



Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научно-исследовательский институт ГРИППА им. А.А. Смородинцева
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рекомендации по совершенствованию выделения и идентификации вирусов гриппа в клеточных культурах. Что делать если вирус не удастся идентифицировать в РТГА?

Ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России к.м.н. Коновалова Н.И.

Рабочее совещание по вопросам эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ
со специалистами территориальных органов и подведомственных организаций
Роспотребнадзора. Санкт-Петербург, 22-23 октября 2019 г.

Необходимость выделения вирусов гриппа

- ❑ Выделение вирусов гриппа является «золотым стандартом» в изучении гриппозной инфекции.**
- ❑ Выделение вирусов, анализ их антигенной и генетической изменчивости является критически важным для понимания эволюции и путей глобального распространения вирусов гриппа.**
- ❑ Обмен информацией и новыми вирусами гриппа является важнейшим звеном в обеспечении своевременного реагирования и выбора штаммов для производства современных гриппозных вакцин и диагностических препаратов**
- ❑ Быстрое определение риска развития пандемии на основе выявления новых, потенциально опасных возбудителей гриппа человека является важнейшим элементом дальнейшего усиления надзора за гриппом**
- ❑ Стандартизованная и координированная деятельность по надзору и контролю за гриппом является ключом к снижению заболеваемости и смертности от гриппа, необходима в случае развития новой пандемии**

СБОР КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Непременным условием успешного выделения вирусов гриппа является **ПРАВИЛЬНЫЙ сбор клинических материалов и их своевременная доставка в лабораторию.**

□ Для вирусывыделения наиболее часто используют отделяемое из носа, взятое в первые дни болезни (1-5 дней)

□ При более позднем обследовании можно использовать трахеальные аспираты и бронхолегочный лаваж.

□ Секционные материалы.

Для выделения вирусов гриппа используют фрагменты легких, бронхов, трахеи, головного мозга.

Транспортная среда

- **Самой важной на данном этапе является транспортная среда. От ее состава и качества полностью зависит сохранность вируса**
- **Транспортную среду можно приготовить самостоятельно или использовать готовые коммерческие транспортные среды**

Транспортная среда



UTM-330C,
Coran,
Италия

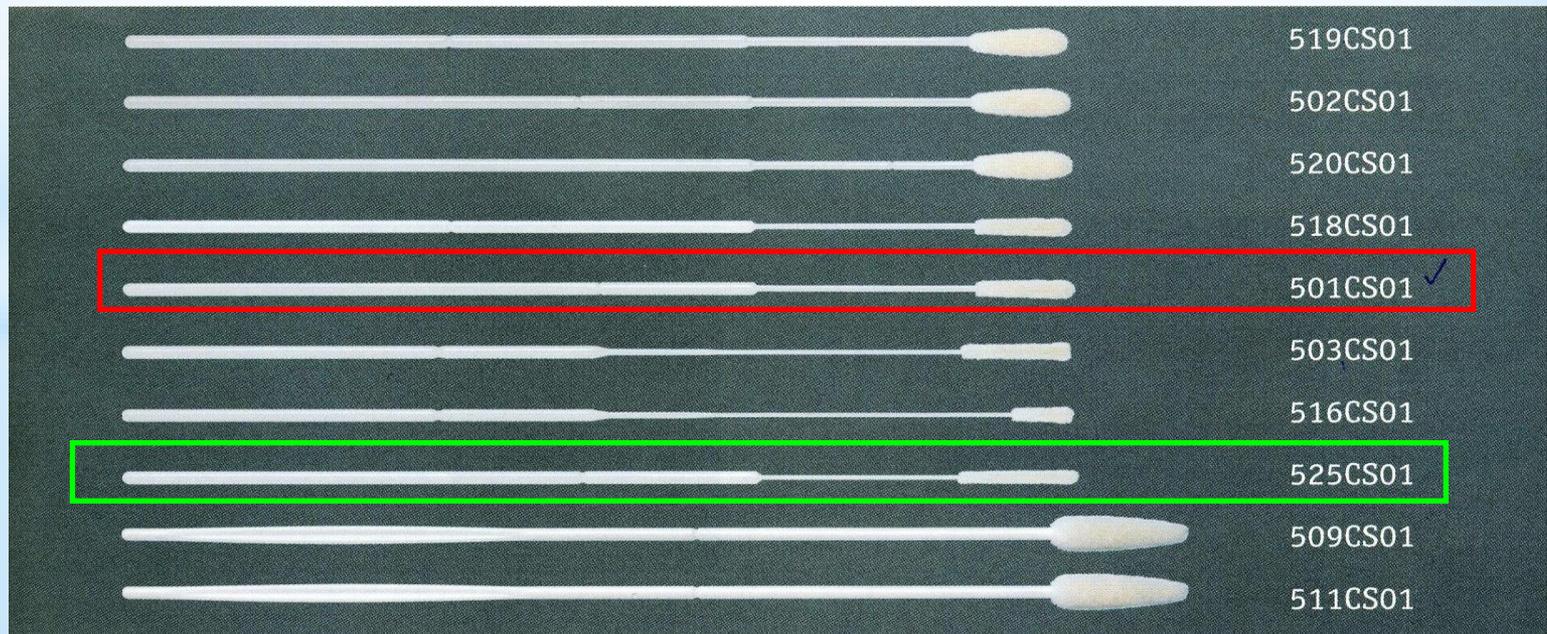
Преимущества:

