

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения
Главный государственный санитарный

врач

Республики Беларусь

_____ О.В. Арнаутов

24.12.2010 г.

Регистрационный № 116-1210

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,

ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ:

А.С. Владыко, Е.П. Счесленок, Г.А. Клавсуть, С.А. Бусел,

В.В. Пашкович, Ф.М. Фидаров, Н.Д. Коломиец, Н.В. Винокурова

Минск 2010

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению устанавливает лабораторные методы диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом в соответствии с Санитарными правилами «Состояние здоровья населения в связи с влиянием микробиологического фактора среды обитания человека. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом», утвержденными постановлением № 151 Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.12.2002 г.; санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами по безопасности работы с микроорганизмами.

2. Настоящая Инструкция по применению предназначена для специалистов лабораторий органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и других организаций здравоохранения.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (далее-ГЛПС) - острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, характеризующаяся интоксикацией, лихорадкой, почечными и геморрагическими проявлениями. ГЛПС занимает ведущее место в Европе и Азии по числу регистрируемых случаев среди природно-очаговых инфекций. Ежегодно в мире отмечается до 150 000 случаев заболевания ГЛПС.

Вирусная природа геморрагической лихорадки с почечным синдромом была доказана еще в 1944 г. А. А. Смородинцевым, однако лишь в 1976 г. Н. W. Lee (Южная Корея, 1976) удалось выделить из легких грызуна *Apodemus agrarius coreae* вирус Hantaan (по названию реки Хантаан, протекающей по 38-й параллели Корейского п-ва). В дальнейшем вирусы использованы для диагностики геморрагической лихорадки.

В настоящее время возбудитель ГЛПС относится к семейству бунья-вирусов (*Bunyaviridae*) и принадлежит к самостоятельному роду - *Hantavirus*. В различных регионах мира циркулирует 8 серотипов хантавирусов: 1. Hantaan. 2. Seoul. 3. Puumala. 4. Prospect Hill. 5. Leaky. 6. Thottapalayam. 7. Dobrava-Belgrade. 8. Маaji (Рекомендации Совещания рабочей группы экспертов ВОЗ, Сеул, 1991).

2. Наиболее значимыми в этиологии заболеваний человека являются четыре основных ГЛПС-ассоциированных хантавируса, вызывающих у человека заболевание различной тяжести: вирусы Хантаан, Добрава/Белград, вызывающие тяжелую форму ГЛПС с летальностью 5-35%, вирус Сеул - заболевание средней тяжести с летальностью 2-5%, вирус Пуумала, являющийся этиологическим агентом эпидемической нефропатии и вызывающий легкую форму ГЛПС с летальностью 0,3-1,0%. Вирус Пуумала циркулирует в Скандинавских странах, Западной России, Балканском регионе, а также некоторых странах Центральной Европы, включая Республику Беларусь.

3. Характеристика вирусов - возбудителей ГЛПС (хантавирусов).

Морфологические свойства. По данным электронно-микроскопических исследований вирионы хантавирусов имеют сферическую форму, размер его в диаметре составляет 85-120 нм. Геном вируса состоит из трех сегментов: L -, M -, S -

одноцепочечной (минус-цепь) РНК. Структура вируса включает 4 полипептида: нуклеокапсид (N), гликопротеины мембраны (G1 и G2), РНК-полимеразу.

Биологические свойства. Возбудители ГЛПС являются оболочечными вирусами с негативным геномом, представленным односпиральной трехсегментированной (S, M и L) РНК с общим молекулярным весом $4,5 \times 10^6$. S- сегмент кодирует нуклеокапсидный белок (N) с молекулярной массой 50-53 кДа. M- сегмент кодирует 2 поверхностных гликопротеина G1 и G2 с молекулярной массой 65-74 и 55-65 кДа, соответственно. L- сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу с молекулярной массой 200 кДа. Каждый геномный сегмент имеет единственную открытую рамку считывания (ORF).

