

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование  
Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ  
3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

**ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ  
И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА  
И ЖИВОТНЫХ**

Методические рекомендации  
МР 4.2/3.1. *0422*-26

Москва 2026

**Организация проведения работ по выявлению и характеристике штаммов вируса гриппа человека и животных.**  
МР 4.2/3.1. *0422* -26

1. Разработаны Федеральной службой в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е.Б. Ежлова, Ю.В. Очкасова, А.А. Шулепина, Н.В. Фролова, Е.С. Керноз); ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Т.Н. Ильичева, В.Ю. Марченко, Н.П. Колосова, Г.С. Онхонова, С.В. Святченко, А.С. Гудымо, М.Л. Егорова, С.С. Бебешева, Л.Н. Шишкина, А.А. Сергеев, А.П. Агафонов).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «15» ИЮНЯ 2026 г.

3. Введены впервые

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации



*А.Ю. Попова*  
А.Ю. Попова

«15» *марта* 2026 г.

Дата введения «14» *августа* 2026 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ  
3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

**ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ  
И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ЧЕЛОВЕКА  
И ЖИВОТНЫХ**

Методические рекомендации  
МР 4.2/3.1. *0422-26*

**I. Область применения**

1.1. Настоящие методические рекомендации (далее – МР) описывают рекомендуемые подходы к организации и проведению работ по индикации, идентификации, выделению и характеристике вирусов гриппа в рамках эпидемиологического надзора за гриппом, в том числе во время вспышек зоонозного гриппа.

1.2. Настоящие МР предназначены для специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами научно-исследовательских и медицинских организаций, других заинтересованных служб и ведомств независимо от ведомственной принадлежности и форм собственности.

1.3. МР разработаны с целью унификации подходов к процедурам по выделению вирусов гриппа человека и животных в культуре клеток и куриных эмбрионах, углубленному исследованию молекулярно-биологических и серологических характеристик, тестированию лекарственной чувствительности к этиотропным противовирусным препаратам.

1.4. Информация о циркулирующих вариантах вируса гриппа необходима для разработки прогноза эпидемиологической и эпизоотологической ситуации, выбору вакцинных штаммов, а также для корректировки санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по профилактике гриппа.

1.5. Мониторинг сезонного и высокопатогенного гриппа является обязательным элементом эпидемиологического надзора. В рамках мониторинга циркулирующих вариантов вируса гриппа решаются следующие задачи:

- мониторинг за циркуляцией вирусов сезонного гриппа;
- мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа птиц и других животных;
- выявление штаммов вируса гриппа с пандемическим потенциалом;
- выявление эпидемических вариантов вируса гриппа, отличающихся по молекулярно-биологическим и антигенным свойствам от вакцинных штаммов;
- выявление вариантов вируса гриппа, устойчивых к этиотропным противовирусным препаратам.

1.6. МР носят рекомендательный характер.

## II. Общие положения

2.1. Грипп входит в группу острых респираторных инфекций (ОРИ) и является острой вирусной инфекционной болезнью в основном с воздушно-капельным путем передачи возбудителя, характеризуется острым началом, лихорадкой (с температурой плюс 38 °С и выше), общей интоксикацией и поражением дыхательных путей. Сезонный грипп встречается во всем мире и ежегодно поражает примерно 5 – 10 % взрослых и 20 – 30 % детей. Заболевание вызывается вирусами гриппа. Вирусы гриппа принадлежат к семейству *Orthomyxoviridae*, которые далее классифицируются на *Alphainfluenzavirus* (вирусы гриппа А), *Betainfluenzavirus* (вирусы гриппа В), *Deltainfluenzavirus* (вирусы гриппа D) и *Gammainfluenzavirus* (вирусы гриппа С) [1].

2.2. Вирусы гриппа А и В являются наиболее значимыми с точки зрения заболеваемости людей, они вызывают ежегодные эпидемии. Грипп А может вызывать пандемии гриппа. Грипп С встречается реже и обычно вызывает более легкие респираторные инфекции, чем грипп А и В. Грипп D до сих пор поражал исключительно животных (в основном крупный рогатый скот).

Эпидемии гриппа происходят почти каждый год, частота и тяжесть вызываемых ими заболеваний могут существенно варьировать от сезона к сезону. На тяжесть ежегодных эпидемий влияет несколько факторов, таких как типы, подтипы и варианты циркулирующих вирусов, уровень защитных антител у населения [2].

Обычно количество гриппоподобных заболеваний начинает возрастать осенью, периоды пиковой активности гриппа приходятся на период с декабря по март. Однако вирусы гриппа могут спорадически выявляться в течение всего года.

2.3. Помимо ежегодных сезонных эпидемий гриппа, случаются пандемии гриппа, происходит это нечасто и через нерегулярные промежутки времени. Во всех возрастных группах заболеваемость гриппом обычно выше во время пандемий, чем во время ежегодных эпидемий.

В течение XX века произошло три пандемии [3].

– 1918 – 1919 гг. – пандемия «испанки» A(H1N1) привела к гибели более 50 миллионов человек во всем мире. Почти половина этих смертей приходится на людей в возрасте 20 – 40 лет, а среди беременных женщин сообщалось о летальности до 30 %;

– 1957 – 1958 гг. – пандемия «азиатского гриппа» A(H2N2), с ней была связана общая избыточная смертность более 1 млн человек в мире;

– 1968 – 1969 гг. – глобальная избыточная смертность, вызванная пандемией «гонконгского гриппа» A(H3N2), оценивается примерно в 1 млн человек.

Первая пандемия XXI века – пандемия «свиного» гриппа A(H1N1)pdm09 2009 – 2010 гг., от 75 тыс. до полумиллиона человек умерли от осложнений, связанных с вирусной инфекцией [4].

Наиболее высокая заболеваемость при гриппе отмечается в группах риска:

- детей в возрасте до 2 лет;
- людей любого возраста с хроническими заболеваниями (заболевания сердечно-сосудистой системы и легких, диабет, почечная недостаточность, иммунодефицит);
- людей в возрасте 65 лет и старше;
- беременных женщин.

Смертельные случаи наблюдаются при гриппе, осложненном пневмонией с дыхательной недостаточностью, или могут произойти отсрочено (в течение примерно 2 месяцев после острого периода) вследствие обострения хронических заболеваний сердечно-сосудистой системы, легких, метаболических нарушений.

2.4. Вирусы гриппа распространяются в основном воздушно-капельным путем. Человек также может заразиться гриппом, прикоснувшись к поверхности или предмету, загрязненным вирусом гриппа, а затем коснувшись рта, носа, глаз.

Инфицирование вирусами сезонного гриппа может привести к бессимптомному заражению или к заболеванию разной степени тяжести. К распространенным симптомам относятся высокая температура, кашель, боль в горле, заложенный нос или насморк, мышечные боли, головные боли. Тяжелые последствия заражения гриппом могут привести к госпитализации или смерти, особенно в группах высокого риска, таких как пожилые люди, маленькие дети, беременные женщины и люди с хроническими заболеваниями [5].

В настоящее время среди людей циркулируют два подтипа вирусов сезонного гриппа А – A(H3N2) и A(H1N1)pdm09 и две линии гриппа В (В/Victoria и В/Yamagata), однако вирусы линии В/Yamagata не обнаруживались с 2020 года.

