

СБОР АУТОПСИЙНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ГРИППОПОДОБНОМ ЗАБОЛЕВАНИИ

Взятие образцов

Успешность выявления респираторных вирусов зависит от сбора высококачественных образцов, их оперативной доставки в лабораторию и надлежащего хранения до лабораторного тестирования. Взятие биологических образцов для прямого выявления вирусных антигенов или нуклеиновых кислот и для изоляции вирусов на клеточных культурах следует проводить не позднее, чем в течение первых трех дней. Предпочтительно собирать образцы до начала противовирусной химиотерапии. Время взятия образцов (от начала болезни) должно быть записано в форме сбора данных.

Хотя информированное согласие пациента не считается необходимым условием для текущего эпиднадзора, каждому пациенту дается устное объяснение причины взятия образцов, а также информация о том, как образец будет использован.

Типы собираемых образцов

Для выявления вируса гриппа и других респираторных вирусов можно использовать следующие типы образцов из верхних дыхательных путей (ВДП):

- назальный мазок;
- мазок из зева;
- носоглоточный мазок;
- аспираты или смывы из носоглотки;
- назальный смыв.

Мазки, аспираты и смывы из носоглотки являются самыми лучшими образцами для изоляции вирусов и проведения ПЦР. Однако получение этих образцов может быть технически затруднительно и сопряжено с неприятными ощущениями для пациента. Приемлемой альтернативой является взятие назального мазка, а также мазка из зева с последующим их помещением в одну, общую пробирку с вирусной транспортной средой (ВТС). Назальный мазок позволяет выявлять вирусы сезонного гриппа, а мазок из зева – вирус сезонного гриппа и, потенциально, новые вирусы гриппа А, которые демонстрируют склонность к клеточным рецепторам нижних дыхательных путей.

До взятия каких-либо образцов следует указать на всех пробирках индивидуальный идентификационный номер пациента, дату взятия образца, тип образца в пробирке (например, назальный мазок, мазок из зева, др.).

Инструменты и материалы для взятия образцов

Инструменты и материалы для взятия респираторных образцов подробно описываются в разделе ниже; они должны находиться в достаточном количестве в дозорных точках, для взятия образцов у больных ТОРИ и ГПЗ/ОРИ. Ниже приведен их основной перечень:

- средства индивидуальной защиты (СИЗ);
- тампоны;
- шпатели для языка;
- пластиковые пробирки, например криопробирки с 2–3 мл ВТС, хранящиеся при температуре 4°C (поставляются из НЦГ);
- пробирки для взятия проб крови, спирт, марля, не обработанные гепарином иглы (эти материалы нужны только в случае взятия сыворотки);
- спирт и/или хлорсодержащий препарат для дезинфекции пробирок с образцами перед транспортировкой;
- упаковочный материал для транспортировки внутри страны.

Хранение и транспортировка

Успешное выделение вирусов из клинических образцов зависит от качества материала для инокуляции в клеточные культуры или куриные эмбрионы. Многие вирусы чувствительны к высыханию, неблагоприятной рН-среде и изменяющемуся осмотическому потенциалу.

Поэтому пробы сразу же после их взятия необходимо помещать в ВТС и хранить в ВТС при температуре 4°C до отправки из дозорной точки. В идеальном случае, образцы для прямого выявления вирусных антигенов иммунофлюоресцентным окрашиванием инфицированных клеток необходимо охладить и обработать в течение 1–2 часов. Максимальный срок хранения при температуре 4°C составляет 24 часа. Образцы для изоляции вирусов необходимо охлаждать сразу после взятия и инокулировать в чувствительные клеточные культуры в максимально короткие сроки. При невозможности обработать образцы в течение 48-72 часов их следует хранить в замороженном состоянии при –70°C или ниже. В идеальном случае все мазки из дыхательных путей, помещенные в ВТС, доставляют вместе с формами регистрации мазков в лабораторию в течение 24-48 часов с момента их взятия. Однако если это невозможно, их следует хранить в морозильной камере при температуре -70°C или в жидком азоте и размораживать перед обработкой.

Перед замораживанием при температуре -70°C для долгосрочного хранения каждый образец можно разделить на аликвоты для дополнительного тестирования, повторного тестирования или архивации. Количество циклов замораживания/размораживания должно быть минимальным, т.к. это может разрушить вирус. Не следует хранить образцы в бытовой морозильной камере (-20°C) с циклом замораживания/размораживания (“оттаивание”); пробу лучше держать на льду даже в течение целой недели, чем подвергать ее постоянному замораживанию и размораживанию.

Кровь можно оставить на ночь при комнатной температуре или инкубировать при 56°C в течение 30 минут, так чтобы она свернулась. Сыворотку следует переместить в новую пробирку серологической или автоматической пипеткой в боксе биобезопасности и затем либо хранить при температуре 4°C не дольше одной недели, либо незамедлительно поместить в условия длительного хранения при -20°C .