- **Универсальность.** Собранный материал может быть использован для различных видов лабораторной диагностики (ПЦР, ИФА, ИФ, вирусовыделения и т.д.)
- **Гарантирована сохранность клеток в образце минимум 24 часа (до 72 ч!) при комнатной температуре. Длительное хранение при +4°C и низкотемпературном замораживании**
- **Удобство использования.** Пробирка с коническим дном пригодна для центрифугирования. Стеклообразные шарики на дне пробирки способствуют успешному освобождению микроорганизмов с поверхности инфицированных клеток

К 200 мл среды 199 или альфа MEM добавляют 13,5 мл. 7,5% раствора бычьего альбумина, 5 мл 1М HEPES- буфера и гентамицин (20 мг). После перемешивания среду стерильно разливают по 2 мл в 100 пробирок и хранят до использования при + 4°C.

Тампоны для взятия мазков

- ❑ Для взятия мазков используются ватные тампоны, изготовленные самостоятельно, либо тампоны коммерческого производства.
- ❑ Существуют разнообразные велюр-тампоны для забора материала.
- ❑ Существенным недостатком ватного тампона является его низкая способность высвобождать собранный материал в среду и ограниченный срок хранения.



Хранение и транспортировка клинических образцов

Клиническое отделение



лаборатория

- Образец доставляется в течении 6-8 часов - +4°C**
- Более 24 часов – ЗАМОРОЗИТЬ (-20°C)**
- Транспортировка: не допускать размораживания**
- Секционные материалы – при хранении свыше 3 часов – ЗАМОРОЗИТЬ.**

лаборатория



Референс-центр

- в замороженном состоянии**
- в герметично закрытых пластиковых пробирках**
- в соответствии с принципами 3-ой упаковки**
- на сухом льду**
- экспресс-почтой**
- Секционные материалы (кусочки тканей и органов) отправляют в сухом , замороженном виде, без добавления сред и др. жидкостей.**

Подведем итоги:

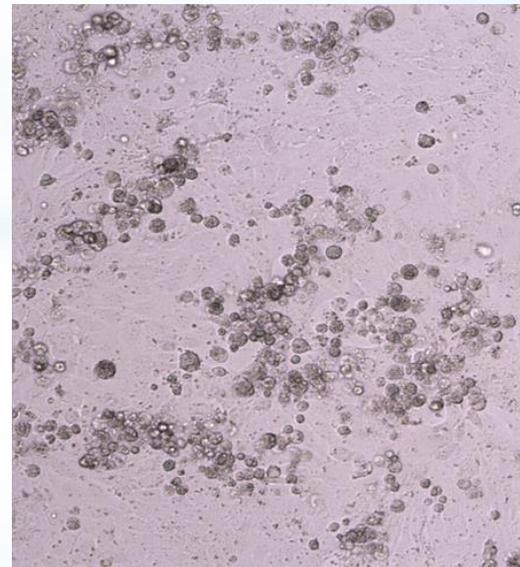
- Качественная транспортная среда**
- Правильно подобранные тампоны**
- Своевременный отбор проб**
- Персонал, обученный брать пробы**
- Правильная транспортировка образцов**
- Правильное хранение образцов**