2.5. В редких случаях возможно заражение человека непосредственно вирусами гриппа животных. Заражение вирусом птичьего гриппа варьируется по

степени тяжести от отсутствия симптомов или легкой болезни до тяжелого заболевания, часто с летальным исходом. Признаки и симптомы могут включать: конъюнктивит, легкие гриппоподобные симптомы верхних дыхательных путей, пневмонию, лихорадку, кашель, боль в горле, насморк или заложенный нос, мышечные боли, головные боли, одышку или затрудненное дыхание. Менее распространенные признаки и симптомы включают диарею, тошноту, рвоту или судороги. Высокопатогенные вирусы птичьего гриппа А/Н5N1, А/Н5N6, А/Н7N9 были ответственны за большинство заболеваний людей от вирусов птичьего гриппа, зарегистрированных во всем мире на сегодняшний день, включая самые серьезные заболевания с высокой смертностью<sup>1</sup>.

2.6. Инфицированные птицы распространяют вирусы гриппа через слюну, слизистые и фекалии. У других животных, инфицированных вирусами птичьего гриппа, вирус может присутствовать в респираторных выделениях, различных органах, крови или в других жидкостях организма, включая молоко животных. Заражение человека вирусами птичьего гриппа может произойти, когда вирус попадает в глаза, нос или рот человека. Недавно вирусы гриппа А/Н5N1 были обнаружены на молочных фермах в США и распространились на стада в семнадцати штатах, что привело по меньшей мере к девяти подтвержденным случаям заражения людей через молоко [6].

У домашней птицы штаммы вируса гриппа А с низкой патогенностью могут вызывать субклинические инфекции; иногда вызывают респираторные признаки или снижение яйценоскости. Штаммы с высокой патогенностью обычно вызывают широко распространенную органную недостаточность, характеризующуюся поражением кровеносной и центральной нервной систем, органов дыхания, пищеварения, выделения и яйцеобразования, часто с высокими показателями смертности.

2.7. Грипп свиней это высококонтагиозная, остропротекающая вирусная болезнь, характеризующаяся внезапным повышением температуры тела до плюс 41 – 42 °С, вялостью, отказом от корма, конъюнктивитом, слизистым истечением из носовой полости, чиханием и кашлем. В области пятачка образуются струпьевидные корки.

Иногда люди могут заразиться вирусами свиного гриппа, находясь в тесном контакте с инфицированными животными или загрязненной средой. Передача вирусов свиного гриппа от человека к человеку встречается редко, и большинство случаев заражения людей не приводят к дальнейшей передаче. Заражение человека вирусами свиного гриппа обычно вызывает легкие клинические

---

<sup>1</sup> Пункт 2657 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 № 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный № 67587); от 25.05.2022 № 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный № 68934); от 25.06.2025 № 12 (зарегистрировано Минюстом России 25.07.2025, регистрационный № 83058) (далее – СанПиН 3.3686-21).

симптомы, похожие на симптомы сезонного гриппа, такие как лихорадка, головная боль, респираторные признаки. Однако может возникнуть более тяжелое заболевание, и некоторые случаи закончились летальным исходом [7].

2.8. Вирусы сезонного гриппа и низкопатогенные вирусы гриппа животных относятся к III группе патогенности, высокопатогенные вирусы гриппа А относятся к II группе патогенности<sup>2</sup>.

2.9. С целью обеспечения прав граждан на благоприятную среду обитания, факторы которой не оказывают вредного воздействия на человека<sup>3</sup>, на базе ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора созданы и работают научно-методический центр по референс-диагностике и изучению высокопатогенных штаммов вируса гриппа, референс-лаборатория ВОЗ по диагностике гриппа Н5 и сотрудничающий центр ВОЗ по гриппу в точках пересечения экосистем людей и животных<sup>4</sup>, в задачи которых входит выявление и изучение вирусов гриппа с пандемическим потенциалом.

### III. Организация лабораторных исследований вирусов гриппа

#### 3.1. Материал для исследования.

3.1.1. Клинический и аутопсийный материал от человека: мазки со слизистой оболочки носоглотки (ротоглотки); мокрота, аспираты из зева; эндотрахеальный аспират; бронхоальвеолярная жидкость; промывные воды бронхов; мазки с конъюнктивы; фекалии, сыворотка крови; тканевый (аутопсийный) материал (ткани легких, трахеи, сегментарных бронхов, селезенки).

3.1.2. Биологический материал от животных, в том числе, птиц: трахеальные и клоакальные мазки; пробы фекалий; биологические жидкости и фрагменты внутренних органов птиц, птенцов; яйца птиц; фекалии птиц и (или) мазок из клоаки и трахеи; околородные биотопы мелких млекопитающих; вода и ил в местах гнездований; секционный материал (фрагменты трахеи, легких, селезенки, мозга, синусы, воздухоносные мешки, кишечник от забитой или павшей птицы, птенцов, а также мелких млекопитающих); мазки из носа и молоко крупного рогатого скота.

3.1.3. Материалом для исследований являются культуры вирусов гриппа.

<sup>2</sup> Приложение 1 СанПиН 3.3686-21.

<sup>3</sup> Статья 8 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (далее – Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ); статья 3 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ).

<sup>4</sup> Приказ Роспотребнадзора от 10.05.2007 № 144 «О создании научно-методического центра по референс-диагностике и изучению высокопатогенных штаммов вируса гриппа» (далее – приказ Роспотребнадзора от 10.05.2007 № 144); приказ Роспотребнадзора от 24.08.2009 № 596 «Об организации работы референс-лаборатории ВОЗ по диагностике гриппа Н5» (далее – приказ Роспотребнадзора от 24.08.2009 № 596).

3.2. Организация проведения работ по лабораторной диагностике гриппа человека и животных осуществляется в соответствии с приказом Роспотребнадзора<sup>5</sup>, а также методическими документами<sup>6</sup>.

Мероприятия по эпидемиологическому надзору за гриппом оформляются постановлением Главного государственного санитарного врача по субъекту Российской Федерации, в котором определяются лаборатории для проведения исследований гриппа человека и животных, а также лица, ответственные за организацию исследований и проведение этой работы<sup>7</sup>. В развитие постановления Главного государственного санитарного врача по субъекту Российской Федерации издается приказ органа управления здравоохранением субъекта Российской Федерации.

3.3. Мероприятия по эпидемиологическому надзору за гриппом ежегодно включаются в планы работы территориальных органов Роспотребнадзора<sup>8</sup>.

3.4. Мониторинг гриппа с целью предотвращения циркуляции в человеческой популяции вирусных штаммов с пандемическим потенциалом включает:

- исследование методами амплификации нуклеиновых кислот (далее – МАНК) клинического и аутопсийного материала на наличие рибонуклеиновой кислоты (далее – РНК) вирусов гриппа человека и животных;
- исследование с использованием МАНК биологического материала от птиц, свиней и других млекопитающих на наличие РНК вирусов гриппа с пандемическим потенциалом;
- выделение вирусного изолята в куриных эмбрионах и (или) культурах клеток, чувствительных к вирусам гриппа животных;
- характеристика выделенного штамма;
- углубленное изучение возбудителя, изолированного от людей, имевших контакт с домашней или дикой птицей;

<sup>5</sup> Приказ Роспотребнадзора от 24.07.2015 № 627 «О совершенствовании мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа».

<sup>6</sup> МУК 4.2.2136-06 «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 09.11.2006 (далее – МУК 4.2.2136-06); Методические рекомендации по организации мониторинга заносов и распространения гриппа птиц в природных условиях на территории Российской Федерации, утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 26.12.2008 № 01/15701-8-34 (далее – МР 01/15701-8-34).

<sup>7</sup> Глава V МР 3.1.0417-26 «Санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия при выявлении случаев «возвращающихся» инфекций, общих для человека и животных», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 10.04.2026.