Образцы должны быть упакованы в три слоя упаковочного материала, что отвечает требованиям к упаковке Р650 для инфекционных веществ UN3373 категории В, для защиты от повреждения во время транспортировки и обеспечения безопасности персонала, ответственного за транспортировку и получение/распаковку образцов. Первый слой из трехслойной системы упаковки Р650 представляет собой саму водонепроницаемую пробирку для образца, второй слой – водонепроницаемый контейнер (это может быть пластиковый пакет на молнии или контейнер из жесткого пластика) и третий слой – жесткая внешняя упаковка (картонная коробка, коробка из полистирола или сумка-холодильник). Между пробирками и вторым водонепроницаемым слоем должен размещаться абсорбирующий материал, достаточный для того, чтобы абсорбировать весь объем образцов в случае разгерметизации пробирки. В контейнерах для сбора образцов не должно содержаться больше, чем 500 мл жидкости.

Все образцы должны транспортироваться в охлажденном или замороженном виде, поэтому необходимо включать в упаковку хладоэлементы или сухой лед.

Методика взятия образцов из дыхательных путей

Необходимые материалы:

1. Средства индивидуальной защиты (СИЗ):

2. Тампоны:

– используйте только стерильные тампоны из дакрона или вискозы на пластиковом стержне или универсальные зонды для взятия мазков.

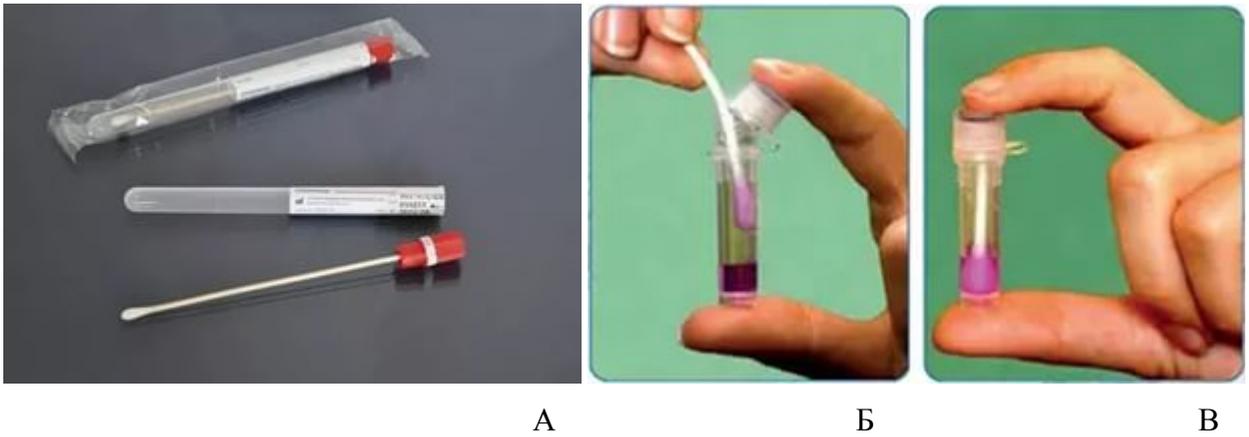


Рисунок 1. А-тампон для взятия мазка, Б,В-манипуляции после взятия мазка

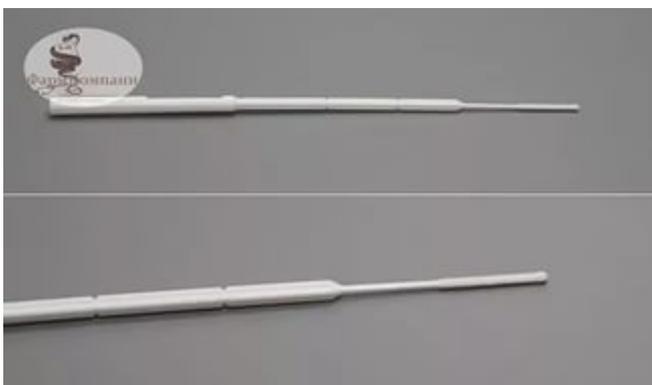


Рисунок 2. Универсальные зонды для взятия мазков

– тампоны из альгината кальция или ваты, а также тампоны с деревянными стержнями могут содержать вещества, которые инактивируют некоторые вирусы и замедляют реакцию ПЦР, поэтому их можно использовать только при отсутствии дакроновых или вязкозных тампонов.

3. Шпатель для языка (для взятия мазков из зева)



Рисунок 3. Шпатель для языка (для взятия мазков из зева)

4. Пластиковые пробирки:

- например, криопробирки, рассчитанные на 1,5-2 мл ВТС
- должны выдерживать температуру в диапазоне от -70°C до -180°C (жидкий азот).