Биохимические свойства. Плотность седиментации вирионов хантавирусов в сахарозе составляет $1,16-1,17 \text{ г/мл}^{-1}$, в CsCl_2 – $1,20-1,21 \text{ г/мл}^{-1}$, константа седиментации равна 350-450 S. Разрушение вирионных частиц неионными детергентами высвобождает нуклеокапсиды, которые осаждаются в плотности $1,18 \text{ г/мл}^{-1}$ в сахарозе и $1,25 \text{ г/мл}^{-1}$ в CsCl_2 .

Химический анализ вирусов показал, что вирион содержит около 2,0% РНК, 58% белка, 7% углеводов и 33% липидов.

Культуральные свойства. Вирус способен размножаться в куриных эмбрионах 6-7-дневного возраста, пассируется на полевых мышах, степных пеструшках, джунгарских и золотистых хомяках, крысах Вистар и Фишер. Хантавирусы культивируются в перевиваемых клетках почки зеленой мартышки Vero E6 и клетках карциномы легкого человека A-549. При использовании клеток Vero-E6 штаммы хантавирусов выделены от наиболее распространенных видов мышевидных грызунов: рыжей полевки, желтогорлой, полевой, кавказской лесной мышью и различных видов полевок (красно-серой, красной, дальневосточной).

Антигенные свойства обусловлены наличием антигенов нуклео-капсидного белка и антигенов поверхностных гликопротеинов, вызывающих образование вируснейтрализующих антител. При исследовании различных моноклональных антител к вирусу Puumala было выявлено, что нуклеокапсидный белок вызывает образование антител, не способных нейтрализовать инфекционную активность, тогда как поверхностные гликопротеины стимулируют образование нейтрализующих антител.

К настоящему времени известно уже более 25 серологически и генетически отличающихся друг от друга хантавирусов. На сегодняшний день известны две клинические формы хантавирусной инфекции у людей: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, возбудителем которой являются вирусы Hantaan, Seul, Puumala, и Dobrava/Belgrade с хантавирусным пульмональным синдромом, вызываемым хантавирусами Sin-Nombre, Black Creek, New York, Bayou, Andes, Laguna Negra.

Для изучения серологической взаимосвязи между хантавирусами используется несколько тестов: непрямой метод флюоресцирующих антител (НМФА), реакция нейтрализации (РН), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноперципитация и специфические поли- и моноклональные антитела. По результатам серодифференциации штаммов, изолированных от больных ГЛПС и грызунов – природных резервуаров хантавируса, отловленных в эндемичных по ГЛПС районах, было обозначено 4 основных серотипа хантавируса, для которых в качестве

прототипных выбраны штаммы: для вируса Hantaan – штамм 76-118, изолированный от полевой мыши, Puumala – штамм Sotkamo, изолированный от рыжей полевки, вируса Seoul – штамм 80-39, выделенный от серой крысы и Prospect Hill – штамм Pr. Hill, выделенный от луговой полевки. С помощью моноклональных антител, полученных как к цельному вириону, так и к структурным белкам вируса Hantaan, при антигенном анализе штаммов, изолированных от больных ГЛПС и грызунов из различных районов Китая, авторы установили наличие у хантавирусов 9 антигенных детерминант, включая группо-, видо- и штаммоспецифические. Исследования позволили выявить антигенную гетерогенность штаммов и проследить связь штаммов с определенным видом грызуна.

4. Устойчивость во внешней среде. Вирус ГЛПС относительно устойчив во внешней среде при температуре от 4° до 20°С. В сыворотке крови, взятой у больных людей, сохраняется свыше 4 суток при 4°С. Инактивируется при температуре 50°С в течение 30 мин, при 0-4°С стабилен 12 час. Вирус быстро теряет инфекционность при +37°С и рН 5,0, относительно стабилен при температуре от +4°С до +20°С при рН 7,0 – 9,0, но длительно сохраняется в лабораторных условиях при минусовой (-20-80°С) температуре. Чувствителен к эфиру, хлороформу, ацетону, бензолу, дезоксихолату натрия, ультрафиолетовым лучам.

5. ГЛПС - строгий природноочаговый зооноз. Резервуаром возбудителя служат мышевидные грызуны.