<sup>8</sup> Приказ Роспотребнадзора от 10.05.2007 № 144; приказ Роспотребнадзора от 24.08.2009 № 596.

– серомониторинг – исследование в реакции торможения гемагглютинации (далее – РТГА) сывороток крови людей на наличие антител к вирусам сезонного и зоонозного гриппа.

3.5. С целью выявления эпидемических вариантов вируса гриппа, отличающихся по молекулярно-биологическим и антигенным свойствам от вакцинных штаммов, углубленное исследование первичного материала рекомендуется проводить в случаях, если образцы собраны от первых заболевших гриппом в текущем эпидемическом сезоне, от лиц со вспышек гриппа в организованных коллективах, от больных беременных женщин (выборочно), от заболевших людей, вакцинированных гриппозной вакциной накануне текущего эпидсезона, а также в случаях тяжелого и атипичного течения гриппа, включая заболевания с летальным исходом, от больных гриппом работников животноводческих хозяйств, фермеров, лиц, имевших контакт с домашней или дикой птицей, от больных, положительных на грипп в межэпидемический период.

3.6. Результаты исследования клинического, аутопсийного и биологического материалов на наличие вирусной РНК или вируса гриппа зависят от своевременного сбора качественных образцов, соблюдения сроков и условий транспортировки и хранения (приложение 1 к настоящим МР). Клинические и первичные серологические образцы острой фазы собирают в течение 3 дней с момента появления клинических симптомов. Повторное замораживание-размораживание образцов является нежелательным, следует стремиться к минимизации количества циклов заморозки-разморозки, в том числе посредством поддержания холодной цепи во время транспортировки.

3.7. Первичное исследование образцов методом полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) на наличие РНК вируса гриппа проводят сотрудники учреждений Роспотребнадзора, медицинских организаций<sup>9</sup>.

3.8. В случае обнаружения в первичном материале РНК вируса гриппа субтипов А/Н5 и А/Н7, первичный материал направляют в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Дальнейшие исследования проводят в соответствии с нормативными требованиями работы с патогенными биологическими агентами (далее – ПБА) II группы патогенности. Если далее документально подтвердилось, что штаммы вируса не относятся к высокопатогенным, работы проводят в соответствии с требованиями к обеспечению биологической безопасности при работе с ПБА III группы патогенности<sup>10</sup>.

<sup>9</sup> Приложение 1 постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера» (зарегистрировано Минюстом России 24.03.2016 регистрационный № 41525), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 20.04.2016 № 48 (зарегистрировано Минюстом России 11.05.2016, регистрационный № 42072) (далее – постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11); глава VI МР 3.1.0117-17 «Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 06.09.2017 (далее – МР 3.1.0117-17).

<sup>10</sup> Глава IV СанПиН 3.3686-21.

#### IV. Методологические подходы к исследованию вируса гриппа

4.1. О случаях обнаружения в клиническом или аутопсийном материале РНК вирусов гриппа животных необходимо оперативно информировать Роспотребнадзор, а первичные образцы должны быть отправлены в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора<sup>11</sup>.

4.2. Все работы с материалом, подозрительным на зараженность вирусом гриппа, проводятся в соответствии с требованиями к обеспечению биологической безопасности при работе с ПБА II или III группы патогенности<sup>12</sup>.

4.3. Исследование включает следующие тесты: метод ПЦР в режиме реального времени (далее – ПЦР-РВ), исследование образца на наличие вируса гриппа в культуре клеток и (или) в куриных эмбрионах, типирование и субтипирование изолята вируса гриппа, исследование лекарственной чувствительности, полногеномное секвенирование (при необходимости).

4.3.1. Подтверждение методом ПЦР-РВ наличия в первичном образце РНК вируса гриппа А и (или В); определение подтипа гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А в первичном образце методом ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

4.3.2. Исследование образца на наличие вируса гриппа в культуре клеток и (или) в куриных эмбрионах. В случае положительного результата – выделение штамма вируса гриппа.

4.3.3. Типирование и субтипирование изолята вируса гриппа методами амплификации нуклеиновых кислот и в РТГА с помощью референс-сывороток.

4.3.4. Исследование лекарственной чувствительности штамма вируса гриппа к этиотропным препаратам.

4.3.5. В случаях, когда штамм вируса гриппа, выделенный от человека, существенно отличается от вакцинного штамма (отличие в 8 и более раз по титрам РТГА, или нет взаимодействия с референс-сыворотками в серологических тестах, или изолят относится к вирусу гриппа А субтипов H2, H4 – H18), определяют нуклеотидную последовательность генома вируса.

4.3.6. О случаях обнаружения в клиническом или аутопсийном материале вирусов гриппа, существенно отличающихся от вакцинных штаммов по антигенным (титр в РТГА с сывороткой к вакцинному штамму отличается в 4 и более раз от титра с гомологичным штаммом) и (или) молекулярно-генетическим свойствам, а также относящихся к вирусам гриппа животных (особое внимание уделить аминокислотам в положении 627 белка PB2 и в сайте протеолиза в гемагглютинине – аминокислоты 339 – 348), информировать Роспотребнадзор в оперативном порядке<sup>13</sup>.

<sup>11</sup> Приказ Роспотребнадзора от 30.09.2013 № 714 Об организации мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа птиц; приказ Роспотребнадзора от 04.08.2016 № 842 «Об организации опорных баз по мониторингу за вирусом гриппа с пандемическим потенциалом».

<sup>12</sup> Глава IV, приложение 1 СанПиН 3.3686-21.

<sup>13</sup> Приложение 2 постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера» (зарегистрировано Минюстом России 24.03.2016, регистрационный № 41525), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 20.04.2016 № 48 (зарегистрировано Минюстом России 11.05.2016, регистрационный № 42072).

4.3.7. В случаях, когда штамм вируса гриппа, выделенный от птиц, принадлежит к субтипу А/Н5, А/Н7, А/Н9N2, необходимо определить нуклеотидную последовательность генома вируса или, при невозможности полногеномного секвенирования, определить полную или частичную нуклеотидную последовательность гена гемагглютинаина (выполнить полногеномное секвенирование или фрагментарное секвенирование гена гемагглютинаина с использованием доступных методов) и информировать Роспотребнадзор в оперативном порядке<sup>14</sup>.

## **V. Типирование и субтипирование изолята вируса гриппа методом амплификации нуклеиновых кислот**

Типирование и субтипирование изолята вируса гриппа с использованием МАНК проводят в соответствии с методическими документами<sup>15</sup>.

### **5.1. Этапы МАНК-анализа.**

5.1.1. Предварительная обработка и подготовка биологического материала.

5.1.2. Подготовка НК к амплификации: на данной стадии происходит очистка нуклеиновых кислот от других компонентов биологического происхождения, содержащихся в образце (белков, жиров, углеводов, солей).

5.1.3. Подготовка к амплификации включает синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – кДНК) на матрице РНК в ходе реакции обратной транскрипции.

5.1.4. Амплификация и детекция продуктов амплификации: в варианте ПЦР-РВ (детекция проводится в процессе амплификации). При этом методе синтез каждой новой копии исследуемого фрагмента ДНК сопровождается освобождением молекулы флуоресцентного красителя, накопление флуоресценции фиксирует система детекции амплификатора.

