

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей
и благополучия человека
Г.Г.Онищенко
18 апреля 2006 года
№ 0100/4430-06-34

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ И КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

АННОТАЦИЯ

Метод выделения вирусов гриппа человека и животных, включая высоко патогенные штаммы вирусов гриппа птиц, в клеточных культурах является высоко чувствительным тестом при использовании клинических образцов высокого качества.

Предназначен для вирусологов, микробиологов, эпидемиологов. Его использование позволяет, в первую очередь, значительно повысить эффективность изоляции эпидемических штаммов из клинических материалов (смывы, аспираты, секционный материал), а также расширить число выделяемых возбудителей с составлением более полной картины о природе вирусных популяций, циркулирующих среди людей, что необходимо для более полного понимания закономерностей распространения и эволюции возбудителей, прогнозирования эпидемий, а также быстрого распознавания появления нового пандемического вируса гриппа типа А.

Методические рекомендации подготовлены проф., д.м.н.А.А.Сомининой и к.м.н.Е.И.Бурцевой (при участии специалистов ГУ НИИ гриппа РАМН Т.Г.Лобовой, Н.И.Коноваловой, Т.М.Гудковой, к.б.н.О.М.Литвиновой, а также специалистов ГУ НИИ вирусологии РАМН проф., д.м.н.А.Н.Слепушкина и д.б.н.В.Т.Ивановой).

При подготовке настоящих Методических рекомендаций были использованы инструктивные материалы, разработанные WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza (CDC, Atlanta, USA), за предоставление которых авторы выражают свою искреннюю благодарность.

1. ВВЕДЕНИЕ

Важным преимуществом метода изоляции перед другими тестами является получение инфекционного вируса, который может быть далее использован для антигенного и генетического анализа, а также выяснения таких важнейших свойств возбудителя, как чувствительность к химиопрепаратам, неспецифическим ингибиторам, тропизм к разным системам хозяина и др. Ряд факторов (трудоемкость, необходимость использования высоко чувствительных клеточных линий, длительность анализа, высокая стоимость) ограничивает использование метода выделения вирусов гриппа в качестве диагностического теста. В прошлые годы для этих целей, как правило, использовали куриные эмбрионы, однако изменение тропизма современных вирусов с резким снижением частоты изоляции в них возбудителей гриппа обусловило необходимость широкого лабораторного применения клеточных культур. Одной из таких линий, которая была рекомендована экспертами ВОЗ, является перевиваемая культура клеток, полученная из почек собаки породы спаниель - MDCK. Вместе с тем, поскольку кандидаты в вакцинные штаммы должны быть изолированы на куриных эмбрионах, лабораториям, располагающим такими возможностями рекомендуется использовать для выделения вирусов гриппа обе системы. В любом случае исходные клинические материалы необходимо хранить до начала следующего эпидемического сезона при низкой температуре (-70°C) для обеспечения возможностей выделения наиболее перспективных в антигенном отношении штаммов в куриных эмбрионах в специализированных лабораториях научно-исследовательских институтов.

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

2.1. ФОРМУЛА МЕТОДА

Суть метода заключается в заражении сформированного монослоя клеток MDCK, характеризующихся наиболее высокой чувствительностью к современным вирусам гриппа, клиническими материалами, полученными от больных гриппоподобными заболеваниями. Инфицированные культуры инкубируют в термостате при 37°C, контролируя под микроскопом состояние монослоя, а также периодически определяют наличие гемагглютининов в культуральной среде. При развитии специфического цитопатического действия, проявляющегося в разрушении монослоя, культуральную жидкость используют для типирования вирусного изолята в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА), а также осуществляют последующий пассаж в целях накопления вируса, который затем направляют в холодовом режиме в соответствующие Центры по гриппу (Федеральный центр по гриппу и ОРВИ на базе ГУ НИИ гриппа РАМН или Центр экологии и эпидемиологии гриппа на базе ГУ Института вирусологии им.Д.И.Ивановского РАМН) для последующей идентификации и изучения особенностей антигенной структуры возбудителя.

Непременным условием успешного выделения вирусов являются правильный сбор клинических материалов, соответствующий состав транспортных сред, соблюдение условий доставки материалов в лабораторию (на холоду и в кратчайшие сроки) и безотлагательное заражение заранее подготовленных клеточных культур.

2.2. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Показанием к применению метода является рост гриппа и острых респираторно-вирусных заболеваний, регистрация вспышек гриппа среди людей, а также среди птиц, обследование контактных лиц из групп риска в случае появления у них симптомов гриппа. Противопоказания к использованию метода отсутствуют.

2.3. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Для выполнения работ по изоляции вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK необходимо иметь 2 набора реагентов, один из которых предназначен для субкультивирования клеток, а второй - непосредственно для работ по выделению вирусов из материалов от больных.