Природные очаги ГЛПС в Европейской части расположены в определенных ландшафтно-географических зонах: пойменных лесах, лесных, оврагах, влажных лесных массивах с густой травой. Основными хозяевами и переносчиками хантавирусов, в основном, являются мелкие грызуны. Каждый хантавирус ассоциирован с определенным (или несколькими) видом грызунов, с которым он коэволюционировал. В настоящее время в качестве носителей и основных резервуаров вирусов ГЛПС среди грызунов рассматриваются полевая мышь (*Apodemus agrarius*), являющаяся основным хозяином вируса Хантаан, дальневосточная полевка (*Microtus fortis*), являющаяся основным хозяином вируса Сеул, рыжая полевка (*Clethrionomys glareolus*), являющаяся основным хозяином вируса Пуумала, желтогорлая мышь (*Apodemus flavicollis*), являющаяся основным хозяином вируса Добрава/Белград, а также серая крыса (*Rattus norvegicus*), красная полевка (*Clethrionomys rutilus*) и другие. В Республике Беларусь доминирующим видом грызунов – носителей хантавирусов, является рыжая полевка – основной хозяин вируса Пуумала. В единичных случаях антиген хантавирусов обнаруживается в органах полевой мыши, мыши - экономки, бурозубки, домовой мыши и серой крысы.

В городах резервуаром инфекции могут быть домовые крысы и мыши. Грызуны переносят эту инфекцию в виде латентного вирусоносительства. У полевых мышей, отловленных в природных очагах, вирусный антиген обнаружен в тканях легких, почек, печени, в лимфатических узлах, селезенке, прямой кишке. Возбудитель выделяется во внешнюю среду с калом, мочой, слюной. Передача между грызунами осуществляется в основном через дыхательные пути.

Заболеваемость ГЛПС характеризуется выраженной сезонностью: с апреля по декабрь. По многолетним данным в Республике Беларусь пик наблюдается в сентябре-ноябре. С января по март заболеваний почти не встречается, что связано с резким

сокращением численности мышевидных грызунов в зимнее время. Помимо сезонных, имеются и годовые колебания заболеваемости (периодичность), которые составляют 3-4 года. Существует прямая зависимость заболеваемости человека от численности грызунов и их инфицированности на данной территории.

При сборе эпидемиологического анамнеза медицинские работники устанавливают (с указанием места и времени) наличие данных о посещении природных и антропоургических очагов ГЛПС.

В Республике Беларусь с момента официальной регистрации (с 1991 по сентябрь 2010 гг.) зарегистрировано 63 случая инфекции (отмечались летальные исходы). Наибольшее количество случаев заболевания ГЛПС зарегистрировано в 2006 году – 9 и в 2010 году – 14. Возросший в 2006г. уровень заболевания населения ГЛПС (0,09) по сравнению с 2005 г. (0,01) свидетельствует об активизации природных очагов хантавирусной инфекции. К настоящему времени в Республике Беларусь зарегистрировано 573 природных и 7 антропоургических очагов инфекции.

6. Особенностью ГЛПС является множественность путей заражения инфекцией, 100% восприимчивость человека без различия пола и возраста, а также отсутствие контагиозности (больной не является источником инфекции и для окружающих не опасен). Люди заражаются при соприкосновении с объектами внешней среды, которые инфицированы грызунами. Заражение человека происходит преимущественно воздушно-пылевым путем (до 80%), при вдыхании высушенных испражнений инфицированных грызунов. Передача вируса возможна также контактным путем, через поврежденные кожные и слизистые покровы, при соприкосновении с грызунами или инфицированными объектами внешней среды (хворост, солома, сено и т.п.). Заражения происходят либо одномоментно и связаны с общими факторами передачи, источниками (групповые заболевания), либо независимо друг от друга (спорадические заболевания).

От больных ГЛПС хантавирусы в остром периоде заболевания были выделены из крови, перитонеальной жидкости, лейкоцитарной массы, а также из органов (легких, почек, печени) умерших от ГЛПС людей.

