



Актуальные вопросы лабораторной диагностики гриппа , ОРВИ, COVID-19, внебольничных пневмоний.

**Зубова Мария Владимировна
И.о. заведующего лабораторией особо
опасных и вирусных инфекций**

**ФБУЗ «Центр гигиены
и эпидемиологии в Вологодской
области»**

Этиологическая структура возбудителей ОРВИ

Вирусные возбудители ОРВИ (7 семейств, 22 вида)

Orthomyxoviridae

род *Alphainfluenzavirus*, вид *Influenza A virus*
род *Betainfluenzavirus*, вид *Influenza B virus*
род *Gammainfluenzavirus*, вид *Influenza C virus*

Adenoviridae

род *Mastadenovirus*,
виды, *Human Mastadenovirus B, C, E*

Coronaviridae

род *Alphacoronavirus*,
вид *Human Coronavirus E229*
вид *Human Coronavirus NL63*
род *Betacoronavirus*
вид *Betacoronavirus 1*,
ранее – *Human Coronavirus OC43*
вид *Human Coronavirus HKUI*
вид *Coronavirus SARS-CoV-2 –new!*

Pneumoviridae

род *Orthopneumovirus*, вид *Human Orthopneumovirus*, ранее
- *Human Respiratory Syncytial virus*
род *Metapneumovirus*,
вид *Human Metapneumovirus*

Paramyxoviridae

Подсемейство Orthoparamyxovirinae
род *Respirovirus*, вид *Human respirovirus 1,3*
ранее - *Human Parainfluenza virus 1,3*

Подсемейство Rubulavirinae
род *Orthorubulavirus*,
вид *Human Orthorubulavirus 2,4*
ранее - *Human Parainfluenza virus 2,4*

Parvoviridae

род *Vocaparvovirus*, вид *Primate Vocaparvovirus 1*,
ранее - *Human Bocavirus*

Picornaviridae

род *Enterovirus*, виды *Human Rhinovirus A,B,C*
Human Enterovirus

Деятельность лаборатории особо опасных и вирусных инфекций по диагностике гриппа и ОРВИ.

Лабораторное обеспечение - в рамках эпидемиологического мониторинга за циркуляцией возбудителей гриппа и ОРВИ, проводятся такие виды исследований, как:

- 1. исследование мазков и секционного материала на актуальные вирусы и возможные возбудители пандемии методом ПЦР (грипп типа В и А, в т.ч. птичий грипп субтипы H5, H7, H9, ОРВИ, COVID-19)*
- 2. исследование донорских сывороток методом РТГА*
- 3. исследования методом ИФА на внебольничные пневмонии (Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae)*
- 4. исследования методом ПЦР на внебольничные пневмонии (Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila)*
- 5. исследование мазков на культуре клеток, т.е. вирусологическим методом*

Цели лабораторных исследований

- **Определение этиологии острой инфекции верхних и нижних дыхательных путей**
- **Изучение этиологии групповых заболеваний ОРЗ в целях проведения профилактических мероприятий**
- **Определение этиологии ОРЗ с летальным исходом (необходима сопроводительная клинико-эпидемиологическая информация)**
- **Выявление свойств возбудителя гриппа и ОРЗ (Положительные на грипп образцы направляются для изучения в референс - центры по гриппу и ИДП).**
- **Раннее выявление новых вирусов гриппа с высоким эпидемическим потенциалом для людей (нетипируемые образцы направляются в референс - центры).**