Критерии отбора проб для выделения вирусов гриппа

1. ПЦР – положительные пробы. Для вирусов гриппа **A – Ct ≤ 25**, для вирусов гриппа **B - Ct ≤ 30**
2. ПЦР положительные пробы, взятые в межэпидемический период (**20- 40 недели**).
3. Первые ПЦР – положительные пробы и вирусы, выделенные в начале сезона.
4. Секционные материалы, пробы, взятые от тяжелых больных, с необычной клинической симптоматикой.
5. ПЦР – положительные пробы на тип (подтип) вируса гриппа, не являющийся доминирующим в этом эпидсезоне.

Клеточная линия MDCK

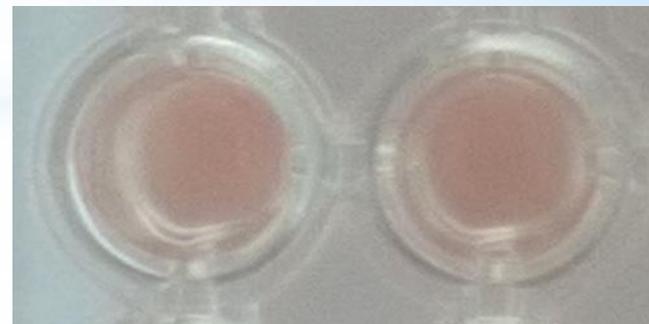
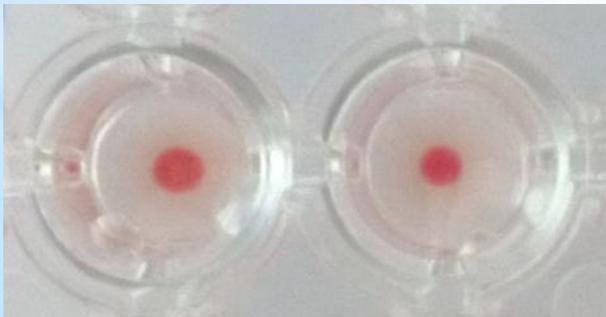
- ❑ Легкая в работе клеточная линия с высокой устойчивостью к трипсину (вплоть до 10мкг/мл)
- ❑ Поддерживает репродукцию большинства вирусов гриппа человека подтипов A(H1N1), A(H1N1)pdm09, B и многих вирусов A(H3N2)
- ❑ РЕКОМЕНДОВАНА СЦ ВОЗ в Лондоне для выделения вирусов гриппа



Проблемы при выделении вирусов на клеточной культуре MDCK

НИЗКИЕ ТИТРЫ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ или ЕЕ ОТСУТСТВИЕ

- ❑ При выделении вирусов гриппа титр в реакции гемагглютинации (ГА) есть только в цельной пробе или равен 1:2
- ❑ В ходе выделения вирусов гриппа в пробе видно отчетливое ЦПД, однако РГА отрицательна
- ❑ Проба положительна по ПЦР на грипп, однако выделить вирус гриппа не удастся



Низкие титры гемагглютинации или их отсутствие: пути решения

низкие титры ГА

- провести серию заражений с использованием вирусных разведений (обычно 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})

отсутствие титров ГА

- провести серию заражений с использованием вирусных разведений (обычно 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})
- если не приводит к увеличению титров, охарактеризовать антигенно РГА-независимым методом (РН)

невозможность выделить вирус

- значение C_t в real-time PCR (если > 30 , то вероятность выделения низкая)
- если < 10 , можно попробовать развести исходную пробу

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ВИРУСОВ ГРИППА ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK

- ❑ НЕ характерно (на сегодняшний день) для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа B**
- ❑ Очень характерно для вирусов гриппа A(H3N2): выделение на культуре клеток MDCK приводит к селекции штаммов с мутациями в нейраминидазе. Такие штаммы обладают способностью агглютинировать эритроциты за счет активности нейраминидазы. Наблюдается ложноположительная агглютинация, что искажает результаты РГА и РТГА.**