7. Раскрытие природы патологического процесса остается недостаточно изученным. Сопоставление клинических и морфологических данных ГЛПС привело к выводу, что основной патогенетической сущностью заболевания является универсальный альтеративно-деструктивный панвакулит, приводящий к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, далее-ДВС-синдром, (коагулопатия потребления, тромбогеморрагический синдром) - нарушенная свертываемость крови по причине массивного освобождения из тканей тромбопластических веществ, гемодинамических расстройств и острой почечной недостаточности (далее-ОПН). При этом преобладающий механизм развития васкулита рассматривается как иммунопатологический. Экспериментально установлено, что основными органами мишенями для хантавирусов, вызывающих ГЛПС, являются легкие (вследствие респираторного механизма инфицирования) и почки. Достаточная продолжительность виремии (5-15 дней и более) предполагает интенсивную внутриклеточную репликацию хантавируса во всех органах и многочисленность клеток-мишеней. Однако установлено, что в патогенезе хантавирусной инфекции ключевой клеткой для всех серотипов (генотипов)

хантавирусов остается эндотелий сосудов микроциркулярного русла. Показано, что разные серотипы хантавирусов для проникновения в эндотелиальную клетку используют одни рецепторы – бета 3-интегрины, блокада которых дестабилизирует мембраны, увеличивает проницаемость стенки сосуда и миграцию клеток во внесосудистую область, активизирует процессы адгезии на эндотелии. Другой потенциальной клеткой мишенью хантавируса считают тромбоциты периферической крови. Тромбоцитопения – патогномический признак ГЛПС, являясь важным компонентом патогенеза, обуславливает нарушения гомеостаза, запуск каскада иммунокомпетентных процессов и супрессивных механизмов.

8. Клиническое проявление инфекции. Инкубационный период продолжается от 4 до 49 дней (чаще всего от 14 до 21 дня). Иногда наблюдаются продромальные явления продолжительностью 2-3 дня, которые проявляются недомоганием, утомляемостью, головной болью, миалгиями и субфебрилитетом.

Болезнь характеризуется циклическим течением и многообразием клинических вариантов: от abortивных лихорадочных форм до тяжелых форм с массивным геморрагическим синдромом и стойкой почечной недостаточностью. Под влиянием вирусов нарушается сосудисто-тромбоцитарный гомеостаз, что приводит к внутрисосудистому свертыванию крови и сильному болевому синдрому. При тяжелых формах заболевания имеет место формирование острой почечной недостаточности, а развитие геморрагического синдрома приводит к тромбозу и полостным кровотечениям. Причинами смерти в тяжелых случаях могут быть острая сердечно-сосудистая недостаточность, массивные кровоизлияния в жизненно важные органы, плазморея в ткани, коллапс, шок, отек легких, азотемическая уремия, спонтанный разрыв почек, отек головного мозга, паралич вегетативных центров. Основными клиническими синдромами ГЛПС являются: общетоксический, гемодинамический, почечный, геморрагический, абдоминальный и нейроэндокринный. Выделяют следующие периоды заболевания: начальный (лихорадочный), олигоурический (почечных и геморрагических проявлений), полиурический, реконвалесценции (ранний - до 2 месяцев и поздний - до 2-3 лет).

Заболевание ГЛПС может иметь тяжелое, среднее, легкое или стертое клиническое течение. Наличие легких и стертых форм ГЛПС обуславливает естественную иммунную прослойку населения по отношению к вирусам-возбудителям ГЛПС в природных очагах этой инфекции.

Перенесенная инфекция оставляет стойкий пожизненный типоспецифический иммунитет. Известны единичные случаи повторного заболевания.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

11. Диагностические исследования на ГЛПС в регламентированном объеме проводятся лабораториями диагностики особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (далее – ГУ РЦГЭ и ОЗ), областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (далее – ОЦГЭ и ОЗ), бактериологическими лабораториями инфекционных больниц и инфекционных отделений.

12. Организация и выполнение диагностических исследований на ГЛПС в лабораториях должны осуществляться в соответствии с требованиями, регламентирующими:

безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности, вся работа по выделению и дифференциации вируса ГЛПС из любого исследуемого материала должна проводиться в условиях, предупреждающих возможность инфицирования персонала и обсеменения возбудителем объектов внешней среды;

порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности согласно Руководству «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности» № 11-7-13-2002, утвержденному Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30 декабря 2002 г.

Взятие материала от больных с подозрением на ГЛПС инфекцию производится медицинскими работниками инфекционного стационара, где госпитализирован больной.