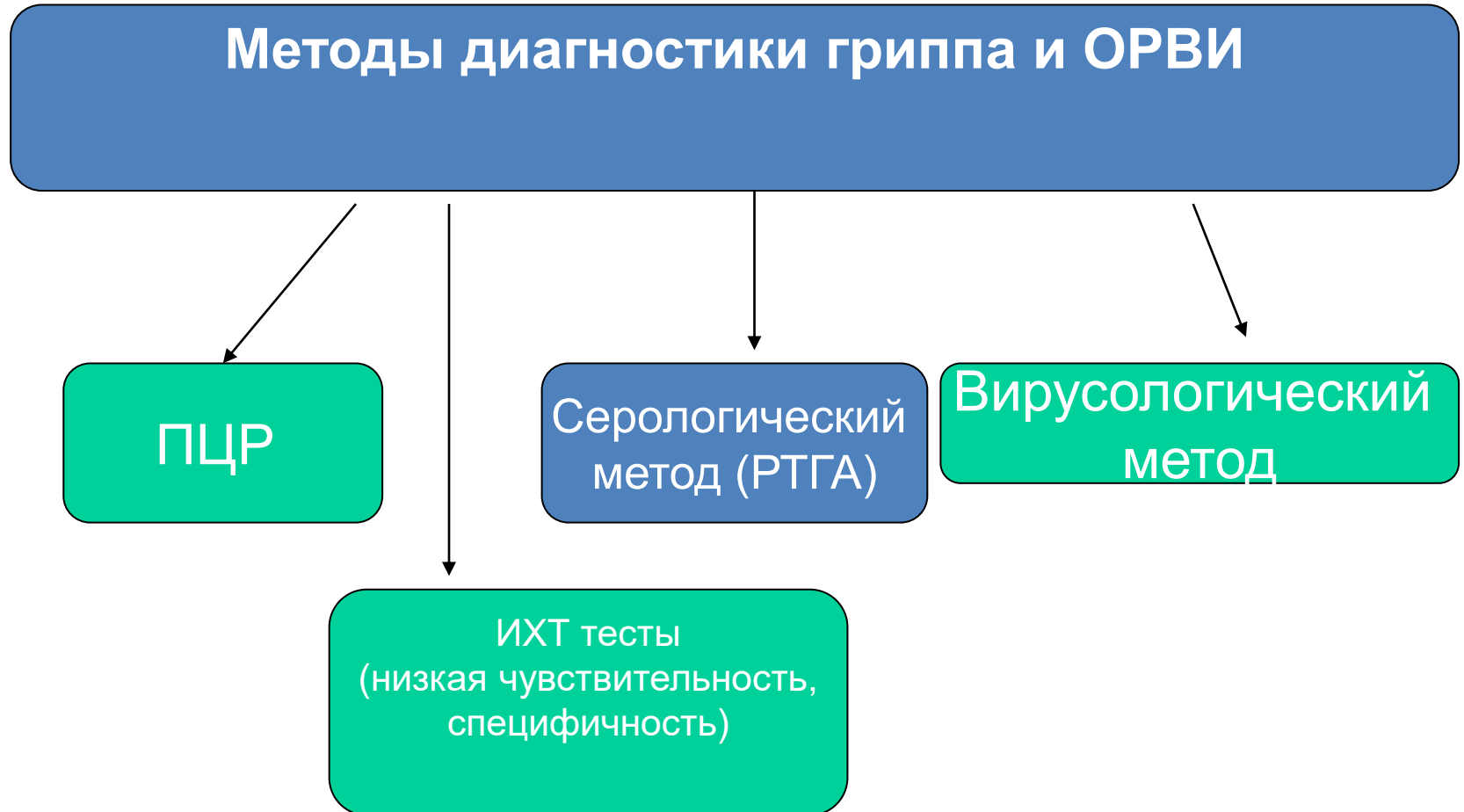


Цели лабораторных исследований на грипп и ОРВИ



- Целенаправленное назначение специфических средств этиотропной терапии
- Прогнозирование течения заболевания , возможных осложнений и исходов болезни
- Своевременная госпитализация больных
- Дифференциальная диагностика с другими инфекционными заболеваниями
- Рациональное размещение больных по этиологическому принципу (во избежание перекрестного внутрибольничного инфицирования)

Современные методы диагностики респираторных инфекций



Преаналитические процедуры при исследовании проб на грипп:

- Отбор материала для исследования
- Хранение и транспортирование
- Предварительная обработка материала

Условия проведения качественной диагностики респираторных заболеваний.

1. Использование информативного клинического материала:
 - Тип клинического материала – исходя из уровня поражения, локализации возбудителя
 - Сроки отбора материала в соответствии с этапом инфекционного процесса- как можно раньше!!!
 - Отбор материала желателен до начала этиотропной терапии
2. Соблюдение техники получения материала.
3. Обеспечение правильного хранения и транспортирования биоматериала в лабораторию.



Материалы для исследования при заболеваниях верхних дыхательных путей

- **ПЦР : мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки (два зонда с мазками в одной пробирке)**
- **ИХТ(поиск АГ) ИХТ: мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки**
- **Вирусологический метод: мазки со слизистой носоглотки**
- **Обнаружение антител к вирусам гриппа (первая – в острой фазе заболевания/ вторая – спустя 2-3 недели после 1-й - используется для оценки популяционного иммунитета ретроспективно**

Диагностические препараты.