### **5.2. Характеристика метода ПЦР-РВ.**

ПЦР-РВ может давать как качественный, так и количественный (полуколичественный) результат, поскольку результаты образцов в пороговых циклах (Ct) можно экстраполировать с помощью калибровочной кривой с образцами с известной концентрацией определяемых молекул РНК. Результаты выдают в виде «положительных» или «отрицательных» на наличие РНК вируса гриппа определенной антигенной специфичности, а Ct служит относительной мерой концентрации вирусной РНК. Форма выдачи результата ПЦР (протокол, отчет) может быть в двух видах: если результат полуколичественный, то отчет выдают в виде значений пороговых циклов (Ct), где указывают положительные и отрицательные значения по тестируемому генетическому маркеру; если метод количественный, то результат выдают в виде концентраций (геном-эквивалентах на миллилитр) в исходных образцах, рассчитанных относительно образцов с известными концентрациями (калибраторы).

### **5.3. Безопасность работы с изолятами вируса гриппа.**

<sup>14</sup> МУК 4.2.2136-06; МР 01/15701-8-34.

<sup>15</sup> МР 3.1.0117-17.

Все работы, связанные с амплификацией нуклеиновых кислот, проводят в соответствии с нормативными требованиями<sup>16</sup>.

Все работы в лаборатории проводятся при нормальных показателях микроклимата:

- температура окружающего воздуха плюс 18 – 27 °С;
- относительная влажность 15 – 80 %.

#### 5.4. Предварительная обработка и подготовка биологического материала.

В работе используют тест-системы (наборы), зарегистрированные и разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке<sup>17</sup>.

5.4.1. Предварительная обработка и подготовка клинического и аутопсийного материала от человека, биологического и секционного материала от животных проводится в соответствии с нормативными документами<sup>18</sup> в зоне пробоподготовки.

Образцы цельного молока, используемые для анализа, должны быть свежими (хранение и транспортировка при температуре плюс 4 °С до 48 часов, при температуре минус 20 °С до 7 суток). Для экстракции нуклеиновой кислоты (далее – НК) отбирают 100 мкл образца. При постановке анализа образцы должны быть прогреты до комнатной температуры (плюс 22 – 25 °С).

#### 5.4.2. Подготовка лизирующего буфера.

Прогревают лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 при температуре плюс 60 – 65 °С в термостате до полного растворения кристаллов, если это предусмотрено инструкцией к набору.

#### 5.4.3. Приготовление пробирок для внесения проб.

Отбирают необходимое количество одноразовых пробирок, включая пробирки для отрицательного и положительного контролей выделения, если это необходимо. Вносят в каждую пробирку 10 мкл внутреннего контроля качества (далее – ВКО), если он предусмотрен для анализа данного генетического маркера возбудителя инфекции. Затем вносят лизирующий раствор, в соответствии с инструкцией производителя.

5.4.4. Если используют набор для выделения РНК с применением сорбента, добавляют по 450 – 500 мкл лизирующего раствора (в соответствии с инструкцией). Если используется метод высаливания с помощью хаотропных агентов, то их добавляют по 300 мкл, или другой указанный в инструкции объем. Маркируют пробирки, в соответствии с кодировкой, присвоенной образцам.

#### 5.4.5. Внесение проб в пробирки с лизирующим буфером.

В боксе микробиологической безопасности (далее – БМБ) II класса вносят в пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) по 100 мкл пробы

<sup>16</sup> МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009.

<sup>17</sup> Статья 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684).

<sup>18</sup> МР 3.1.0117-17.

(приложения 1 – 2 к настоящим МР), используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (далее – ОК) выделения вносят 100 мкл отрицательного контрольного образца (далее – ОКО) из коммерческого набора реагентов или деионизованной воды. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения вносят 90 мкл ОКО и 10 мкл положительного контрольного образца (ПКО) из коммерческого набора реагентов, если он предусмотрен для анализа.

Плотно закрытые пробы тщательно перемешивают на вортексе, прогревают при температуре плюс 65 °С в течение 15 минут. Центрифугируют пробирки 5 секунд при относительном ускорении центрифуги 1500 g для удаления капель с внутренней поверхности крышки. После выполнения данных процедур материал является обеззараженным. Пробирки передают через передаточный модуль в зону выделения НК.

#### 5.5. Подготовка к работе по выделению НК.

5.5.1. Непосредственно перед началом работы в БМБ II класса или ПЦР-боксах (если используются) проводят обработку внутренних поверхностей и предметов в нем 70° этиловым спиртом, размещают необходимое количество расходных материалов (пластиковые наконечники, пробирки, штативы), емкости для отработанных материалов (использованные наконечники, пробирки), наполненные на 1/3 объема дезинфицирующим раствором. БМБ II класса и ПЦР-боксы облучаются ультрафиолетом в течении 15 – 30 минут.

5.5.2. Проводят процедуру подготовки к работе согласно инструкции по применению набора реагентов для выделения НК из образцов с последующим получением кДНК и манипуляций с ней для определения РНК вируса гриппа А методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

5.5.3. Если это указано в инструкции к набору, перемешать реактивы и осадить капли с крышки центрифугированием или вручную.

5.6. Выделение РНК из анализируемых образцов с использованием сорбента.

5.6.1. Образцы материала в лизирующем буфере центрифугируют 5 секунд при 1500 g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Тщательно перемешивают сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляют по 25 мкл сорбента. Перемешивают на вортексе, оставляют в штативе на 1 минуту, еще раз перемешивают и оставляют на 5 минут.

5.6.2. Центрифугируют пробирки для осаждения сорбента 30 секунд при 6000 – 7000 g на микроцентрифуге. Удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный насос и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.6.3. Добавляют в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1. Перемешивают на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугируют 30 секунд при 6000 – 7000 g на микроцентрифуге. Удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный насос и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.6.4. Добавляют в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3. Тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе. Центрифугируют 30 секунд при 6000 – 7000 g на микроцентрифуге. Удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный насос и отдельный наконечник для каждой пробы.

5.6.5. Повторяют отмывку раствором для отмывки 3.

5.6.6. Добавляют в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе, центрифугируют 30 секунд при 6000 – 7000 g на микроцентрифуге. Полностью удаляют надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный насос.

5.6.7. Помещают пробирки в термостат при температуре плюс 60 °C на 12 – 15 минут для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

5.6.8. В пробирки добавляют по 50 мкл РНК-буфера или деионизованной воды, не содержащей ДНКазы и РНКазы, используя наконечник с аэрозольным барьером, свободный от РНКаз. Перемешивают на вортексе. Помещают в термостат при температуре плюс 60 °C на 2 – 3 минуты. Перемешивают на вортексе и центрифугируют пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (RCF: 10000 – 11000 g) в течение 1 минуты.

5.6.9. Очень осторожно отбирают надосадочную жидкость, не захватывая сорбент, и переносят ее в стерильную пробирку. Если в надосадочную жидкость попал сорбент, осаждают его на центрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации. Очищенную РНК хранят не более 4 часов при температуре плюс 2 – 8 °C. Для длительного хранения препарата переносят надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранят при температуре не выше минус 18 °C в течение месяца, или не выше минус 68 °C в течение года.

5.7. Выделение РНК методом высаливания.

5.7.1. Полученные образцы центрифугируют 5 секунд при 1500 g на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки и прогревают 5 минут при температуре плюс 65 °C в термостате. Добавляют в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешивают на вортексе.

5.7.2. Центрифугируют пробирки на микроцентрифуге в течение 5 минут при 10000 g.

5.7.3. Аккуратно отбирают надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный насос и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

5.7.4. Добавляют в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрывают крышки, осторожно промывают осадок, переворачивая пробирки 3 – 5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого накрывают пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижимают их и переворачивают штатив.