5. Вирусные транспортные среды (ВТС)

- пластиковые пробирки, содержащие 1,5-2 мл ВТС, приобретаются готовыми или приготавливаются силами национальной лаборатории по гриппу.
- они должны содержаться в достаточном количестве в больницах и амбулаторных учреждениях дозорного эпиднадзора для взятия образцов соответственно в случаях ТОРИ и ГПЗ/ОРИ.
- вирусные транспортные среды можно приобрести через коммерческих поставщиков, например: питательная среда для культур клеток (до 400 мл) с антибиотиками: гентамицина сульфата (500 мкг/мл) и амфотерицина В (5мкг/мл).

6. Нестираемый, спиртостойкий маркер.

Взятие мазков из носа и из зева:

Необходимо соблюдать стандартные меры предосторожности (т.е. гигиену рук и индивидуальную защиту). При взятии мазков из носа или зева нужно правильно держать тампон. Его зажимают между большим, указательным и средним пальцами так, чтобы ось тампона проходила между большим и указательным пальцами (как будто держите карандаш) (рис.4). Тыльный конец тампона не должен упираться в ладонь (рис.5). При правильном положении тампона исключается риск травмировать пациента, если он сделает произвольное движение при взятии мазка, поскольку стержень тампона скользнет в безопасном направлении (рис. 6 – положение пациента изображено открытой ладонью). При неправильном удерживании тампона его движение по оси ограничено и пациент может пораниться (рис. 7). Кроме того, правильное удерживание тампона позволяет осуществлять гораздо более точные движения.



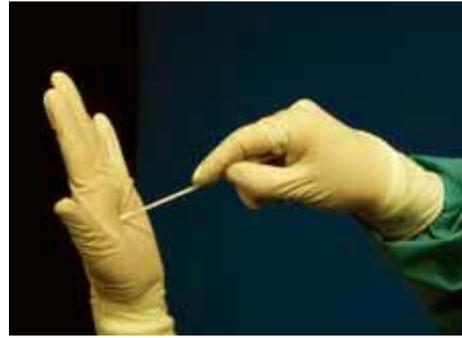
Рисунок 4. Тампон взят правильно



Рисунок 5. Тампон взят неправильно



**Рисунок 6. Правильно взятый тампон
скользит по оси и не может
травмировать пациента**



**Рисунок 7. Неправильно взятый тампон
может травмировать пациента**

Взятие мазка с задней стенки глотки (мазок из зева):

1. Возьмите тампон и плавным движением возьмите мазок с задней стенки глотки и дужек миндалин (см. рисунок 8)

- Попросите пациента сказать “а-а-а”, чтобы поднялся небный язычок.
- Прижмите язык с помощью шпателя (Эта процедура может вызвать рвотный рефлекс).
- Избегайте взятия мазков с мягкого неба и не касайтесь языка кончиком тампона.

2. Сразу поместите тампон в стерильную пробирку с ВТС.

3. Отломите стержень тампона возле наконечника и закройте пробирку крышкой. Обычно пластиковые стержни тампонов сделаны так, что их можно легко разломить в определенном участке, чтобы вставить в пробирку с образцом. Иногда они сделаны из хрупкого пластика, который легко ломается в любом месте. Если стержень не удастся сломать, чтобы остался лишь короткий участок, который может поместиться в небольшую пробирку (криопробирку), его придется разрезать. Для этого:

- разрежьте стержень ножницами так, чтобы не повредить наконечник;
- подождите, пока наконечник погрузится в ВТС и закройте пробирку крышкой. (Не допускайте попадания в пробирку частиц упаковочного материала)
- простерилизуйте режущий край ножниц на огне (например, используя спиртовую горелку, газовую горелку Бунзена и другой подходящий источник).
- дайте ножницам остынуть перед последующим использованием.

В случаях ТОРИ или при подозрении на инфекцию новым вирусом гриппа, брать два мазка – из зева и из носа, в одну пробирку.

4. Наклейте на пробирку с образцом этикетку (крышку не следует маркировать, т.к. она может быть заменена во время обработки) с указанием индивидуального идентификационного номера.



Рисунок 8. Взятие мазка из зева

Взятие переднего назального мазка:

Используйте такой же тип тампона на жестком стержне, что и для взятия мазка из зева. Введите наконечник тампона в полость носа параллельно небу за пределы преддверия (у взрослых – приблизительно на глубину 2–3 см) и сделайте несколько осторожных вращательных движений, чтобы собрать носовое отделяемое со слизистой оболочки передних отделов носовой раковины и перегородки (рис. 9). Повторите процедуру на другой ноздре тем же тампоном. Сразу поместите тампон в пробирку с ВТС, где уже находится мазок из зева. Отломите стержень тампона возле наконечника и плотно закройте крышку (см. выше).