Проведение индикации вирусов гриппа и ОРВИ выполняется с использованием зарегистрированных диагностических ПЦР - тест-систем .

Дифференциальная диагностика должна проводиться между

- COVID-19
- Вирусы гриппа
- ОРВИ



Правила сбора респираторных мазков для ПЦР - исследования

- **Для исследования с целью мониторинга возбудителей гриппа и ОРВИ необходимо брать материал от пациентов, болеющих не дольше 3 дней, т. к. в острую фазу (в первые 3 дня) заболевания внутриклеточное содержание вирусных антигенов бывает наиболее высоким. В более поздние сроки вирус элиминирует в секреты дыхательных путей.**
- **В диагностических целях – при первом обращении за медицинской помощью, но не позднее 5 дней от появления симптомов при ОРВИ, и не позднее 10 дней - при бронхитах и пневмонии.**
- **В течение 6 ч перед процедурой нельзя использовать медикаменты, орошающие носоглотку или ротоглотку и препараты для рассасывания во рту.**

Материалы для взятия клинического материала

1. зонды для мазков из носоглотки

- назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, 503CS01, COPAN, Италия)
- педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, 516CS01, COPAN, Италия)



2. зонды для мазков из ротоглотки

- зонд из полистирола с вязким тампоном (например ИЛС кат.300202)
- зонд-тампон ПС+Виск, 1 шт/уп, индивидуальная упаковка, стерильный)

Не использовать ножницы (риск контаминации образцов на преаналитическом этапе) – только фламбирование уничтожает нуклеиновые кислоты)

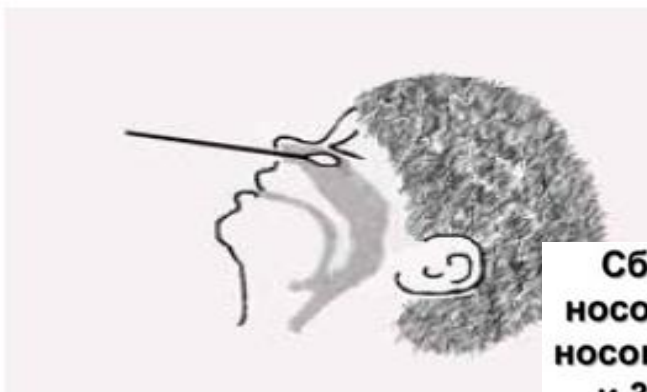
***Не использовать зонды на деревянной основе!
Не использовать зонды с хлопковыми тампонами!***

Транспортные среды для хранения и транспортировки респираторных мазков

- 1. коммерческие транспортные среды (UTM-330С, Soran; E-VCM, MWE; Swab, Delta Lab)**
- 2. транспортные среды, приготовленные самостоятельно.**
(приготовление в стерильных условиях на одной из сред для культур клеток (Игла-МЕМ, альфа-МЕМ, ДМЕМ, 199 среда) , с использованием бычьего сывороточного альбумина и растворы антибиотиков, антимикотиков Готовую среду разливают по стерильным пробиркам по 1-2 мл и хранят в холодильнике при +4 град С. Срок годности такой среды, приготовленной самостоятельно и разлитой по пробиркам, при соблюдении условий хранения - не более 6 недель.

Рекомендуется при возможности использовать коммерческие транспортные среды. Такие среды могут храниться при комнатной температуре после отбора проб около 24 часов: содержат компоненты, стабилизирующие вирусные частицы, и набор антибиотиков, препятствующих развитию бактериальной флоры.