Пути решения: клеточная линия MDCK-Siat1

- **Вариант клеточной линии MDCK, трансфецированный плазмидой, содержащей человеческую 2,6-сиалилтрансферазу. Эта клеточная линия экспрессирует на своей поверхности в 2 раза больше рецепторов α -2,6-Gal типа, чем обычная MDCK**
- **Клеточная линия создана М. Матросовичем в лаборатории в Марбурге**
- **Для поддержания экспрессии плазмиды в среду для культивирования MDCK-Siat1 необходимо добавлять селективный антибиотик генитицин G418 (1мг/мл)**



<https://www.uni-marburg.de/fb20/virologie/forschung/matrosovichfold>



Пути решения: клеточная линия MDCK-Siat1

- ❑ Вирусы гриппа A(H3N2), выделенные на MDCK-Siat1, имеют более высокие титры и реже содержат мутации в NA, приводящие к неспецифическому связыванию с эритроцитами
- ❑ Эти вирусы проще анализировать в РТГА
- ❑ **ОДНАКО:** клетки MDCK-Siat1 более капризны в работе
- ❑ Труднее детектировать ЦПД

Пути решения: клеточная линия MDCK-Siat1

Тогда может быть выделять все вирусы на MDCK-Siat1?

- К сожалению – НЕТ**
- Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09, выделенные на MDCK-Siat1, имеют более высокие титры ГА, но при этом часто приобретают мутации в позициях 153-157 HA1, что приводит к ложным результатам в РТГА**
- Вирусы гриппа В можно выделять на MDCK-Siat1, но не целесообразно с экономической точки зрения**

Пути решения: клеточная линия MDCK-Siat1

ЧТО ДЕЛАТЬ ЕСЛИ НЕТ ВОЗМОЖНОСТИ ВЕСТИ ЛИНИЮ MDCK-Siat1?

- 1) Ставить ПЦР в реальном времени на грипп для образцов и субтипировать грипп А**
- 2) Выделять вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 и вирусы гриппа В на культуре MDCK**
- 3) Пробы, положительные на НЗ, отправлять в Референс-центр для правильного выделения и характеристики этих вирусов**

Подведем итоги:

- Для выделения вирусов гриппа брать только ПЦР – положительные пробы
- Пользоваться критериями отбора
- Соблюдать соответствующие процедуры при работе по выделению вирусов гриппа
- Использовать для выделения вирусов гриппа А(Н1N1) и В клеточную линию MDCK
- Для выделения вирусов гриппа А(Н3N2) должна использоваться клеточная линия MDCK-Siat1
- При невозможности выделять вирусы гриппа на MDCK-Siat1 отсылать ПЦР положительные пробы на грипп А(Н3N2) в Референс-центр