2.3.1. Перечень материалов, необходимых для субкультивирования клеток MDCK (из расчета на 10 пассажей):

Клеточная культура MDCK (7 млн.) в монослое, выращенном во флаконе Т 25*	- 1 шт
* - как указано выше	
Модифицированная среда Игла D-MEM, "GIBCO BRL", (США), кат. N 11965-092, производитель - "Биолот" (Санкт-Петербург) или среда Игла MEM с двойным набором аминокислот (Предприятие при ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва) ФС 42-94 ВС-88	- 240 мл
Альбумин бычий, фракция V, 7,5% раствор), "Sigma" (США), кат. N A8412 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15260-011	- 7,0 мл
HEPES - буфер 1М раствор, pH 7,2, "Sigma" (США), кат. N H0887 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15630-023	- 7,0 мл
Эмбриональная сыворотка КРС, "Sigma" (США), кат. N F3018 или Hy Clone Lab.Inc, кат. N A-1111-L	- 12 мл
Раствор для отторжения клеточной культуры (0,05% трипсин в смеси с 0,53 мМ раствором EDTA .4Na) "GIBCO BRL", США, кат. N 25300-054 или раствор химопсина (0,125 мг/мл) на 0,53 мМ растворе версена	- 100 мл

Пенициллин, ОАО "Красфарма", ГФХ ст.95	- 500 тыс.ед.
Стрептомицин, ОАО "Биохимик", ГФХ стр.636	- 0,5 г.
Флакон для культивирования клеток Т 25, "Sarstedt" (Германия), кат. N 7245082	- 10 шт

Примечание: набор может храниться при +4°C в течение 6 месяцев (за исключением клеточной культуры MDCK, которая подлежит непрерывному субкультивированию, но не более 10-20 пассажей, после чего ее чувствительность понижается, что определяет необходимость ее повторного восстановления из криобанка). Культура получена из CDC, Atlanta (USA), хранится в Коллекциях клеточных культур при ГУ НИИ гриппа РАМН и ГУ Институт вирусологии им Д.И.Ивановского РАМН.

2.3.2. Перечень материалов, необходимых для изоляции вирусов гриппа (рассчитан на проведение 100 анализов):

А. Транспортная среда (для получения и доставки клинических материалов):

Среда 199 на растворе Хенкса, "Биолот" (Санкт-Петербург) или Предприятие при ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов (Москва)	- 200 мл
Альбумин бычий, V фракция (7,5% раствор), "Sigma" (США), кат. N A8412 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15260-011	-13,5 мл
HEPES - буфер 1М раствор, pH 7,2, "Sigma"(CLUA), кат. N H0887 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15630-023	- 5 мл
Гентамицин "ХИНОИН", Венгрия, кат. N ATC: JOIGB03	- 1 амп.
Тампоны стерильные для взятия мазков	- 100 шт

Б. Растворы для культивирования клеток (10 пассажей) и выделения вирусов (100 анализов):

Среда Игла в модификации Дальбекко (DMEM) или среда Игла MEM с двойным набором аминокислот *	- 450 мл
* - как указано выше	
Эмбриональная сыворотка КРС*	- 12,5 мл
* - как указано выше	
Альбумин бычий, фракция V, 7,5% раствор), "Sigma" (США), кат. N A8412 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15260-011	- 12,5 мл
Трипсин ТРСК, тип XIII, "Sigma", США, кат. N T1426 (расфасован по 200 мкг/амп.)	- 2 ампулы
Раствор для отторжения клеточной культуры*	- 100 мл
* - как указано выше	
HEPES - буфер 1М раствор, pH 7,2, "Sigma"(CUIA), кат. N H0887 или "GIBCO BRL", США, кат. N 15630-023	- 12,5 мл
Пенициллин* 500 ед.	- 1 флакон
* - как указано выше	

Стрептомицин* 0,5 г.	- 1 флакон
* - как указано выше	
Дистиллированная вода (для растворения трипсина ТРСК), ГОСТ 6709-72	- 5 мл.
Глицерин АО "Каустик" ГОСТ 6259-75 кв "Z"	- 2 мл.
В. Клеточная культура МДСК* (в монослое, флакон Т25, 7 млн.клеток)	- 1 матрас
* - как указано выше	
Среда Игла с сывороткой для транспортирования клеток*	- 50 мл.
Флакон культуральный Т25*	- 10 шт
* - как указано выше	
Насадка фильтрующая шприцевая GyroDisc, размер пор 0,2 мкм, "Биолот"	- 10 шт

Примечание: Набор хранится при +4°C в течение 6 мес. После растворения трипсин ТРСК и антибиотики хранить при температуре не выше -20°C, а остальные компоненты набора - при 4°C.