Для серодифференциации штаммов, изолированных от больных ГЛПС и грызунов – природных резервуаров хантавируса, отловленных в эндемичных по ГЛПС районах, материал, положительный на наличие специфических антител к вирусу ГЛПС и хантавирусного антигена, следует направлять в ГУ РНПЦЭМ или ГУ РЦГЭиОЗ для окончательной идентификации и дальнейшего изучения.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

13. Лабораторная диагностика ГЛПС инфекции начала успешно осуществляться после выделения вируса от полевой мыши и подбора чувствительной модели для размножения и накопления вируса. В результате были разработаны серологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования, позволяющие выявлять в крови больных и органах грызунов вирусспецифические антитела и антиген. В настоящее время для лабораторного подтверждения диагноза ГЛПС широко используются иммунологические методы исследования.

14. Иммунологические методы. В диагностической практике для специфической диагностики ГЛПС используются иммунологические методы исследования, обладающие высокой чувствительностью и строгой специфичностью: непрямой метод флуоресцирующих антител (далее - нМФА) и непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (далее - нТИФА). Данные методы предназначены для выявления антител в сыворотке крови больных ГЛПС и больных с подозрением на данное заболевание, обнаружения антител в сыворотке крови и антигена хантавируса в органах грызунов – природных носителей возбудителей ГЛПС.

Подготовка образцов для исследования. От больных ГЛПС или у подозрительных на ГЛПС лиц рекомендуется исследовать парные сыворотки крови. Диагностическим считается нарастание титра антител в повторной пробе крови в 4 и более раз: чем раньше от начала заболевания (до 4-го дня болезни) берется проба крови, тем выше вероятность, что в повторно взятой пробе крови будет выявлено диагностическое нарастание титров антител к вирусу ГЛПС (при взятии пробы крови позже 15 дня болезни нарастание титров антител к вирусу ГЛПС в повторно взятой сыворотке не выявляется).

Забор первой пробы крови необходимо проводить тотчас после предположения подозрения на ГЛПС, второй - через 5-7 дней после забора первой.

Если не удастся обнаружить антитела к вирусу ГЛПС в первых двух пробах крови, рекомендуется обследовать еще несколько (2-3) проб (при наличии явной клинической картины заболевания).

Забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или в стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой. При заборе в шприц кровь из него аккуратно переносят в одноразовую стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой без антикоагулянта (получение сыворотки). Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре (либо в термостате при 37⁰С) в течение 30 мин до образования сгустка крови, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования сыворотку отбирают стерильными наконечниками с фильтром в стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

Для проведения качественных и количественных исследований методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) используется плазма крови. Для получения плазмы забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Кровь из шприца аккуратно, без образования пены, переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8% раствор цитрата Na в соотношении 1:9). Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя (ингибирует ПЦР)! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 – 1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

До начала проведения исследований условия хранения образцов следующие.

Образцы цельной крови:

при температуре 2-25⁰С в течение 12 часов с момента взятия крови для качественного определения нуклеиновых кислот;

при температуре 2-8⁰С в течение 1 суток для качественного определения РНК/ДНК инфекционных агентов;

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Образцы плазмы и сыворотки:

при температуре 2-8⁰С – в течение 5 суток;

при температуре -70⁰С – длительно (не менее года).

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы плазмы или сыворотки для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1 - 0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Условия транспортирования предварительно обработанных проб осуществляют в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом.

Непрямой метод флуоресцирующих антител (нМФА). Для выявления специфических антител к вирусу ГЛПС в сыворотках крови больных и реконвалесцентов нМФА может быть использован любой диагностикум, позволяющий

определять специфические антитела М и G классов, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь. Основу таких диагностикумов составляют культуральные «слайды», представляющие взвесь в физиологическом растворе инфицированных вирусом клеток Vero E6 в концентрации 350000-400000 в 1 мл, нанесенную каплями в объеме 5 мкл на 24-луночные предметные стекла. После высушивания в течение 18 часов на воздухе, препараты фиксируются 20 минут холодным ацетоном и могут использоваться для постановки реакции. Подготовка исследуемого материала, проведение нМФА и учет результатов проводится согласно инструкции по применению диагностической тест-системы. При исследовании парных сывороток диагностическим считается нарастание титра антител в повторной пробе крови в 4 и более раз, в случае однократного взятия пробы крови, с учетом клинической симптоматики, серологическим подтверждением является наличие высокого титра антител (1:128 и выше) в исследуемой сыворотке крови.

Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (нТИФА). Специфичный, высокочувствительный и эффективный метод исследования для выявления антител в сыворотке крови больных ГЛПС и обнаружения антигена хантавируса в органах грызунов – природных носителей возбудителей ГЛПС.

Для выявления специфических антител в сыворотке крови от больных ГЛПС или у подозрительных на ГЛПС лиц методом нТИФА может быть использован любой диагностикум, позволяющий определять специфические антитела М и G классов на ранней стадии заболевания и специфические антитела класса G в сыворотках крови больных на поздней стадии инфекции (после 3-х недель от начала заболевания), а также у реконвалесцентов, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь. Подготовка исследуемого материала, проведение нТИФА и учет результатов проводится согласно инструкции по применению диагностической тест-системы.

При обследовании больных с явными клиническими проявлениями ГЛПС и соответствующим эпиданамнезом в 1-2% случаев антитела к вирусам-возбудителям ГЛПС могут быть не обнаружены. Это свидетельствует о возможном существовании серонегативных форм при этом заболевании.

15. Для выявления антигена хантавируса в органах грызунов – природных носителей возбудителей ГЛПС, может быть использован любой диагностикум, позволяющий выявлять антиген хантавируса в 10-20% суспензиях ткани органов мелких грызунов методом нТИФА, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь.

Сбор первичного (полевого) материала для исследований проводится согласно приложению 1 к настоящей Инструкции по применению.

Подготовка суспензии ткани органов грызунов для анализа.

Для исследования используется ткань легкого мелких грызунов, поскольку эпителиальные клетки легочной ткани являются одним из мест интенсивной репликации хантавирусов.

Готовят 10% либо 20% суспензии ткани легкого (вес/объем) на фосфатно-солевом буфере (далее - ФСБ) или на физиологическом растворе. Количество ткани легкого, взятого для приготовления суспензии, должно быть не менее 0,1 г вещества.

Дезинтеграцию ткани органа допускается проводить двумя способами:

разрушают ткань с использованием механического дезинтегратора любой марки, имеющего скорость вращения от 5000 до 30000 об/мин. В предварительно взвешенную пластиковую пробирку помещают кусочек ткани легкого, взвешивают и добавляют буферный раствор в количестве, необходимом для получения 10-20% суспензии (для получения 10% суспензии к 0,2 г ткани добавляют 2 мл раствора). Обработку дезинтегратором проводят в течение 30 сек на холоду, после чего полученную взвесь осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-30 минут при 4 ± 2 °С. Надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа, при необходимости полученную суспензию ткани легкого можно хранить в замороженном виде ($-20 - 80$ °С) не менее года. Допускается только однократное размораживание пробы;

разрушают ткань вручную. Для этого предварительно охлажденные фарфоровый пестик и ступка помещаются на лед, в ступку вносятся стерильный кварцевый песок (либо мелко колотое стекло) кусочек ткани легкого, предварительно взвешенный, и необходимый объем буферного раствора. После растирания ткани взвесь переносят в центрифужные пробирки, осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-30 мин при 4 ± 2 °С, надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа.

Дальнейшая подготовка проб для исследования, проведение нТИФА и учет результатов анализа осуществляются согласно инструкции по применению, прилагаемой к диагностической тест-системе.

Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими растворами (5% раствор перекиси водорода, либо 8% формалин, 3% хлорамин), а также дезинфицирующими средствами отечественного и зарубежного производства, разрешенных к применению Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Обработку проводить в течение не менее чем 24 час, после этого разрешается слив в общую канализационную сеть.

16. Выделение вируса ГЛПС в культуре клеток. Вирусы-возбудители ГЛПС (хантавирусы) культивируются в перевиваемых клетках почки зеленой мартышки Vero- E6 и клетках карциномы легкого человека А-549. Длительность культивирования вирусов Хантаан и Сеул на культуре клеток Vero- E6 составляет 5-7 дней, для вируса Пуумала – 10-14 дней. При размножении в культуре клеток Vero-E6 вирус ГЛПС не оказывает цитопатического действия на клетки.