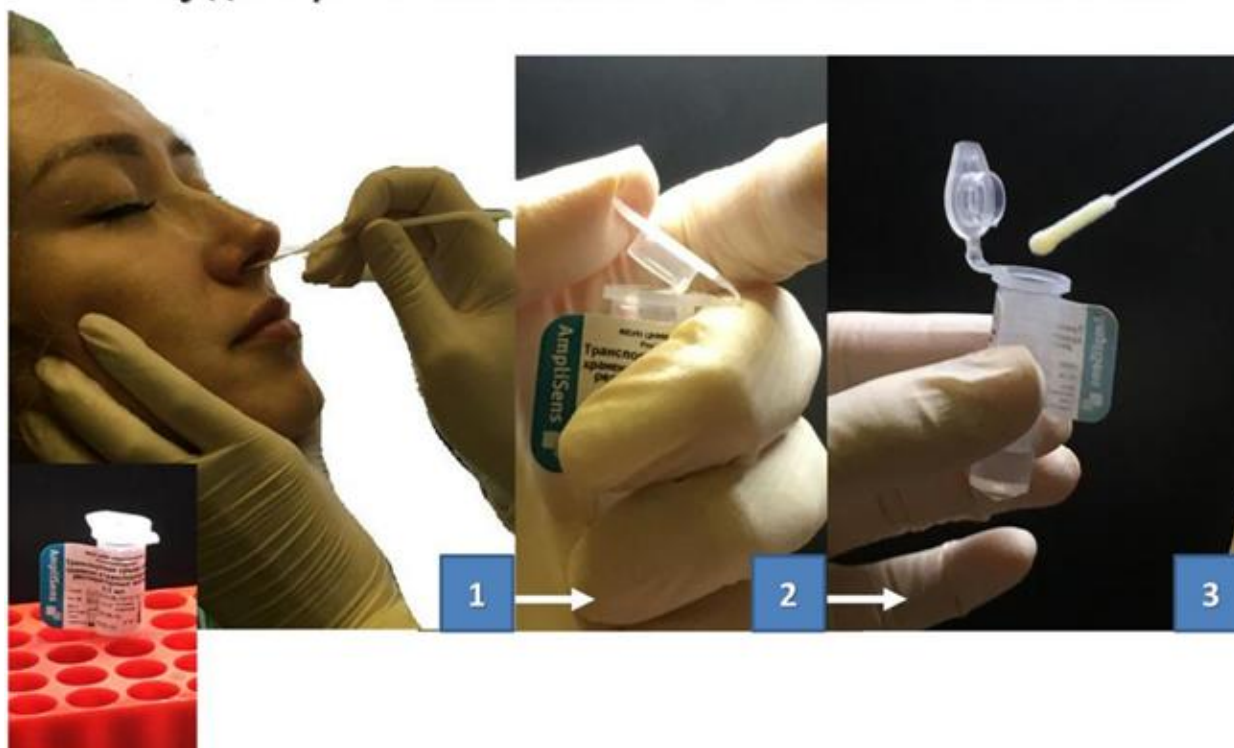
Физиологический раствор не является транспортной средой, поскольку не сохраняет инфекционные свойства вируса



Сбор мазка из носоглотки – зонд вводится по боковой стенке носовой полости снизу под нижнюю носовую раковину в нижний носовой ход параллельно небу глубоко (не менее 5 см у взрослых и 3 см у детей) и извлекается по боковой стенке полости носа

•Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой провести высмаркивание.

•Мазок берут **сухим** стерильным зондом с ватным тампоном.

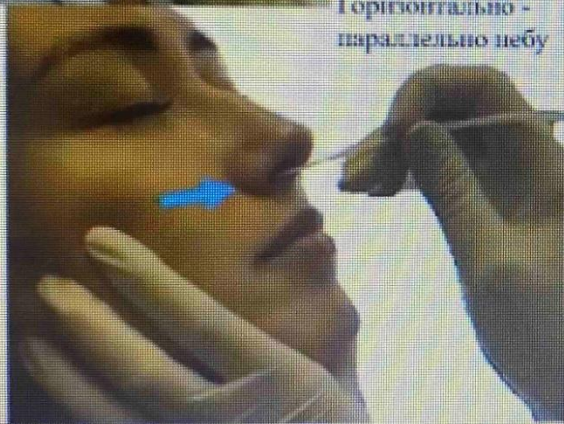


Техника взятия мазка

Мазок со слизистой оболочки нижнего носоглотки - зонд вводится в нижний носовой ход

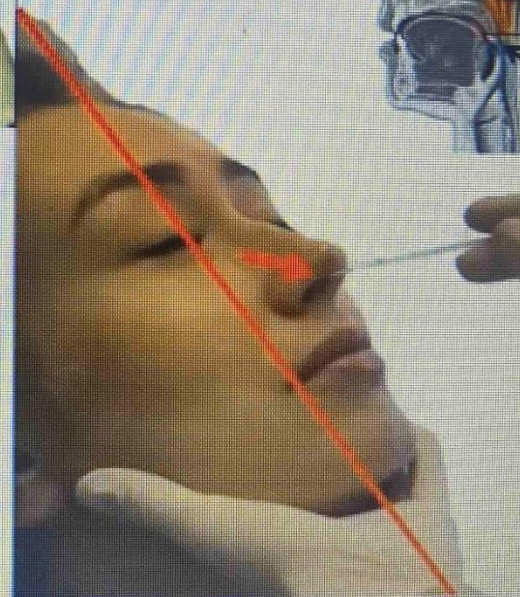
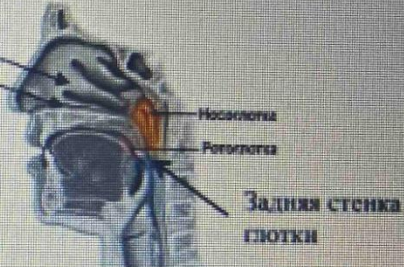