2.3.3. Материалы и оборудование для постановки реакции гемагглютинации и торможения гемагглютинации в целях индикации и идентификации выделенных вирусов:

Планшеты круглодонные для иммунологических реакций, "Медполимер", ТУ 64-2-278-79

Дозатор 8-канальный с переменным объемом 5-50 мкл, "Ленпипет", кат. N 4173202

Автоматическая пипетка с переменным объемом 5-50 мкл

Наконечники для автоматических пипеток до 200 или 250 мкл

Пипетки 10,0 мл; 5,0 мл и 1,0 мл

Эритроциты человека 0 (I) группы крови, 0.75%

Физиологический раствор

Фосфатно-солевой буфер

Вода дистиллированная [ГОСТ 6709-72](#)

Сыворотки диагностические гриппозные к различным субтипам вируса гриппа А и к вирусу гриппа В, ООО "Предприятие по производству диагностических препаратов" при ГУ НИИ гриппа РАМН, ВФС 42-03215509-04

2.3.4. Оборудование

Бокс ламинарный II уровня защиты Холодильник бытовой (4 ± 1) °C

Рефрижератор (-70 ± 2)°C

Центрифуга лабораторная (до 3000 об/мин) Термостат (36 ± 1)°C, желательна - CO₂ инкубатор

Микроскоп биологический (МБИ-3) или инвертированный (ЛОМО, Россия или Unico 1 V 900, United Product and Instrum. Inc., США)

2.4. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Принцип метода заключается в заражении сформированного в пенициллиновых флаконах (или пробирках) монослоя клеток MDCK клиническими образцами, полученными от больных с симптомами гриппа.

Инфицированные культуры инкубируют при 35-37°C, желательна в инкубаторе с подачей воздуха в смеси 5% CO₂. Ежедневно контролируют состояние монослоя. При появлении первых признаков размножения вируса вирусосодержащую культуральную жидкость исследуют на наличие гемагглютининов в среде, которую используют далее для накопления вируса. Полученные изоляты направляют в холодовом режиме в соответствующие Центры по гриппу. Использование метода изоляции вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK в дополнение к известному способу выделения вирусов гриппа на куриных эмбрионах позволяет резко расширить диапазон выделяемых возбудителей с составлением наиболее полной картины о структуре циркулирующих вирусных популяций, что необходимо для надзора за гриппом, понимания закономерностей эволюции возбудителя и прогнозирования предстоящих эпидемий, а также составления рекомендаций по штаммовому составу вакцин и диагностических препаратов на предстоящий эпидемический сезон.

2.4.1. Подготовка клеточной культуры, сред и растворов

Питательные среды готовят в требуемых объемах в зависимости от количества исследуемых клинических материалов непосредственно перед употреблением.

Подготовка транспортной среды.

К 200 мл среды 199 (на растворе Хенкса) 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.

Подготовка ростовой среды DMEM (для субкультивирования клеток).

Готовят концентрированный (х 1000 кратный) раствор антибиотиков. Во флакон с пенициллином добавляют 5 мл среды DMEM (без сыворотки), после растворения содержимое флакона переносят во флакон со стрептомицином, смесь пипетируют до полного растворения, фасуют по 0,5 мл и хранят при температуре не выше -20°C.

К 228 мл среды DMEM добавляют 12 мл эмбриональной сыворотки (5%) и 0,25 мл концентрированного раствора смеси пенициллина и стрептомицина.

Подготовка среды для выделения вирусов гриппа (СВ) в клетках MDCK (на обследование 10 больных).

Непосредственно перед употреблением к 19 мл среды DMEM (без сыворотки) добавляют 0,5 мл бычьего альбумина (V фракция), 0,5 мл 1 М HEPES-буфера и 0,4 мл TPCK-трипсина (до конечной концентрации 2,0 мкг/мл). TPCK-трипсин из 1 ампулы предварительно регидратируют в 2 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют в среду в указанном выше количестве, оставшуюся часть фасуют по 0,4 мл и хранят в замороженном состоянии (при температуре не выше - 20°C). В подготовленную среду добавляют 30 мкл концентрированного раствора пенициллина со стрептомицином. При обследовании меньшего количества больных остаток среды хранят при температуре не выше -20°C.

Культивирование клеток.

Клеточная культура MDCK сохраняет высокую чувствительность на протяжении 10-20 пассажей от момента ее получения, поэтому культивирование клеток целесообразно начинать незадолго до начала эпидсезона (октябрь-ноябрь

месяцы). В случае объявленной угрозы пандемии наборы необходимо формировать незамедлительно.