Идентификация вирусов гриппа



Диагностический набор ВОЗ

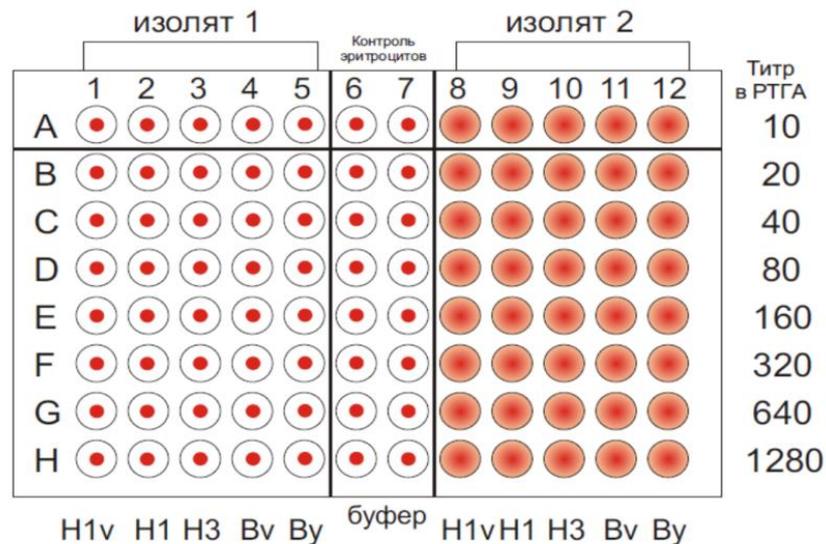
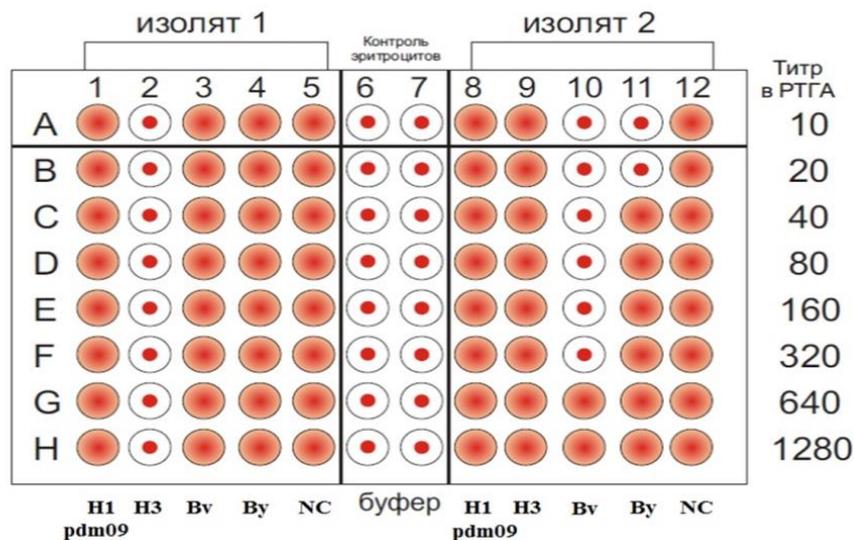
Современные штаммы, к которым получены диагностические сыворотки:

- A/Brisbane/02/18 A(H1N1)pdm09**
- A/Kansas/14/17 A(H3N2)**
- B/Colorado/06/17 (vic)**
- B/Phuket/3073/13 (yam)**



Диагностический набор ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов»

Что делать если вирус не удастся идентифицировать в РТГА?



Что делать если вирус не удастся идентифицировать в РТГА?

ПРИЧИНЫ	ЧТО ДЕЛАТЬ
Процедурная ошибка	Четко следовать операционным процедурам
В реакцию взяты старые сыворотки	Использовать диагностические сыворотки с проверенным гомологичным титром и полученные к современным штаммам
Появление кардинально нового в антигенном и генетическом отношении штамма	Срочно высылать в РЦ по гриппу
Вирусы гриппа А(Н3N2), проявляющие «ложную» агглютинацию	В буфер, используемый для РТГА, добавить 20 нМ озельтамивир карбоксилат (ингибитор NA)
Низкий титр в РГА	Постановка РН

Хранение вирусов гриппа и проб

- ❑ Выделенный вирус хранится при +4°C около 3-5 сут без потери инфекционной активности.
- ❑ При необходимости более длительного хранения вирус-содержащие пробы/материалы необходимо замораживать: при хранении на -20°C вирус сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев, при хранении в условиях низкотемпературной заморозки -70°C и ниже – от 6 месяцев и более. *ВОЗ рекомендует хранение проб от больных ТОЛЬКО в условиях низкотемпературной заморозки!*
- ❑ Многократное размораживание/замораживание приводит к резкому снижению инфекционной активности вирусов

Отправка вирусов гриппа и ПЦР положительных проб в Референс- Центры

- ❑ Для выделения вируса гриппа используются пробы от больных, находящиеся в транспортной среде.**
- ❑ Несоблюдение холодового режима при транспортировке приводит к снижению инфекционной способности вируса.**
- ❑ Совещание ВОЗ по составу противогриппозных вакцин проходит во второй половине февраля. Самые первые изоляты отправляются незамедлительно.**
- ❑ Посылки не должны содержать вирусы или пробы с датой забора 2-3 месячной давности.**
- ❑ Посылки, присланные в мае или июне и содержащие вирусы и пробы с датой забора в январе – марте, в работу не берутся.**

В помощь коллегам:

**Всемирная Организация
Здравоохранения**

- www.who.int

**Всемирная Организация
Здравоохранения**

- http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
- **Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**