5.7.5. Центрифугируют при 10000 g в течение 1 – 2 минут на микроцентрифуге.

5.7.6. Осторожно, не захватывая осадок, отбирают надосадочную жидкость, используя вакуумный насос и отдельный наконечник.

5.7.7. Добавляют в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрывают крышки и осторожно промывают осадок, переворачивая пробирки 3 – 5 раз.

5.7.8. Центрифугируют при 10000 g в течение 1 – 2 минут на микроцентрифуге.

5.7.9. Осторожно, не захватывая осадок, отбирают надосадочную жидкость, используя вакуумный насос и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

5.7.10. Помещают пробирки в термостат при температуре плюс 65 °С на 5 минут для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

5.7.11. Добавляют в пробирки по 50 мкл РНК-буфера или деионизованной воды, не содержащей ДНКазы и РНКазы. Перемешивают на вортексе. Помещают в термостат при температуре плюс 65 °С на 5 минут, периодически встряхивая на вортексе. Допускается, при необходимости, увеличение объема элюции до 90 мкл.

5.7.12. Центрифугируют пробирки при 10000 g в течение 1 минуты на микроцентрифуге.

Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации. Реакцию обратной транскрипции рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК. Очищенная РНК может храниться не более 4 часов при температуре плюс 2 – 8 °С. Для длительного хранения препарата переносят надосадочную жидкость в стерильную пробирку и хранят при температуре не выше минус 18 °С в течение месяца, или не выше минус 68 °С в течение года. Допускается однократное замораживание-оттаивание проб РНК.

5.8. Реакция обратной транскрипции (далее – ОТ).

5.8.1. Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием наборов, зарегистрированных в установленном порядке, согласно инструкции производителя.

5.8.2. Отбирают необходимое количество микропробирок объемом 0,2 или 0,5 мл.

5.8.3. Готовят реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix вносят 5 мкл RT-G-mix-1 (RT-G-mix-2) (или аналогичные реагенты в соответствии с инструкцией производителя), тщательно перемешивают на вортексе, осаждают капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

5.8.4. К полученному раствору добавляют 6 мкл ревертазы, пипетируют 5 – 6 раз, перемешивают на вортексе. Осаждают капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием 5 секунд при 1500 g.

5.8.5. Вносят в микропробирки по 10 мкл готовой реакционной смеси.

5.8.6. Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавляют по 10 мкл РНК-пробы в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешивают пипетированием.

5.8.7. Ставят пробирки в термостат с температурой плюс 36,5 – 37,5 °С на 30 минут.

5.8.8. Полученную кДНК разводят в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавляют 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешивают пипетированием 10 – 11 раз).

Готовый препарат кДНК можно использовать в постановке ПЦР, либо хранить при температуре не выше минус 16°C в течение недели или в течение года при температуре не выше минус 68 °С.

#### 5.9. Реакция амплификации (ПЦР).

ПЦР проводят с использованием одного из наборов, зарегистрированных на территории Российской Федерации в установленном порядке<sup>19</sup>, в соответствии с инструкциями производителя.

#### 5.10. Постановка ПЦР на примере набора для выявления вирусов гриппа А и В.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

5.10.1. Отбирают необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B* для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедитесь, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.

5.10.2. На поверхность воска наносят по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна попадать под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *Influenza virus A/B*.

5.10.3. В подготовленные пробирки вносят по 10 мкл проб кДНК, полученных в реакции ОТ.

#### 5.10.4. Постановка контрольных реакций:

а) отрицательный контроль ПЦР (маркируется как К-) – вносят в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.

б) положительный контроль ПЦР (маркируется как К+) – вносят в пробирку 10 мкл контрольного образца из комплекта диагностического набора (ПКО).

в) отрицательный контроль экстракции (маркируется как В-) – вносят в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОК.

#### 5.11. Амплификация с детекцией в режиме «реального времени».

5.11.1. Программируют прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 5.1).

Таблица 5.1

### Критерии для программирования амплификатора

Стадии	Температура (°С)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	05:00 (вариант FRT) 15:00 (вариант FRT-100 F)	1
Денатурация	94	00:10	10
Отжиг	54	00:20	
Элонгация	72	00:10	
Денатурация	94	00:10	35
Отжиг	54	00:20	
Элонгация	72	00:10	
Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX			

<sup>19</sup> Статья 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

5.11.2. Ставят пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

5.11.3. Запускают выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

5.11.4. По окончании выполнения программы, формируют «количественный протокол», выполняют анализ и интерпретацию результатов.

5.12. Анализ и интерпретация результатов реакции амплификации (ПЦР).

Анализ и интерпретацию результатов ПЦР проводят на компьютере, который подсоединен к амплификатору.

Анализируют кривые регистрации флуоресцентного сигнала по трем каналам флуорофоров:

– по каналу для флуорофора FAM (5(6)-Карбоксифлуоресцеин) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО.

– по каналу для флуорофора JOE (6-Карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа В (*Beta*influenzavirus).

– по каналу для флуорофора ROX (5(6)-Карбокси-X-родамин) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК вируса гриппа А (*Alpha*influenzavirus).

Вначале определяют на графике флуоресценции, есть ли пересечение кривой флуоресценции данной пробы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Если пересечение есть, то определяют, на каком цикле амплификации кривая флуоресценции пересекла пороговую линию. Этот цикл называют пороговым циклом (Ct) данной пробы.

5.13. Анализ и интерпретация результатов контрольных образцов.

Результаты ПЦР-исследования считают достоверными, если получены правильные результаты контролей. Проверяют, определяется ли пороговый цикл Ct у контрольных образцов (К+, К-, В-), и если определяется, то какое они имеют значение Ct. Сравнивают значение Ct с граничным значением, указанным для данного образца в инструкции к набору. Правильные показатели приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

### Значения порогового цикла Ct для контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла Ct		
		по каналу для флуорофора FAM (ВКО)	по каналу для флуорофора JOE (вирус гриппа В)	по каналу для флуорофора ROX (вирус гриппа А)
В-	Экстракция РНК	Меньше граничного	Отсутствует	Отсутствует
К-	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
К+	ПЦР	Меньше граничного	Меньше граничного	Меньше граничного

5.13.1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла  $C_t$  по каналу для флуорофоров ROX или JOE отсутствует, или превышает граничное значение, интерпретация результатов исследуемых образцов по соответствующему каналу невозможна. Для получения результатов по данному каналу повторяют амплификацию и детекцию для всех образцов.

5.13.2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (В-) и (или) отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофоров ROX или JOE определено значение порогового цикла  $C_t$ , повторяют ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК вируса гриппа, соответствующего данному флуорофору, начиная с этапа экстракции РНК. В случае повторения этих результатов, набор для экстракции РНК и постановки ОТ утилизируют и заменяют на новый. В случае повторения этих результатов после замены, меняют диагностический набор. Если продолжает регистрироваться сигнал порогового цикла для этих контрольных образцов и после полной замены наборов, то проводят деконтаминационные мероприятия с пипетками и оборудованием.

5.13.3. Результат некорректный, если по каналу для флуорофора FAM значение  $C_t$  не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае повторяют ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результатов рекомендуют повторный сбор материала для анализа.

5.14. Анализ и интерпретация результатов исследуемых образцов.

5.14.1. Сравнивают значения  $C_t$  исследуемых образцов с граничным значением, приведенным во вкладыше к набору для данного флуорофора/штамма вируса. В представленном виде метод является полуколичественным.