Субкультивирование клеток проводят в культуральных флаконах Т 25 емкостью 50 мл через каждые 3-4 дня (как только сформируется монослой) во избежание "старения" культуры, в результате чего ее чувствительность к вирусу понижается. Культуральную среду из матраса с монослоем клеток полностью удаляют. На монослой наносят 5 мл теплого (36-37°C) раствора EDTA-трипсин. Легким покачиванием омывают клеточный монослой указанным раствором в течение 1 мин., после чего внесенный раствор полностью удаляют пастеровской пипеткой. Процедуру повторяют. После этого в матрас вносят 1,0 мл теплого раствора EDTA-трипсин, так, чтобы он полностью покрыл монослой и помещают в термостат (36-37°C) на 30-40 мин до полного разрыхления и сползания монослоя. Допускается периодическое постукивание ладонью руки для ускорения отторжения культуры от пластика/стекла. После полного сползания клеток для приостановки дальнейшего действия EDTA-трипсина в матрас вносят 1,0 мл фетальной сыворотки, а затем - 1 мл среды DMEM. Суспензию клеток мягко пипетируют тонко оттянутой пипеткой до получения гомогенной суспензии. К полученной взвеси добавляют 9 мл среды DMEM. Суспензию перемешивают, производят подсчет клеток. При хорошем состоянии культуры с 1 матраса снимают около 6-7 млн. клеток. В зависимости от планируемой работы и сроков поступления клинических материалов полученную суспензию клеток MDCK готовят в следующих концентрациях:

100-150 тыс. клеток/мл - для формирования монослоя на 3-4 сутки, 200 тыс.клеток/мл - через 2 суток и 400 тыс.клеток /мл - через 24 часа.

Суспензию делят на 2 части по 5 мл, одну из которых используют для последующего субкультивирования, добавляя 15 мл ростовой среды DMEM, содержащей 5% эмбриональной сыворотки. Вторую часть используют для изоляции вирусов.

Важно, чтобы субкультивирование клеток на матрасах осуществлялось не реже 1 раза в 3-4 дня.

Выращивание клеток MDCK для изоляции вирусов.

К 5 мл полученной суспензии клеток добавляют среду DMEM, содержащую 0,5% сыворотки, в объеме, необходимой для разведения клеток, суспензию перемешивают пипетированием и засевают по 1,5 мл по пенициллиновым флаконам (пробиркам). Сформированный монослой должен использоваться для заражения без промедления, поскольку по мере дальнейшей инкубации культура утрачивает свою чувствительность к вирусам гриппа.

Таким образом, рассев культуры по флаконам (пробиркам) должен проводиться с учетом планируемого получения клинических материалов от больных.

Получение и доставка клинических материалов

Материалом для изоляции вирусов служит отделяемое из глубоких отделов носовой полости, зева, а также секционные ткани легкого, бронхов и мозга.

Материал отбирают в разгар заболевания (первые 3 дня болезни) в период вспышек гриппоподобных заболеваний в коллективах детей или взрослых, а также от амбулаторных или госпитализированных больных. С наибольшей частотой вирусы выделяются от детей младшего возраста, у которых вирус находится в свободном состоянии (вне иммунных комплексов).

Мазки из носа и зева.

Перед взятием материала из носа рекомендуется очистить носовые ходы от слизи. Материалы собирают стерильными тампонами, которые вводят последовательно в обе ноздри на глубину 2-3 см в область нижнего носового хода, дают пропитаться секретом в течение 1-3 мин., после чего вращательными движениями тампон медленно извлекают и погружают в пробирку с 2 мл транспортной среды, отламывая нестерильный конец палочки. Материалы из зева собирают аналогичным образом, плотно прижимая тампоны к пораженным гиперемизированным участкам миндалин и задних фарингеальных отделов. Тампон из зева помещают в одну пробирку с тампоном из носа.

В случае необходимости исследования материала с использованием нескольких методов можно проводить взятие материала в разные пробирки, например, для иммунофлуоресцентного анализа - из одной ноздри, для изоляции вируса - из другой ноздри, ПЦР - из зева. Такое разделение поможет сохранить материал и выполнять исследования

вне зависимости от сроков хранения и обработки материалов при исследовании другими методами.

Пробирки с материалом для выделения вируса незамедлительно доставляют в холодовом режиме (+4°C) в лабораторию, где тампоны с материалом от больного после интенсивного встряхивания отжимают в транспортную среду. Полученный материал используют для заражения клеточной культуры MDCK.

Назофарингеальные аспираты.

Назофарингеальные секреты аспирируют с помощью катетера, присоединенного к флакону, имеющему второй отвод, присоединенный к вакуумному отсосу. Катетер вводят вглубь носа параллельно небу, затем подключается отсос и катетер медленно, с поворачиванием, удаляется. Тем же катетером собирается слизь из второй ноздри. После этого катетер промывают 2 мл транспортной среды и материал доставляют в лабораторию.

Секционные материалы.

Фрагменты легкого, бронхов или мозга в день смерти больного помещают в стерильные флаконы и доставляют в холодовом режиме в лабораторию.