При выделении вируса проводятся несколько слепых пассажей, во время которых для выявления вирусспецифического антигена в клетках, наличие которого свидетельствует о размножении вируса, используется непрямой метод флюоресцирующих антител (далее-нМФА). Выделение вируса в культуре клеток осуществляется инфицированием клеток Vero- E6 10-20% суспензией ткани легкого грызунов, которая по результатам предварительных исследований содержит хантавирусный антиген, либо пробой цельной крови, полученной от больного ГЛПС. Получение суспензии ткани органов грызунов производится в соответствии с пунктом 15 настоящей инструкции. Если суспензия используется для выделения вируса в культуре клеток, то в буферный раствор, либо физиологический раствор обязательно добавляют антибиотики: пенициллин и стрептомицин в концентрациях 100 ед./мл и 100 мкг/мл, соответственно.

Для выделения вируса 0,5 - 1,0 мл цельной крови или суспензии ткани легкого грызунов вносят на сформировавшийся монослой клеток, выращенных в стерильных пластиковых флаконах (25 см²). В качестве среды роста для культуры клеток используют среду Игла с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Непосредственно перед внесением инфекционного материала ростовую среду удаляют и монослой клеток промывают раствором Хенкса. Адсорбцию вируса на клетках проводят в течение 90 мин при температуре 36⁰С, после чего эритроциты крови и тканевой дебрис удаляют, промывают клетки раствором Хенкса, затем добавляют 5-7 мл среды поддержки на флакон. В качестве среды поддержки используют среду Игла с 2% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей пенициллин и стрептомицин в концентрациях 100 ед./мл и 100 мкг/мл, соответственно. Инкубируют в термостате при температуре 36⁰С. Период инкубации составляет 12-14 дней, в течение которых при изменении рН среды в сторону закисления (среда приобретает оранжево-желтый цвет) производится смена среды поддержки: аккуратно удаляется культуральная жидкость из флакона и вносится по 5-7 мл свежей среды поддержки.

После проведения первого пассажа культуральную жидкость удаляют, а клеточный монослой снимают с поверхности флакона 0,25% раствором трипсина. Затем клетки осаждают центрифугированием при 1500 – 2000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют и клетки ресуспендируют в 3 мл среды поддержки. Для проведения второго пассажа 1-2 мл полученной клеточной суспензии вносят во флаконы (25 см²) с клетками Vero-E6 (монослой клеток составляет от 50 до 70%). Все остальные манипуляции проводят как описано выше. При необходимости повторяют проведение пассажей на культуре клеток от 3-х до 5-ти раз аналогично описанному выше.

17.Молекулярно-генетические методы. Полимеразная цепная реакция с предварительной обратной транскрипцией (далее - ОТ-ПЦР) является высокочувствительным методом для выявления РНК хантавирусов в образцах крови больных ГЛПС, в секционном материале органов умерших людей, а также в пробах органов грызунов – носителей хантавирусов. Эффективность ОТ-ПЦР в значительной степени определяется источником и способом выделения нуклеиновых кислот, а ее специфичность и воспроизводимость – правильным выбором специфических олигонуклеотидов (праймеров).

Метод ОТ-ПЦР является эффективным для выявления РНК у больных ГЛПС в ранние сроки заболевания: установлено, что до 7 дня от начала заболевания процент обнаружения РНК в образцах крови больных составляет 100%, на 8-14 специфическая РНК была обнаружена у 57,1% больных, после 15 дня – 22,1%.

Для выявления РНК хантавирусов в клиническом (сыворотка и плазма крови больных ГЛПС) и полевом (органы грызунов) материале методом ОТ-ПЦР может быть использован любой диагностикум, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь.

Забор крови от больных и подготовка проб полевого материала для проведения исследований методом ОТ-ПЦР проводятся согласно описанному выше (раздел 14 «Подготовка образцов для исследования» и раздел 15 «Подготовка суспензии ткани органов грызунов для анализа», соответственно). Дальнейшая подготовка проб для исследования, проведение ОТ-ПЦР и учет

результатов анализа осуществляются согласно инструкции по применению, прилагаемой к диагностической тест-системе.