5.14.2. РНК вируса гриппа А обнаружена в исследуемой пробе, если значение  $C_t$  по каналу для флуорофора ROX не превышает соответствующего граничного значения. Кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке экспоненциального подъема флуоресценции.

5.14.3. РНК вируса гриппа В обнаружена в исследуемой пробе, если значение  $C_t$  по каналу для флуорофора JOE не превышает соответствующего граничного значения. Кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке экспоненциального подъема флуоресценции.

5.14.4. РНК вирусов гриппа А и В не обнаружена в исследуемой пробе, если значение  $C_t$  по каналам для флуорофоров ROX и JOE не определено (отсутствует), а значение  $C_t$  по каналу для флуорофора FAM не превышает указанного во вкладыше к набору реагентов граничного значения.

5.14.5. Результат анализа сомнительный, если для исследуемой пробы значение порогового цикла  $C_t$  по каналу для флуорофора ROX или JOE превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение, а значение порогового цикла  $C_t$  по каналу для флуорофора FAM не превышает указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. В этом случае повторяют ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции РНК. В случае получения аналогичного результата образец считают сомнительным и рекомендуют повторное взятие материала для анализа.

## VI. Выделение вируса гриппа из клинического и аутопсийного материала в культуре клеток MDCK

### 6.1. Общие положения.

Вирусы гриппа могут размножаться в нескольких типах живых систем: куриные эмбрионы, а также чувствительные к вирусу животные и культуры клеток. Однако вирусы гриппа человека предпочтительно размножать в перmissive клеточных культурах, т.к. при длительном культивировании в куриных эмбрионах происходит адаптация вируса к новой системе, вследствие чего могут измениться основные характеристики вируса, такие как, например, патогенность, антигенные свойства, лекарственная чувствительность, а культивирование в чувствительных животных, хорьках, – слишком дорогая и плохо стандартизируемая процедура. Наиболее чувствительной клеточной культурой к вирусам гриппа человека, птиц, морских и других млекопитающих является диплоидная культура клеток почки собаки (англ. Madin-Darby Canine Kidney, далее – MDCK). Также для культивирования вирусов гриппа человека и млекопитающих может использоваться культура клеток MDCK-SIAT1, характеризующаяся повышенным содержанием  $\alpha 2,6$ -связанных сиаловых кислот на их поверхности. Цитопатическое действие (далее – ЦПД) вируса гриппа проявляется в виде накопления вакуолизирующихся клеток, которые затем дегенерируют или отделяются от поверхности культурального флакона или культурального планшета.

Принцип метода наработки вируса гриппа в культуре клеток заключается в том, что при заражении вирусом культуры клеток MDCK вирус проникает в клетки и начинает реплицироваться. Чтобы получить наибольший выход вируса, необходимо использовать для заражения несколько разведений вируса. По окончании культивирования определяют титр вируса в реакции гемагглютинации с эритроцитами, например, петуха, гуся, индюка, человека (первая группа крови), морской свинки, лошади (выбор эритроцитов зависит от чувствительности к ним вирусного штамма) и оставляют для хранения вируссодержащую жидкость с наибольшим титром вируса, хранить при температуре не выше минус 80 °С.

### 6.2. Подготовка культуры клеток, реагентов и образцов.

Все работы проводят в БМБ II класса. В работе необходимо пользоваться стерильной посудой (например, культуральные флаконы, культуральные планшеты, пробирки, пипетки, наконечники с противоаэрозольным фильтром, чашки Петри) и стерильными реагентами.

#### 6.2.1. Приготовление культуральных сред.

Готовят полную ростовую питательную среду. Для культивирования клеток MDCK может использоваться культуральная среда MEM или культуральная среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л). К 450 мл среды добавляют: 50 мл (10 %) термически-инактивированной фетальной коровьей сыворотки (англ. fetal bovine serum, далее – FBS) (для термической инактивации сыворотки ее прогревают на водяной бане при температуре плюс 56 °С в течение 30 минут); антибиотики (для достижения концентрации 80 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «антибиотик-антимикотик», что соответствует 100 ЕД/мл

пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина В (далее – 1X реагент «антибиотик-антимикотик»); L-глутамин до концентрации 2 мМ или аланил-глутамин (стабильная форма глутамина) до концентрации 2 мМ; реагент NEPES до концентрации 20 – 25 мМ.

6.2.2. Готовят поддерживающую питательную среду для культивирования вирусов гриппа. Для этого к культуральной среде ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы добавляют раствор бычьего сывороточного альбумина (фракция V) до конечной концентрации 0,2 %; трипсин ТРСК до концентрации 2 мкг/мл; антибиотики и антимикотики (гентамицин до концентрации 80 – 100 мкг/мл или 1X реагент «антибиотик-антимикотик»; аланил-глутамин до концентрации 2 мМ или L-глутамин до концентрации 2 мМ; NEPES (конечная концентрация 20 – 25 мМ).

Трипсин-ТРСК доступен в качестве лиофилизированного субстрата 100 мг порошка разводят в 50 мл стерильной дистиллированной воды, пригодной для приготовления питательных сред и работ с культурами клеток. Полученный раствор перемешивают и стерилизуют путем фильтрации через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (можно использовать стерильные фильтр-насадки на шприцы с мембраной PES). Полученный стерильный раствор с концентрацией 2 мг/мл разделяют на аликвоты по 0,5 мл и хранят при температуре минус 20°C. Добавление 0,5 мл раствора с концентрацией 2 мг/мл к бутылке среды объемом 500 мл будет давать среду с целевой концентрацией трипсина ТРСК 2 мкг/мл.

#### 6.2.3. Размножение клеток MDCK.

Из флакона с сформированным клеточным монослоем удаляют полную ростовую питательную культуральную среду, клетки промывают 5 мл DPBS без кальция и магния или раствором Версена, раствор удаляют. В культуральный флакон площадью 75 см<sup>2</sup> с монослоем клеток вносят 2 мл раствора трипсина – Версена (1:1) (или другого реагента для диссоциации клеток (например, 0,05% раствор трипсина с 0,02% ЭДТА), во флакон площадью 25 см<sup>2</sup> – 0,75 мл, во флакон T-12,5 – 0,4 мл. Флакон закрывают крышкой и убирают в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре плюс 36 – 37 °C на 15 – 50 минут. Процесс образования клеточной суспензии следует контролировать визуально. После образования клеточной суспензии трипсин инактивируют путем добавления 5 мл полной ростовой питательной культуральной среды с 10 % FBS, пипетируют несколько раз серологической пипеткой или автоматическим дозатором с наконечником с противоаэрозольным фильтром и переносят суспензию клеток в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Центрифугируют 5 – 10 минут при 200 g (1200 – 1500 об/минуту), затем удаляют надосадочную жидкость и ресуспендируют осадок в 1 – 5 мл полной ростовой питательной культуральной среды. Подсчет клеток проводят в камере Горяева или в автоматическом счетчике клеток и рассчитывают концентрацию клеток в 1 мл<sup>20</sup>.

<sup>20</sup> МР № 0100/4430-06-34 «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.04.2006.

6.2.4. В новые культуральные флаконы вносят полную ростовую питательную культуральную среду (в флакон Т-12,5 – 5 мл, в Т-25 – 10 мл) с помощью серологических пипеток соответствующего объема или автоматического дозатора с наконечником с противоаэрозольным фильтром. Вносят клеточную суспензию: во флакон Т-12,5 – 0,4 млн клеток/мл, во флакон Т-25 – 1,0 млн клеток/мл.