Из полученных материалов готовят 10% суспензию, растерев фрагменты ткани со стерильным стеклянным песком в фарфоровой ступке, после чего к суспензии добавляют транспортную среду в соотношении 1: 9, которую после перемешивания и освобождения от осадка отстаиванием (0,5 ч при 4°C) или центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об/мин отбирают и используют для последующего заражения клеток.

Хранение материалов от больных.

Оптимальным для выделения вирусов является незамедлительное заражение клеточной культуры, поскольку при хранении материалов инфекционная активность вирусов понижается. При отсутствии выросшей культуры на момент поступления материалов они могут храниться в лаборатории до заражения при +4°C не более суток.

Для более длительного хранения они должны быть заморожены при температуре не выше -20°C (желательно - при -70°C). Для сохранения инфекционности вируса следует избегать многократного (не более двух раз) замораживания - оттаивания клинических материалов.

Инфицирование клеточной культур MDCK клиническими материалами и субкультивирование вируса.

Первичное заражение.

Флаконы (пробирки) с монослоем клеток MDCK дважды по 1,5 мл отмывают средой без сыворотки, после чего материалы от больных наносят на монослой клеток из расчета по 0,2-0,3 мл каждого из материалов в 2-3 флакона (пробирки). Инфицированные культуры помещают в термостат на 30-40 мин (для адсорбции вируса), после чего в них вносят по 0,9-1,5 мл среды с трипсином (СВ). В контрольные культуры добавляют по 1 мл СВ.

Инфицированные и контрольные культуры помещают в термостат с температурой 35-37°C, желательно с подачей 5% CO₂. Ежедневно контролируют состояние монослоя с целью обнаружения признаков цитопатогенного действия вируса (ЦПД).

При отсутствии выраженного ЦПД пробы выдерживают при + 37°C вплоть до 7 суток. Периодически, через каждые 2-3 дня, начиная с 24-48 часов после заражения, размножение вирусов гриппа контролируют в реакции гемагглютинации (РГА). С этой целью из каждого флакона отбирают по 50 мкл культуральной жидкости (КЖ), которую титруют на фосфатно-солевом буфере, pH 7,2-7,4, начиная с цельной пробы до разведения 1: 32 (в объеме 50 мкл). К полученным разведениям КЖ добавляют по 50 мкл трижды отмытой физиологическим раствором 0,75% взвеси эритроцитов человека 0 (I) группы крови (наиболее чувствительная система регистрации гемагглютининов). При отрицательных результатах РГА клетки необходимо разрушить замораживанием-оттаиванием, подготовить объединенные пулы культуральной жидкости (из 2-3 флаконов от каждого пациента) и провести следующий пассаж в 2-3 флаконах с монослоем клеток MDCK с регистрацией репродукции вируса по ЦПД и в РГА, как указано выше. При отрицательных результатах на протяжении двух пассажей исследование материала прекращают.

Накопление вируса.

Для дальнейшего накопления вируса культуральную жидкость из одного из пенициллиновых флаконов с развившимся ЦПД или с появившимися гемагглютинидами используют для заражения клеток MDCK.

Перед заражением монослоя, сформированного на культуральном флаконе Т25, проводят процедуры, описанные выше (удаление ростовой среды, отмывание средой без сыворотки). В отмытый флакон с монослоем клеток вносят 0,5 мл вирусосодержащего материала (при высоких титрах ГА в первичном изоляте, достигающих 1:16 и выше, рекомендуется перед заражением разводить вирус в 10-100 раз). После инкубации при 37°C в течение 30-40 минут во флакон вносят 10 мл среды СВ. Флакон помещают в термостат. Ежедневно оценивают развитие ЦПД, через каждые 3 суток определяют присутствие гемагглютининов. При появлении выраженного ЦПД и (или) появлении гемагглютининов культуральную среду собирают, проводят центрифугирование в течение 10-15 мин. при 2000 об/мин и используют для последующего типирования возбудителя в РТГА с набором специфических диагностических гриппозных сывороток.

Хранение изолятов.

Для сохранения выделенного вируса к пробе объемом 1 мл, помещенной в микропробирку для криоконсервации с завинчивающейся крышкой ("Sarstedt", Германия), добавляют 5 мкл стабилизатора (глицерина). Выделенные вирусы могут храниться в лаборатории в замороженном состоянии при -30°C (желательно при -70°C) в течение 1 года (до начала следующего эпидемического сезона).

Примечание: В целях соблюдения правил безопасности всю работу с инфекционным материалом проводят в масках и резиновых перчатках в стерильных ламинарных боксах, оснащенных бактерицидными лампами. Отработанные посуду и материалы обеззараживают автоклавированием, рабочие поверхности полы обрабатывают 2% раствором хлорамина или лизоформина, по окончании и перед началом работы проводят 1,5-2 часовое облучение бокса бактерицидными лампами. ф.