Устройство ПЦР-лаборатории и комплектация лаборатории оборудованием для постановки ПЦР-анализа (детекция методом электрофореза) проводятся согласно приложениям 2 и 3 к настоящей Инструкции по применению.

Сбор первичного материала для выявления хантавирусного антигена

1. Сбор первичного материала осуществляются в соответствии с Инструкцией 3.6.11-17-16-2003 «Организация зоолого-паразитологической работы при эпизоотологическом обследовании территорий, энзоотичных по природно-очаговым инфекциям», утвержденной Постановлением Главного государственного санитарного врача РБ от 11.08.2003 г. №86.

2. Для отлова мелких млекопитающих (грызунов, насекомоядных) применяются: плашки (давилки «Геро») с трапиком или без него. В качестве стандартной приманки используются поролон или кусочки хлебных корок (примерный объем – 0,5–1 см³), обработанные нерафинированным растительным маслом (для серых полевков используют кусочки моркови или арбузных корок);

разного рода живоловки (сетчатые или ящичного типа), либо сооружаются ловчие канавки или заборчики с вкопанными цилиндрами или конусами.

Грызуны, отловленные с использованием живоловок, помещаются в контейнеры и транспортируются в лабораторию, где производится забор органов.

Забор органов для исследования у животных, отловленных с использованием давилок, желательно производить не позднее 2-х часов с момента их умерщвления.

3. Материал, который не подвергается немедленной обработке, помещают на хранение в морозильник (от -20 до -80 °С).

4. Транспортировка образцов, в случае необходимости, в другие учреждения должна осуществляться с использованием холодной цепи.

Устройство ПЦР-лаборатории

ПЦР – лаборатория должна быть разделена на три зоны – по числу технологических операций:

- зона подготовки реакционной смеси («чистая зона»);
- зона пробоподготовки;
- зона детекции.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками. Желательно иметь устройство фильтрации воздуха. Зона детекции должна размещаться как можно дальше от двух других зон (при возможности – другой этаж) и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции.

Наименование помещения	Проводимые операции	Выполнение работ
Зона подготовки реакционной смеси «чистая зона»	Приготовление реакционных смесей для ОТ и ПЦР	ПЦР-бокс, снабженный лампами дневного и ультрафиолетового (далее - УФ) света
Зона пробоподготовки	Обработка образцов с целью выделения РНК, ДНК. Внесение в реакционную смесь препаратов РНК и ДНК.	Ламинарный бокс с вертикальным потоком воздуха для безопасности персонала при работе с инфекционным материалом и лампами УФ света.
Зона детекции	Анализ продуктов ПЦР – электрофореза	Боксовая комната, снабженная лампами УФ света

Амплификатор, необходимый для постановки ПЦР-анализа, желательно разместить в отдельном помещении.

Перемещение пробирок, штативов и других предметов должно производиться только в направлении из «чистой» зоны в зоны пробоподготовки и детекции.

Все операции (пробоподготовка, подготовка реакционной смеси, электрофорез) должны выполнять разные люди.

Комплектация лаборатории оборудованием для постановки
ПЦР-анализа (детекция методом электрофореза)

1. Зона пробоподготовки:

Ламинар – с вертикальным потоком II-класс защиты
Твердотельный термостат
Микроцентрифуга с оборотами вращения не менее 12000 об/мин;
Центрифуга (вортекс);
Дозаторы автоматические с переменным объемом;
Штатив для дозаторов;
Штатив для хранения пробирок;
Насос с колбой-ловушкой.

2. Зона приготовления реакционной смеси:

Ламинар типа «ПЦР»-бокс;
Центрифуга (вортекс);
Дозаторы автоматические с переменным объемом;
Штатив для дозаторов;
Штатив для хранения пробирок.

3. Зона детекции – проведения электрофореза.

Блок питания для электрофореза;
Камера для электрофореза;
Трансиллюминатор;
Видеосистема для документирования результатов электрофореза;
Дозаторы автоматические с переменным объемом;
Штатив для дозаторов.

4. Отдельно находится амплификатор (термоциклер), с возможностью программирования и контроля за процессом амплификации.