Для посева в культуральный планшет готовят суспензию клеток, чтобы концентрация была 100 тыс. клеток в 1,0 мл. В лунки 96 луночного планшета вносят по 200 мкл клеточной суспензии, в лунки 24 луночного планшета вносят по 1,5 мл приготовленной клеточной суспензии.

Клетки культивируют 1-2 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре плюс 36 – 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> до формирования субконфлюэнтного монослоя (80 – 90 % от полностью сформированного монослоя клеток). Наблюдение осуществляют с помощью инвертированного микроскопа или другого аналогичного прибора (системы для визуализации клеток).

При длительном ведении культуры клеток ее чувствительность к вирусам гриппа может снижаться. В связи с этим при ведении культуры рекомендуется проводить не более 25 – 30 последовательных пересевов, после чего брать в работу новую замороженную ампулу охарактеризованных клеток с короткой пассажной историей из клеточного банка.

6.2.5. Подготовка проб от человека и животных для выделения вируса.

Материалом для изоляции вирусов являются клинические и аутопсийные образцы, а также биологический материал от животных (приложение 1 к настоящему МР).

6.2.6. Подготовка вирусосодержащего клинического образца для изоляции вируса гриппа.

Если образец – это мазки из носа или зева, либо смывы, то поступают следующим образом:

– при необходимости образцы размораживают и добавляют к ним 1-кратный объем раствора Хенкса (или вирусологической транспортной среды или DPBS) с антибиотиками (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»);

– осторожно встряхивают образцы на вортексе;

– оставляют при комнатной температуре на 15 минут;

– освещают пробы центрифугированием 5 минут при 5000 – 10000 g;

– отбирают 100 мкл образца для передачи на проведение анализа ОТ-ПЦР;

– часть образца используют для заражения культуры, а остатки хранят при температуре минус 70 – 80 °С.

6.2.7. Подготовка вирусосодержащего патматериала для изоляции вируса гриппа.

Если первичный образец – это ткани человека или животного:

– готовят 10 % суспензию ткани в растворе Хэнкса (или DPBS) с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик») с помощью гомогенизатора (или другим методом, например, с использованием ступки) (приложение 2 к настоящему МР);

- пробирку с гомогенатом центрифугируют 5 – 10 минут при 10000 – 12000 g;
- супернатант переносят в стерильную пробирку;
- отбирают 100 мкл образца для передачи на анализ методами амплификации НК (до момента передачи хранят при температуре не выше минус 70 °С);
- остаток образца фильтруют через фильтр 0,22 мкм. Часть образца используют для заражения клеток, остаток хранят при температуре не выше минус 70 °С.

### 6.3. Выделение вируса гриппа из первичного материала.

6.3.1. Из культуральных флаконов или планшетов с культурой клеток удаляют полную ростовую питательную культуральную среду.

6.3.2. Отмывают клетки 1 – 2 раза от остатков сыворотки таким же объемом раствора Хенкса (или DPBS) с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»).

6.3.3. В лунки планшета или флаконы вносят по 100 – 200 мкл подготовленного вирусосодержащего материала.

Положительный контроль: в один ряд культурального планшета (или в один флакон) с культурой вносят штамм вируса гриппа, охарактеризованный ранее по цитопатическому действию на клетках MDCK, в дозе 100 – 200 ТЦД<sub>50</sub><sup>21</sup>, в объеме 200 мкл.

Отрицательный контроль: в один ряд культурального планшета (или в один флакон) с культурой вносят 200 мкл раствора Хэнкса (или DPBS) с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»).

6.3.4. Помещают зараженную культуру клеток на 30 – 60 минут в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре плюс 35 – 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> для адсорбции вируса. По истечении 30 – 60 минут удаляют вирусосодержащий материал из планшетов/флаконов.

6.3.5. В лунки 24-луночного планшета вносят по 2 мл поддерживающей питательной среды (в флаконы Т-25 вносят 6 – 10 мл поддерживающей среды).

6.3.6. Ежедневно наблюдают за зараженной культурой с помощью инвертированного микроскопа на предмет появления ЦПД. Инкубируют клетки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе даже в отсутствие ЦПД до 6 – 7 суток. Наличие вируса в культуральной жидкости определяют методом ПЦР или с помощью реакции гемагглютинации: из лунки планшета берут автоматической пипеткой со стерильным наконечником аликвоту, равную 25 – 50 мкл, добавляют 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов. В контрольную лунку вносят 25 – 50 мкл DPBS и 50 мкл эритроцитов. После того, как в контрольной лунке эритроциты осядут на дно и образуют «пуговку», следует учесть результат в опытной лунке: если сформировался «зонтик», следовательно, в культуральной жидкости есть вирус гриппа. Если образовалась «пуговка», в культуральной жидкости вируса или нет,

<sup>21</sup> Пункт 4 МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.09.2003 (далее – МУ 3.3.2.1758-03).

или его недостаточно для гемагглютинации. Окончательное подтверждение наличия вируса гриппа осуществляют методом ОТ-ПЦР или в РТГА с контрольными сыворотками. Подтверждающие исследования необходимы, т.к. исходный материал может быть контаминирован вирусами других семейств, имеющими гемагглютинирующую активность.

6.3.7. Если по завершении 7 суток культивирования реакция гемагглютинации отрицательная (гемагглютинин вируса отсутствует или его недостаточно), необходимо пассировать материал в культуре клеток еще дважды (перенести культуральную жидкость во флаконы или лунки планшета со свежим клеточным монослоем), прежде чем сделать вывод о невозможности выделить вирус из данного образца.

6.3.8. Если в культуральной жидкости обнаружен вирус, собирают жидкость и разливают ее в пробирки с завинчивающимися крышками в объеме 0,5 – 1 мл и хранят при минус 70 – 80 °С.

6.3.9. По окончании работы проводят дезинфекцию рабочего места в БМБ и боксовом помещении и удаляют отходы.

6.4. Накопление вируса гриппа в культуре клеток.

6.4.1. Приготовление разведений вируса.

Готовят 10-кратные разведения вирусосодержащего образца. Для этого в 5 пробирок типа Эппендорф на 1,5 мл вносят по 0,9 мл раствора Хэнкса с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»), пробирки маркируют: -1, -2, -3, -4, -5. В первую пробирку с маркировкой -1 пипеткой вносят 0,1 мл образца. Наконечник сбрасывают в емкость с дезинфицирующим раствором, предварительно набрав в него 0,1 мл дезинфектанта. Пробирку встряхивают на вортексе, сбрасывают капли с крышки пробирки путем кратковременного центрифугирования. Манипуляции по разведению вирусосодержащей суспензии повторить до разведения  $10^{-5}$  (как минимум), меняя наконечник на каждом шаге разведения.

Для разведения вируса вместо раствора Хэнкса можно использовать другие стерильные буферные растворы, используемые для культуральных работ (например, фосфатно-солевой буфер), культуральные среды без добавок или поддерживающую среду для наработки вируса.

6.4.2. Заражение культуры клеток разведениями вируса.

Открывают флаконы Т-25 с клеточным монослоем и удаляют полную ростовую питательную культуральную среду. Пипеткой вносят 8 – 10 мл раствора Хэнкса с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»), ополаскивают клетки легким покачиванием флакона в течение 30 – 40 секунд, и удаляют среду из флакона. Процесс отмывки провести 2 – 3 раза. Для отмывки клеток можно использовать другие буферные растворы, культуральные среды без добавок или поддерживающую среду для наработки вируса.