Направление выделенных вирусов

Все выделенные вирусы гриппа и нетипируемые гемагглютинирующие агенты для последующего изучения их антигенной принадлежности необходимо немедленно пересылать авиатранспортом в холодовом режиме в Федеральный центр по гриппу и другим ОРВИ при НИИ гриппа РАМН (197376, Санкт Петербург, ул.проф.Попова, 15/17, тел. /812/234-62-63, e-mail: somin@infos.ru) или в Центр экологии и эпидемиологии гриппа при НИИ вирусологии им.Д.И.Ивановского (123098, Москва, ул.Гамалеи, д.16, тел./495/ 190-30-46, e-mail: flulab@mail.ru) (в соответствии с принадлежностью), известив получателя об отправке.

В Центрах проводится восстановление вирусов, детальное изучение антигенных и биологических свойств возбудителей, после чего они депонируются в Музейных коллекциях институтов и могут быть направлены в Сотрудничающие референс-центры Всемирной организации здравоохранения для изучения особенностей глобального распространения антигенных вариантов вирусов гриппа.

3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Предлагаемый метод выделения современных вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK выгодно отличается от метода выделения вирусов гриппа на куриных эмбрионах большей эффективностью, в части случаев результаты изоляции в обеих системах носят взаимодополняющий характер.

В течение ряда лет в НИИ гриппа проводились работы по сравнительной оценке двух способов выделения вирусов гриппа - в куриных эмбрионах и на клеточной культуре MDCK. В эпидсезон 1997-1998 годов частота выделения вирусов гриппа в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK составляла 2,2% и 13%, 1998-1999 год - 6,2 и 7,7% соответственно. При этом результаты изоляции вирусов в обеих системах совпадали лишь в части случаев, что свидетельствовало о различиях в тропизме к рецепторам у циркулирующих вирусов. Дальнейшая эволюция современных вирусов гриппа привела к тому, что они практически утратили тропизм к клеткам куриных эмбрионов и в сезоны 2003-2004 и 2004-2005 годов более 99% штаммов было выделено в клеточной культуре. Вместе с тем вирусы, выделенные в клеточной культуре MDCK, в настоящее время не разрешено использовать для производства вакцин, что определяет необходимость продолжения работ по выделению вирусов на куриных эмбрионах с усовершенствованием

соответствующих методических подходов.

Необходимо подчеркнуть, что повышение частоты выделения вирусов гриппа в клеточных культурах достигается только при полном соблюдении изложенных рекомендаций на всех этапах работ, использовании указанных в рекомендациях реагентов и чувствительной линии культуры клеток MDCK.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Для выделения вирусов гриппа на куриных эмбрионах исследуемые материалы после их первичной обработки вводят по 0,1 мл в амниотическую полость и по 0,2 мл в аллантоисную полость 9-11-дневных куриных эмбрионов.

Заражение проводят в затемненном боксе через боковую поверхность скорлупы, направляя иглу сначала в амниотическую, а затем в аллантоисную полости, предварительно сделав два прокола в скорлупе (над воздушной камерой и в районе глазка эмбриона).

Зараженные эмбрионы инкубируют в термостате 48 ч при температуре 36-37°C (для вирусов гриппа А) и 72 часа при 33-34°C (для вирусов гриппа В). После инкубации эмбрионы помещают на ночь в рефрижератор при +4°C. Амниотическую и аллантоисную жидкость собирают в отдельные пробирки с последующим их титрованием в РГА.

Индикацию вирусов гриппа осуществляют в реакции гемагглютинации (РГА) микрометодом путем добавления 50 мкл 0,5% суспензии отмытых эритроцитов кур или 0,75% эритроцитов человека 0 (I) группы крови к 50 мкл вирусосодержащего материала. Результаты РГА учитывают после 30-40 минутного оседания эритроцитов в лунках панелей при комнатной температуре.

При отсутствии агглютинации эритроцитов проводят 2 дополнительных пассажа путем заражения эмбрионов смесью амниотической и аллантоисной жидкостей от предыдущего пассажа. В случае отрицательных результатов РГА после 2 пассажей материалов исследование прекращают.

5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА

Типирование и субтипирование вирусов проводят в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) микрометодом.

5.1. РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РТГА:

Референс-антигены. Референс-антигены (гриппозные диагностикумы) представляют собой инфицированную вирусом гриппа аллантоисную жидкость инактивированную тиомерсалем. Референс-антигены готовятся из вакцинных или антигенно родственных им штаммов. Препарат должен иметь титр гемагглютиниана не ниже 160 ГАЕ/0,1мл, но титр гемагглютиниана (в жидком виде) может снижаться в процессе хранения. Жидкие и лиофилизированные антигены хранят при 4°C. Все антигены разводят фосфатно-солевым буферным раствором в соотношении 1:10 и титруют непосредственно перед началом постановки реакции. Они не должны использоваться, если их титр будет ниже 32 ГАЕ/0,1мл. В РТГА данные антигены используются в качестве контрольных образцов.