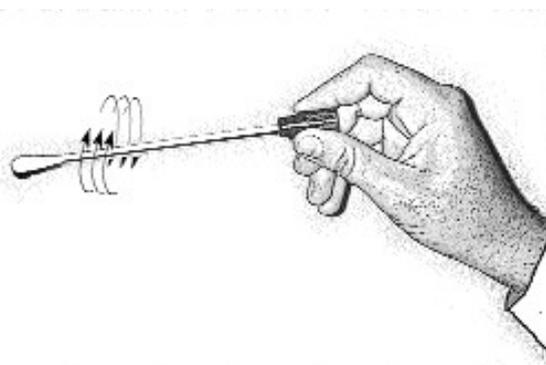


Рисунок 9. Взятие мазка из носа

При подозрении на высокопатогенный грипп (А/Н5N1, А/Н7N9) образцы для лабораторной диагностики необходимо брать в следующей последовательности:

- носоглоточный аспират
- сыворотка крови острого периода
- сыворотка крови периода выздоровления.

Носоглоточный аспират

Аспирировать носоглоточные секреты через катетер, соединенный с контейнером-сборником для слизи и источником вакуума. Катетер вводится в ноздрю параллельно небу. Привести в действие источник вакуума и медленно вынуть катетер вращательными движениями. Слизь из другой ноздри берется тем же катетером аналогичным способом. После взятия слизи из обеих ноздрей катетер заливается 3 мл транспортной среды.

Дополнительные рекомендации для проведения качественного забора клинических образцов

1. Брать в оптимальные сроки: 1-3 суток от начала клинических проявлений. У детей – до 5 суток.
2. Ватки обязательно оставлять в пробирках объемом 1,5-2 мл с транспортной средой. Пользоваться только средой, рекомендованной ВОЗ: питательная среда для культур клеток с антибиотиками (500 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл амфотерицина В).
3. Наиболее эффективно использовать универсальные зонды для взятия мазков (см. рис. 2).
4. При тяжелом течении заболевания мазки из зева и носа брать ежедневно (до 5 суток).
5. Все пробы из одного ЦГиЭ субъекта РФ должны иметь сквозную нумерацию (т.е. номера не должны повторяться, по крайней мере, в течение одного эпидемического сезона).
6. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» следует отправлять только положительные на РНК вируса гриппа клинические образцы при летальном исходе заболевания и при подозрении на высокопатогенный вирус гриппа А/Н5N1 или А/Н7N9.

Рекомендации для проведения качественного забора аутопсийных образцов

1. Из пораженных участков трахеи и бронхов (длиной около 1 см) и легкого (объемом около 1 см³) приготовить 10%-ный гомогенат в физиологическом растворе, или фосфатно-солевом буфере, или питательной среде для культур клеток, с антибиотиками гентамицина сульфата (500 мкг/мл) и амфотерицина В (5мкг/мл).
2. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» следует отправлять только положительные на РНК вируса гриппа (по данным ПЦР-анализа) аутопсийные образцы или готовый 10%-ный гомогенат.

Форма сопроводительного документа при сборе образца при тяжелом заболевании гриппом, включая заболевания с летальным исходом

ВИД КЛИНИЧЕСКОГО ОБРАЗЦА (прижизненные мазки из зева и носа в случае летального исхода, гомогенат пораженных органов). Нужно подчеркнуть!						
Первичный диагноз:	Дата начала заболевания:	Госпитализация (да/нет)	Дата смерти:	Причина смерти:	Дата взятия образца:	Результат ПЦР дата:
СОПУТСТВУЮЩИЕ ХРОНИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:						
ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ ПАЦИЕНТА						
Уникальный идентификационный номер:				Пол:		
				Муж <input type="checkbox"/>		
				Жен <input type="checkbox"/>		
Дата рождения:			или Возраст: _____ лет _____ месяцев (1-12)			
ВАКЦИНЫ И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ						
Принимались ли противовирусные препараты против гриппа в течение последних 14 дней?		<input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Да (пациент) <input type="checkbox"/> Да (член семьи)				
Если да, укажите наименование препарата		<input type="checkbox"/> Неизвестно				
Была ли проведена вакцинация против гриппа в текущем сезоне?		<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет				
Если да, укажите наименование вакцины		<input type="checkbox"/> Неизвестно				
ИНФОРМАЦИЯ ПО ОТЧЕТУ						
Наименование и адрес ФБУЗ «ЦГи Э» отправителя:						
ФИО специалиста (телефон, e-mail) заполнившего форму:						
Подпись:						
Дата отправки материала:						
<i>Отправьте, пожалуйста, один экземпляр этой формы в лабораторию вместе с образцом для исследования в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Оригинал формы остается в Центре гигиены и эпидемиологии, осуществляющем эпиднадзор</i>						