Горизонтально - параллельно небу

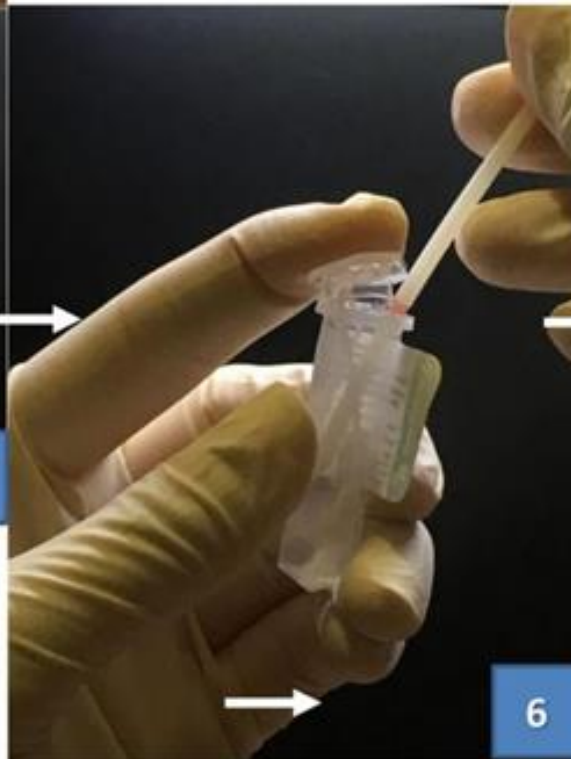
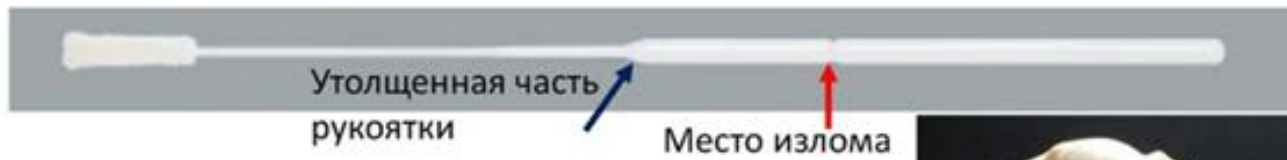


Зонд вводится ПРАВИЛЬНО:
по латеральной (боковой) стенке полости
носа в нижней части крыльев носа

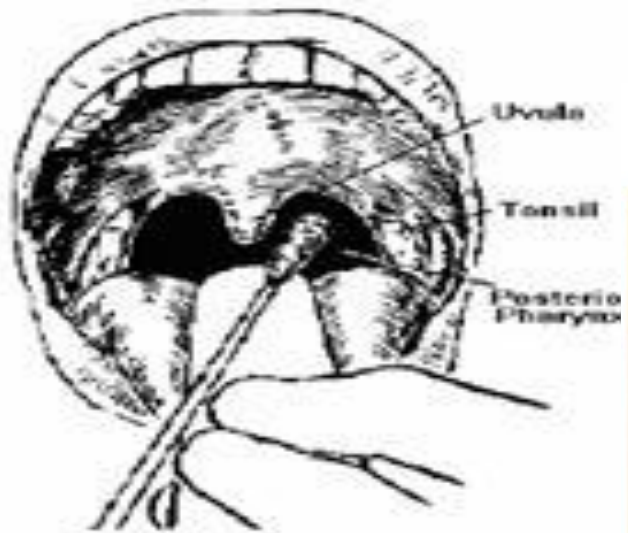
Нижняя носовая раковина
Нижний носовой ход