Референс-сыворотки. Референс-сыворотки представляют собой лиофилизированные гипериммунные бараньи (в составе наборов ВОЗ) или очищенные от ингибиторов гипериммунные кроличьи сыворотки (производятся в России). Объем дистиллированной воды, которую необходимо добавить для разведения сыворотки, указан на этикетке флакона. В качестве консерванта в сыворотках используется 0,1% азид натрия. В диагностический набор ВОЗ включена контрольная (баранья) сыворотка, не содержащая антител к вирусу гриппа, которая служит контролем правильности обработки референс-сывороток рецептор-разрушающим энзимом (RDE) для их освобождения от неспецифических ингибиторов. Диагностические сыворотки, выпускаемые ООО "Предприятие по производству диагностических препаратов" (Санкт Петербург, Россия), в дополнительной обработке для устранения неспецифических ингибиторов не нуждаются. Лيوфилизированные сыворотки хранят при температуре 4°C, растворенные - в замороженном виде при -20°C.

Рецептор разрушающий энзим (RDE). Является коммерческим препаратом и используется для обработки сывороток.

Тестируемые изоляты. Изоляты вирусов гриппа могут быть выделены как на куриных эмбрионах, так и на клеточных культурах (MDCK) и должны иметь титры в РГА не ниже 1:8, но предпочтительно 1:16 и выше.

Суспензия эритроцитов. Для постановки РТГА могут быть использованы эритроциты кур, индюшек, человеческие эритроциты 0(I) группы крови или эритроциты морской свинки. Рабочая концентрация для эритроцитов птиц составляет 0,5%, а для эритроцитов млекопитающих - 0,75%.

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), pH 7,2

Физиологический раствор 0,85%.

Оборудование для титрования (планшеты, пипетки, кюветы и т.д.). Для постановки РТГА используют 96-луночные микропланшеты. Планшеты с V-образными лунками обычно применяют, когда реакция проводится с эритроцитами птиц, а планшеты с U-образными лунками - при использовании эритроцитов млекопитающих.

5.2. ОБРАБОТКА РЕФЕРЕНС СЫВОРОТОК ОТ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТА RDE.

Сыворотки большинства видов животных содержат неспецифические ингибиторы. Эти факторы могут быть причиной ложноположительных результатов реакции. Для удаления неспецифических ингибиторов из сывороток животных применяют рецептор-разрушающий энзим (RDE). Если обработка сывороток RDE недостаточна, то можно применить альтернативные способы обработки (прогревание, обработка перйодатом калия или трипсином).

МЕТОДИКА ОБРАБОТКИ РЕФЕРЕНС-СЫВОРОТОК RDE.

1. RDE представляет собой сухой препарат, который необходимо развести в 25 мл. физиологического раствора.
2. Добавить 3 объема КОЕ к 1 объему сыворотки (0,3 мл RDE + 0,1 мл сыворотки).
3. Инкубировать при 37°C в течении 16-18 часов
4. Прогреть сыворотку, обработанную RDE при 37°C в течение 30 минут.
5. Добавить 6 объемов физиологического раствора (0,6 мл физ. раствора + 0,4 мл сыворотки обработанной RDE).

Обработанная RDE сыворотка используется для постановки РТГА и имеет разведение 1:10.

5.3. МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РТГА МИКРОМЕТОДОМ

5.3.1. Определение титров гемагглютининов контрольных антигенов и тестируемых изолятов.

Схема титрования антигенов.

В первую лунку микропланшета вносят 100 мкл контрольного антигена или тестируемого изолята.

- В лунки NN 2-12 вносят по 50 мкл ФСБ.

- Титруют антигены с коэффициентом 2, начиная с 1:2 до 1:512. Для приготовления двукратных разведений переносят по 50 мкл тестируемого антигена из лунки в лунку при тщательном перемешивании.

- К каждому разведению добавляют по 50 мкл суспензии эритроцитов (0,5% птичьих эритроцитов или 0,75% эритроцитов млекопитающих). В шейкере или путем аккуратного встряхивания планшета перемешивают смесь эритроцитов и антигена. Планшеты оставляют неподвижно на 30-40 минут при комнатной температуре до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках (NN 11-12).

Определение титра гемагглютининов. Наибольшее разведение вируса, при котором регистрируется полная агглютинация эритроцитов, принимают за его титр.

5.3.2. Приготовление стандартизованного антигена.

Единица ГА не является мерой измерения абсолютного количества вируса, но является "операционной" единицей, зависящей от методических особенностей титрования (объема реагентов, концентрации, вида эритроцитов и т.д.). Единица ГА определяется как количество вируса, необходимое для агглютинации равного объема стандартизированной суспензии эритроцитов.