**Центр по контролю и
профилактике
заболеваний (США)**

- www.cdc.gov

**ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.
Сморозинцева» Минздрава
России**

- www.influenza.spb.ru

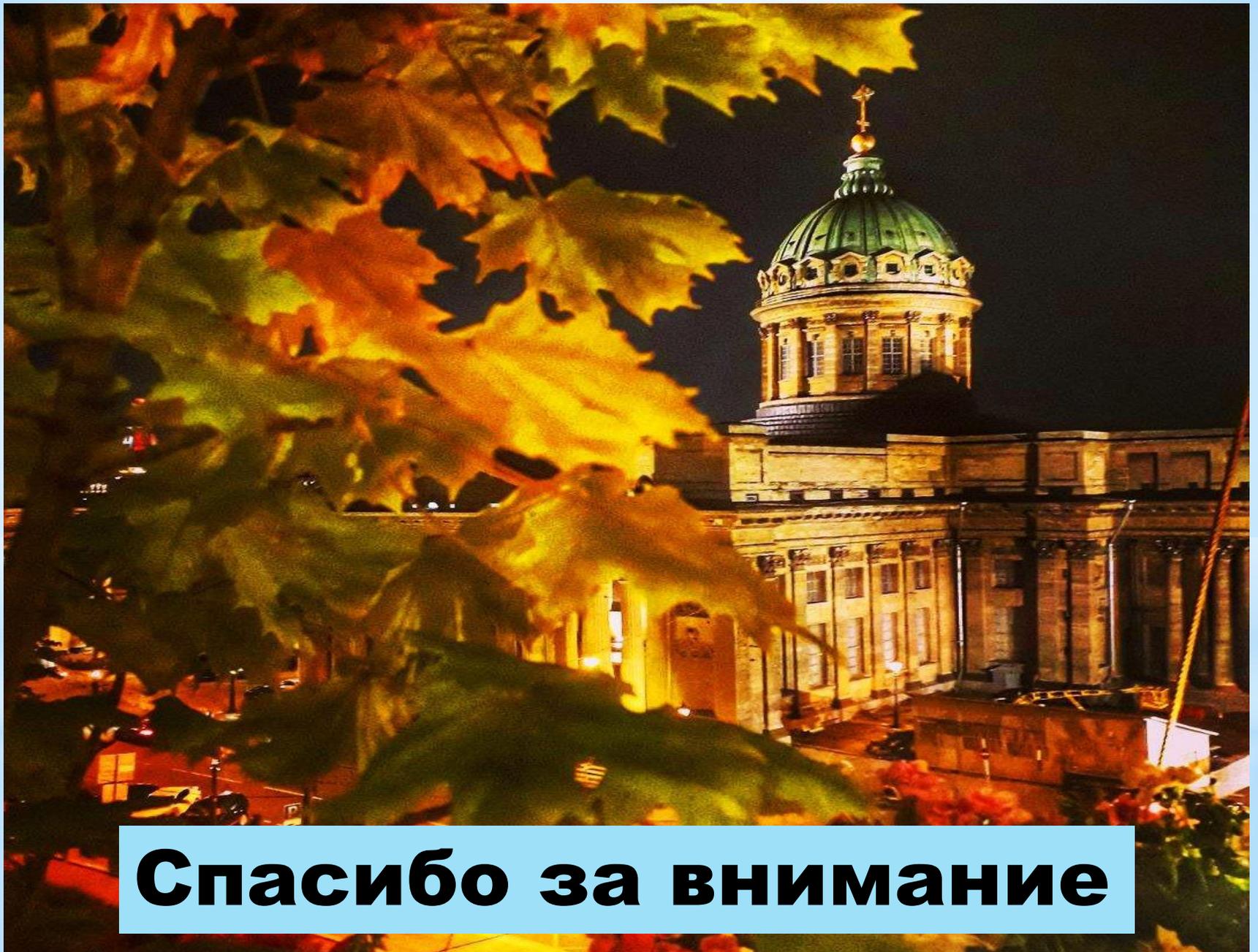
**ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.
Сморозинцева» Минздрава
России**

**НИИ вирусологии им
Д.И.Ивановского ФГБУ
«ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»**

- **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**
- **ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ СЕЗОННОГО И ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ И КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

**Федеральная служба по
надзору в сфере защиты
прав потребителей и
благополучия человека**

- www.rospotrebnadzor.ru



Спасибо за внимание