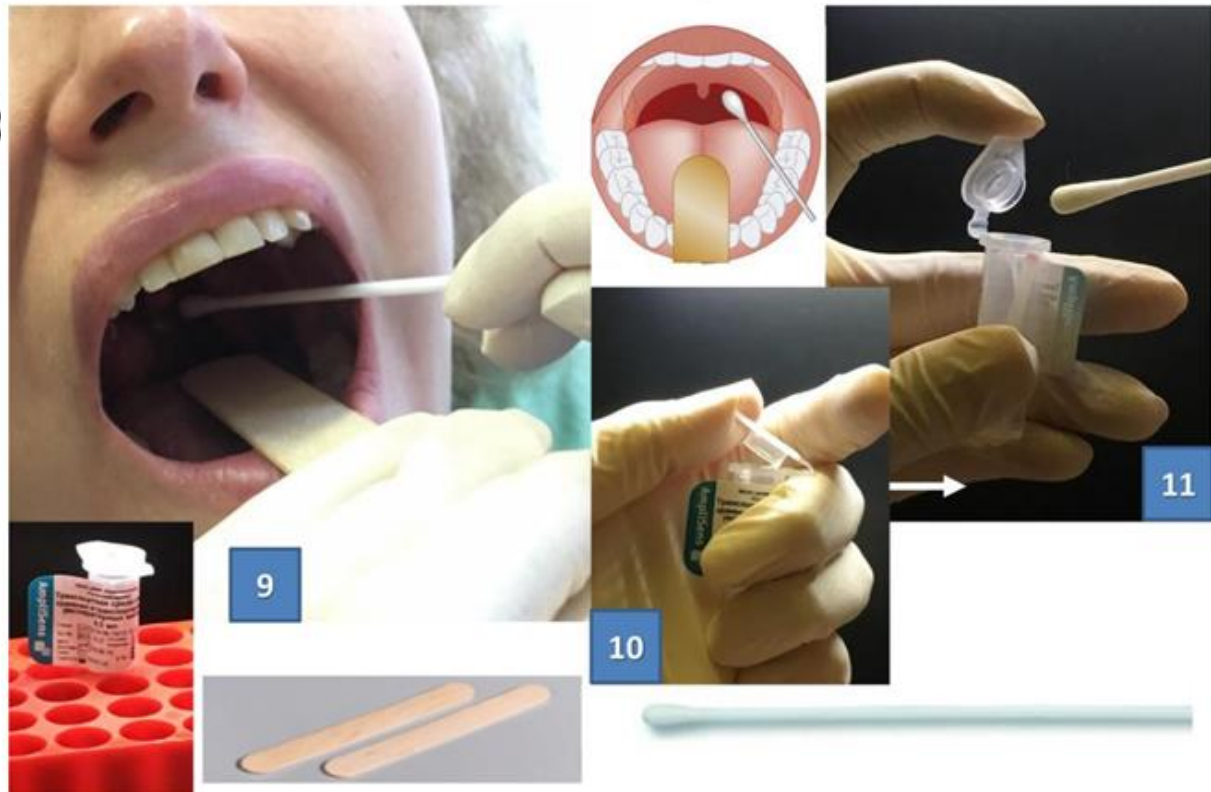
Зонд вводится НЕПРАВИЛЬНО:
сверху по внутренней стенке полости носа



Погрузить в пробирку утолщенную часть рукоятки до места слома, придерживая зонд сверху крышкой пробирки



Сбор мазка из ротоглотки – со слизистой оболочки задней стенки глотки, дужек и миндалин



➤ Не допускается собирать материал при воспаленном надгортаннике, так как проведение процедуры может привести к серьезной респираторной обструкции.

➤ Из полости рта мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и *задней стенки ротоглотки (обязательно!)*, аккуратно прижимая язык пациента шпателем.

➤ Не касаться языка рабочим концом зонда!

Упаковка образцов



- ✓ Пробирку маркируют
- ✓ Для передачи образцов в лабораторию пробирку помещают в штатив и переноску либо в индивидуальную упаковку (пакет с сорбирующей салфеткой)
- ✓ Снабжают сопроводительной информацией

- Рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента из полости носоглотки, ротоглотки погружаются (отламываются) в одну пробирку с транспортной средой. *Оптимальный объем* транспортной среды в пробирке для забора – *1-2 мл*. Пробирку с раствором и рабочими частями зонда герметично закрывают.
- Мазки из ротоглотки и из носоглотки можно объединять в одной пробирке.

Взятие материала из нижних дыхательных путей

Мокрота или аспират из трахеи

- Мокроту при глубоком откашливании собирают в стерильные одноразовые контейнеры с широким горлом с завинчивающейся крышкой в количестве не менее 3 мл для взрослых и около 1 мл для детей, после предварительного полоскания полости рта водой. Сбор мокроты осуществляется натощак или не ранее 2 ч после еды.
- Аспираты из трахеи (эндотрахеальный аспират) или БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж) получают традиционным способом и помещают в стерильные герметичные одноразовые контейнеры. Манипуляцию проводят натощак после чистки зубов и полоскания полости рта водой. Объем полученного аспирата должен составлять не менее 3-5 мл.