Определение объема стандартизованного по содержанию ГА антигена (СА), необходимого для постановки РТГА.

Пример: 1 мл СА достаточно для его тестирования с 5 сыворотками, каждая из которых разведена в 8 лунках, при условии, что в каждую лунку добавлено по 25 мкл антигена ($25 \text{ мкл} \times 5 \text{ сывороток} \times 8 \text{ лунок} = 1 \text{ мл СА}$).

Для процедуры "повторного титрования" и с учетом потерь необходимо приготовить дополнительно 1 мл СА. Т.о. для проведения опыта нужно приготовить не менее 2 мл СА.

Определение разведения антигена.

Стандартизованный антиген должен содержать 8 ГАЕ в 50 мкл раствора. Необходимое для опыта разведение антигена определяют делением титра гемагглютининов на 8.

Например: титр ГА составил 1:160, антиген разводят в 20 раз ($160:8=20$). Для этого 0,1 мл антигена добавляют к 1,9 мл ФСБ.

Контроль дозы СА повторным титрованием.

СА должен содержать 8 ГАЕ/50 мкл. Это означает, что полная агглютинация должна регистрироваться в первых 4 лунках планшета (при титровании в объеме 50 мкл с внесением в первую лунку неразведенного СА, а в последующие - его двукратных разведений). Схема повторного титрования показана на рис.2. Если СА не содержит 8 ГАЕ/50 мкл, он доводится до нужной дозы добавлением соответствующего количества ФСБ, если титр более 8, или неразведенного антигена, если титр ниже 8.

Пример, если полная гемагглютинация наблюдается в 5 лунках (титр 1:16), приготовленный СА следует развести в 2 раза. Наоборот, если гемагглютинация наблюдается только в первых 3 лунках (титр 1:4), в приготовленный СА необходимо добавить антиген в том же количестве, что и при первичном приготовлении раствора.

После тщательного перемешивания контрольное титрование СА повторяют, доводя его концентрацию до 8 ГАЕ/50 мкл. Разведенный СА следует хранить при +4°C и использовать в тот же день.

5.3.3. Постановка РТГА.

Титрование референс-сывороток. Готовят серию двукратных разведений сывороток на ФСБ (от 1:10 до 1:1280) в объеме 25 мкл. Для этого в первые лунки рядов N 1-6 вносят по 50 мкл соответствующей референс-сыворотки (имеющей уже исходное разведение 1:10 после обработки RDE и прогревании). В остальные лунки (кроме лунок рядов N 6 и N 7) вносят по 25 мкл ФСБ. 25 мкл сыворотки из первой лунки переносят в следующую и после тщательного перемешивания процедуру повторяют. Из последней лунки избыток (25 мкл) разведенной сыворотки сбрасывают. Ряды N 6 и N 7 являются контрольными, в каждую лунку которых следует внести по 50 мкл ФСБ.

Добавление СА. К каждому разведению сыворотки добавляют по 25 мкл стандартизованного антигена. Панели встряхивают и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут.

Внесение эритроцитов. По завершении инкубации в каждую лунку, включая контрольные, добавляют по 50 мкл суспензии эритроцитов.

5.3.4. Учет результатов.

Результаты реакции учитывают через 30 минут. Оценку результатов РТГА начинают с контрольных лунок планшеты. В контрольных лунках, содержащих только эритроциты (NN 10-12 в рядах G и H), реакция должна быть четко отрицательной. После этого учитывают результаты тигрования контрольного образца сыворотки, не содержащей антител к вирусу гриппа, с используемыми референс-антигенами. Во всех этих лунках (NN 10-12, ряды A-F) должна быть четкая гемагглютинация, свидетельствующая о правильности обработки сывороток и полном удалении неспецифических ингибиторов. Далее учитывают результаты взаимодействия гомологичных референс-сывороток и референс-антигенов, которые должны быть строго специфичными (ингибция гемагглютинации в рядах NN 1-3 должна регистрироваться до титров не ниже, чем 1:160). Титром позитивной референс-сыворотки считают ее последнее разведение, обусловившее полное торможение гемагглютинации. При такой картине можно учитывать весь опыт типирования изолятов и полученные результаты считать достоверными. Выводы о результатах типирования вируса делают на основании выявленного взаимодействия тестируемого изолята с одной из позитивных референс-сывороток. Изолят относят к тому или иному типу (субтипу) вируса при условии его взаимодействия с соответствующей референс-сывороткой до титра не ниже, чем 1:20

При отсутствии взаимодействия вновь выделенного вируса с референс-сыворотками его относят к разряду нетипируемых и направляют в соответствующие Центры для последующего более детального антигенного анализа.

Текст документа сверен по:
рассылка