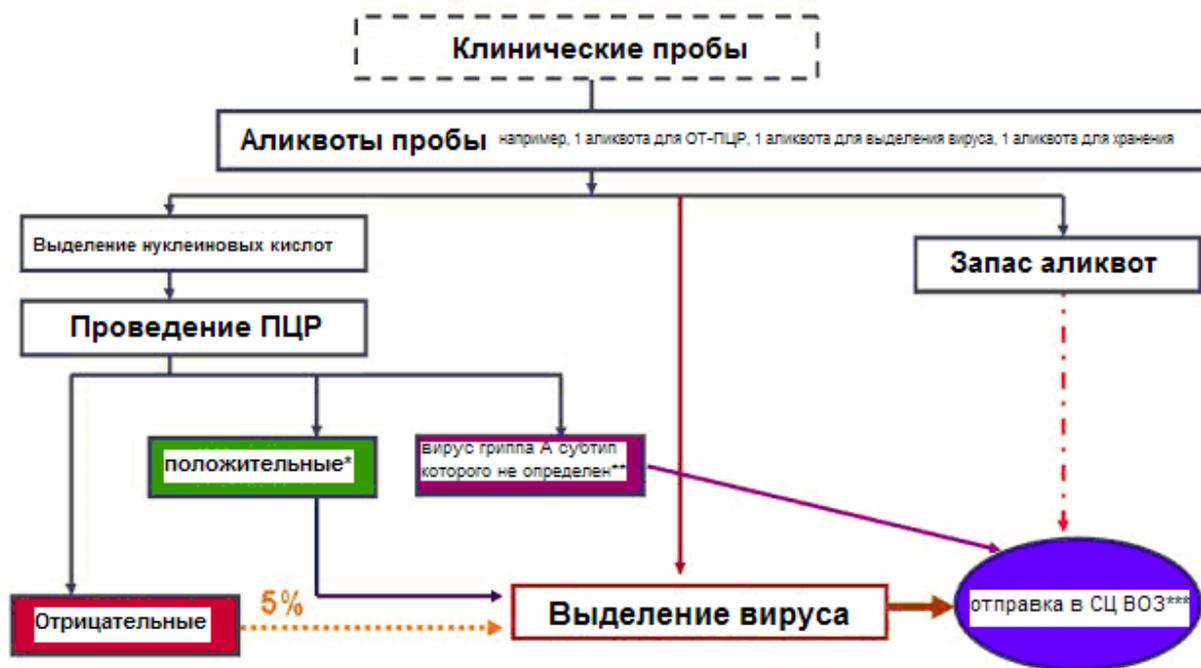
[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/storage\\_transport/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/storage_transport/en/)

[http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_HSE\\_EPR\\_2008\\_10/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10/en/)

<http://www.who.int/csr/disease/influenza/FAQInfluenzaLogistics.pdf>

[http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_HSE\\_EPR\\_2008\\_10/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10/en/index.html)

**Рисунок 1. Отбор проб для выделения вирусов и их отправки НЦГ в СЦ ВОЗ**



- \*Отбор положительных проб в соответствии с указанными в документе критериями
- \*\*Пробы, содержащие вирус гриппа А, субтип которого не был определен, должны отправляться в СЦ ВОЗ в срочном порядке

- \*\*\*Отбор изолятов в соответствии с указанными в документе критериями