Материалы для лабораторной диагностики внебольничных пневмоний.

Материал и методы этиологической диагностики ВП

➤ **Периферическая кровь**

Бактериологическое исследование (типичные бактерии),
ПЦР (типичные бактерии)

➤ **Плевральная жидкость**

Бактериологическое исследование (типичные бактерии),
ПЦР (респираторные вирусы, типичные бактерии)

➤ **Материал из нижних дыхательных путей**

- Мокрота при глубоком откашливании
- Аспираты из трахеи
- БАЛ (по показаниям)

Бактериологическое исследование (типичные бактерии),
ПЦР (респираторные вирусы, M.pneumoniae, S.pneumoniae, L.pneumophila,
ПЦР количественный анализ (Типичные бактерии)

➤ **Мазок из носоглотки и ротоглотки**
Только в случае невозможности получить материал из НДП!

Выделение вирусов гриппа в культуре
ПЦР (респираторные вирусы, M.pneumoniae, S.pneumoniae, типичные бактерии),
Этиологический диагноз ВП предположительно установлен!

➤ **Сыворотка крови парная**

IgM, IgA, IgG: M.pneumoniae, S.pneumoniae, L.pneumophila, респираторные вирусы

➤ **Моча**

Обнаружение антигена:
L.pneumophila, S.pneumoniae (только для взрослых!)

Направление на исследование секционного материала

- **Исследуется материал следующих органов:**
 - **фрагменты пораженной части трахеи/бронхов/легких;**
 - **фрагменты пораженной части мягких мозговых оболочек/коры больших полушарий(при наличии менингеальной симптоматики в анамнезе);**
 - **фрагменты других органов (при наличии симптомов инфекции и поражений, обнаруженных при вскрытии)-
фрагменты селезенки, пораженной части миокарда,
тонкого кишечника и др.**
- **Материал для исследования должен быть нативным (без фиксации формалином).**

Направление на исследование секционного материала

- **Посмертный материал собирают в течение первых суток после гибели больного стерильным инструментом (индивидуально для каждого органа) из зоны поврежденной ткани объемом 1-3 см³.**
- **Материал сопровождается эпикризом и выпиской из протокола вскрытия (допускается направление эпикриза и выписки из протокола вскрытия не одновременно с аутопсийным материалом).**
- **Фрагменты органов должны быть заморожены, если они не будут использованы для работы в течение *24 часов*.**

Хранение клинических образцов до проведения анализа.

- **Допускается хранение материала до проведения исследования в течение *48 часов* при температуре от *2 до 8 °C*, более длительно – при температуре не выше минус *16 °C*.**
- **Многократные циклы замораживания/оттаивания образцов разрушительно воздействует на инфекционную активность вирусных частиц, рекомендуется избегать подобное.**

Условия транспортирования материала

Образцы, не подвергнутые заморозке

допускается транспортировать при температуре **от 2 до 8 °С** в термоконтейнерах (термос с хладагентами) не более 24 часов (с учетом срока отбора материала, то есть материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 48 часов от момента забора материала).

Образцы, подвергнутые заморозке

необходимо соблюдать режим пересылки при температуре -18°C - 20°C . Это означает, что пересылаемые образцы должны быть заморожены весь период транспортировки.
(использование хладагентов разных видов)

Упаковка материала

- Крышку пробирки или контейнера герметизируют (пленкой, парафином, пластырем) и маркируют.
- Пробирки/контейнер с материалом от разных пациентов упаковываются в индивидуальные пакеты с замком во избежание перекрестной контаминации. Недопустим также контакт между контейнерами с различными субстратами от одного пациента. В каждом индивидуальном пакете должен содержаться адсорбент на случай пролития материала.

Направление на исследование заполняется и упаковывается отдельно от биологического материала.

Требования к маркировке материала для лабораторного исследования

- 1.** На этикетке пробирок (контейнеров) с материалом указывается: фамилия и имя обследуемого, дата взятия материала, тип материала.
- 2.** В сопроводительном документе (направлении) к материалу необходимо указать:
 - наименование учреждения, которое направляет материал на исследования,
 - телефон и адрес электронной почты направляющего учреждения;
 - фамилию и имя обследуемого лица;
 - дата рождения; пол;
 - место проживания;
 - дату заболевания или контакта с больным;
 - предварительный клинический диагноз, степень тяжести заболевания;
 - госпитализация (да,нет); если да - указать ЛПУ
 - данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован /не вакцинирован/нет данных); для вакцинированных-наименование вакцины, серия, дата вакцинации
 - данные о приеме противовирусных препаратов против гриппа в течение последних 14 дней (да/ нет / нет данных); Если да, указать наименование препарата, дату начала приема, длительность приема.
 - дата забора материала, тип материала
 - ФИО, должность сотрудника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным сотрудником.

При направлении материала с целью проведения углубленных молекулярно-генетических и вирусологических исследований дополнительно необходимо указать:

- результат лабораторного исследования на грипп; метод исследования (ПЦР, ИФА, МФА и др), наборы реагентов, использованные для проведения исследований, производитель; дата проведения исследования;**
- указать ЛПУ, на базе которого проводилось исследование;**
- осложнения заболевания;**
- наличие сопутствующих заболеваний/состояний (заболевания сердечно-сосудистой системы, хронические заболевания дыхательной системы, почек, печени, метаболические нарушения(ожирение), беременность и др.)**
- сведения о вакцинации против пневмококковой инфекции (вакцинирован/ не вакцинирован/нет данных) - дата вакцинации, название и серия вакцины; профессиональная деятельность; проводилась ли прижизненная этиологическая диагностика(результат, дата получения); проводилась ли патогенетическая терапия; проводилась ли интенсивная терапия;**

Направление биоматериалов в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области»

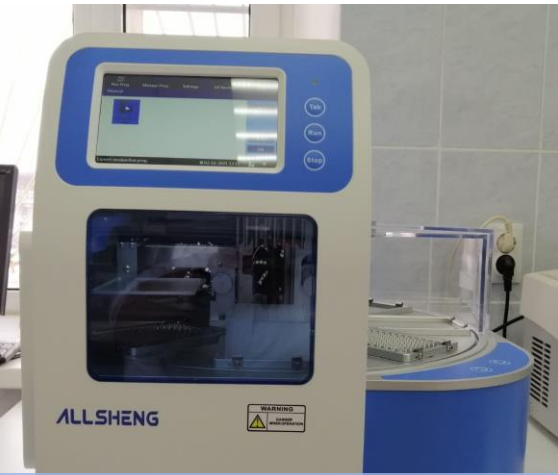
- Исследованные в ЛПУ позитивные на грипп образцы биологического материала (смывы и мазки из носоглотки, секционный материал) направляются в лабораторию особо опасных и вирусных инфекций в следующих случаях:
 - первые случаи в эпидсезоне лабораторно подтвержденного гриппа;
 - больные с тяжелой формой лабораторно подтвержденного гриппа, в том числе тяжело заболевшие вакцинированные лица;
 - больные, имеющие в анамнезе контакт с домашней, дикой птицей или свиньями;
 - заболевшие в межэпидемический период с клиническим диагнозом «грипп»;
 - секционный материал – в случае смерти от гриппа или постгриппозной пневмонии.

Схема взаимодействия



Взаимодействие с Референс-центрами, сезон 2022-2023

Наименование референс-центра	Количество проб	Результат
ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора» Референс - центр по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей	10 проб -5 носоглоточных мазков - 5 проб к-ДНК	Результаты лаборатории подтверждены. Проводится секвенирование .
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Референс-центр по мониторингу за зоонозным, высокопатогенным гриппом.	22 пробы -8 носоглоточных мазков - 3 пробы секционного материала -11 проб к-ДНК	Результаты лаборатории подтверждены. Проводится углубленное исследование
ФГБУ "НИИ гриппа" Федеральный центр по гриппу (ФЦГ) ; Национальный Центр по гриппу ВОЗ (Приказ Роспотребнадзора от 31.03.2005 №373) ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области» - опорная база ФЦГ	118 проб 9 носоглоточных мазков 9 проб к-ДНК -100 донорских сывороток (РТГА)	Результаты лаборатории подтверждены. Проводится секвенирование .
ФБУН «НИИ Пастера»	5583 носоглоточных мазка на COVID19	60,9% выявлен штамм Омикрон (линии ВА2, ВА4, ВА5) 37,3% выявлен штамм Дельта



Auto-Pure96

Благодарю за внимание !