6.4.3. По 0,2 – 0,5 мл вирусной суспензии из пробирок с маркировкой -5, -4 и -3 переносят в три культуральных флакона (при низкой концентрации вируса в первоначальном образце для заражения могут использоваться разведения -1 или -2). Легким покачиванием флакона распределяют суспензию по поверхности

монослоя. Помещают в  $\text{CO}_2$ -инкубатор на 30 – 60 минут при температуре плюс 35 – 37 °С, 5 %  $\text{CO}_2$ .

Положительный контроль: в один флакон с культурой вносят штамм вируса гриппа, охарактеризованный ранее по цитопатическому действию на клетках MDCK, в дозе 100 – 200 ПЦД<sub>50</sub>.

Отрицательный контроль: в один флакон с культурой вносят 200 мкл раствора Хэнкса с антибиотиком (100 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «Антибиотик-антимикотик»).

6.4.4. Через 30 – 60 минут достают флаконы из  $\text{CO}_2$ -инкубатора, протирают 70 % этиловым спиртом. Пипеткой на 10 мл вносят в каждый флакон по 10 мл поддерживающей питательной среды. Флаконы закрывают крышкой и помещают в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при температуре плюс 35 – 37 °С, 5 %  $\text{CO}_2$ .

6.4.5. Инкубация зараженных клеток и наблюдение за ними.

Наблюдают в инвертированный микроскоп за появлением и развитием ЦПД в течение 3 – 5 суток.

6.4.6. Достают из  $\text{CO}_2$ -инкубатора флаконы с культурой, зараженной вирусом гриппа, и контроли и рассматривают клетки под инвертированным микроскопом с увеличением  $\times 4$  -  $\times 10$ . ЦПД вируса может проявляться частичным разрушением монослоя клеток, изменением морфологии клеток.

6.4.7. Сбор вирусосодержащей культуральной жидкости и анализ содержания вируса в ней.

По завершении инкубации, флаконы подвергают 1 циклу заморозки-разморозки при температуре минус 20 °С. Определяют титр вируса в реакции гемагглютинации (далее – РГА). Для этого в планшет для иммунологических реакций вносят автоматической пипеткой по 50 мкл фосфатно-солевого буфера в 6 рядов лунок по 8 лунок в ряду. Маркируют предпочтительно следующим образом: первый ряд -3, второй ряд -4, третий ряд -5, четвертый ряд – положительный контроль, пятый ряд – отрицательный контроль, шестой ряд – контроль эритроцитов.

6.4.8. Открывают флакон, в маркировке которого указано разведение  $10^{-3}$ , отбирают автоматической пипеткой 50 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости и переносят в первую лунку первого ряда. Перемешивают суспензию пипетированием и переносят 50 мкл во вторую лунку первого ряда; пипетируют суспензию во второй лунке и переносят 50 мкл в третью лунку первого ряда и так до 8 лунки. Из 8 лунки после пипетирования 50 мкл суспензии удаляют в дезинфицирующий раствор (при постановке РГА допустимо проводить двукратные разведения вируса без смены наконечника). Те же манипуляции проводят с содержимым флаконов с маркировкой  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$ , положительным и отрицательным контролями.

6.4.9. Во все лунки планшета вносят по 50 мкл 0,5 – 1 % суспензии куриных эритроцитов (или эритроцитов индейки, морской свинки или др.), планшет закрывают крышкой, протирают снаружи 70 % этиловым спиртом, помещают в холодильник (при температуре плюс 4 – 8 °С) и оставляют на 30 – 40 минут, если используются эритроциты индейки или курицы, и на 2 – 2,5 часа, если используются эритроциты млекопитающих).

6.4.10. По окончании инкубации учитывают результаты по наличию или отсутствию реакции гемагглютинации в каждой лунке. Реакция гемагглютинации считается отрицательной, если эритроциты образуют «пуговку», и положительной, если эритроциты образуют «зонтик». За титр вируса в суспензии принимают последнее разведение вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой образовался «зонтик».

6.4.11. Для дальнейшего исследования вируса используют суспензию с наибольшим обратным титром в реакции гемагглютинации (наименьшей концентрацией вируса), а если титры вируса, выраженные в гемагглютинирующих единицах, оказались одинаковыми, то лучше использовать суспензию, полученную от заражения культуры клеток меньшим количеством вируса (большим разведением), так как такая суспензия содержит меньше дефектных частиц. Хранят наработанный вирус при температуре минус 70 – 80 °С.

#### 6.5. Интерпретация результатов внутреннего контроля качества.

Внутренний контроль качества необходим для подтверждения, что культура клеток чувствительна к вирусу гриппа, вся процедура выполнена надлежащим образом с использованием исправного оборудования. Для этого при заражении культуры клеток первичным клиническим или аутопсийным материалом, а также для накопления вируса, следует использовать положительный и отрицательный контроли.

Положительный контроль – клетки, зараженные вирусом гриппа, охарактеризованным ранее по цитопатическому действию на клетках MDCK. Цитопатическое действие в положительном контроле должно проявиться на 2 – 4 сутки, положительная реакция гемагглютинации – на 3 – 5 сутки.

Отрицательный контроль – вместо вируса в клетки вносят эквивалентный объем раствора Хенкса. Не должно наблюдаться ЦПД, РГА должна быть отрицательная.

### **VII. Выделение вируса гриппа из биологического материала путем заражения куриных эмбрионов**

#### 7.1. Общие положения.

Куриные эмбрионы (далее – КЭ) – удобная и относительно экономичная система для культивирования вирусов. В куриных эмбрионах в той или иной степени размножаются почти все варианты вирусов гриппа, как сезонного гриппа, так и зоонозные варианты. Вирус лучше всего размножается в 10 – 12-суточных эмбрионах, для заражения отбирают 9 – 11-суточные КЭ.

Перед работой следует убедиться в том, что эмбрионы живые. Для этого достаточно рассмотреть яйцо в темной комнате вблизи яркого источника света. Вирусосодержащую жидкость вводят в аллантоисную полость, объем которой позволяет получить большее количество изолята. Из аллантоисной полости вирус может проникать в хорионаллантоисную оболочку. Вирусное потомство выходит в аллантоисную жидкость и может быть легко извлечено из яйца.

Для проведения работ по исследованию вируса гриппа птиц и других животных проводится сбор материала (приложение 1 к настоящим МР).

7.2. Подготовка жидкого биологического образца (например, мазок, смыв) от птиц и млекопитающих для выделения вируса гриппа.

7.2.1. При необходимости образцы размораживают и добавляют к ним такой же объем раствора Хенкса, вирусологической транспортной среды или стерильного фосфатно-солевого буфера с антибиотиками в двойной концентрации (200 мкг/мл гентамицина или 1X реагента «антибиотик-антимикотик», что соответствует 200 ЕД/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 0,5 мкг/мл амфотерицина В).

7.2.2. Осторожно встряхивают образцы на вортексе.

7.2.3. Осветляют центрифугированием 10 – 15 минут при 12000 g.

7.2.4. Отбирают 100 мкл образца для исследования методами амплификации НК.

7.2.5. Часть образца используют для заражения КЭ, оставшийся биоматериал хранят при температуре минус 70 – 80 °С.

7.3. Подготовка биологического материала (фрагменты внутренних органов и тканей) для выделения вируса гриппа.

7.3.1. Готовят 10 % суспензию органа в растворе Хэнкса, вирусологической транспортной среды или стерильного фосфатно-солевого буфера (далее – ФСБ) с антибиотиком (200 мкг/мл гентамицина или реагента «Антибиотик-антимикотик») с помощью гомогенизатора (приложение 2 к настоящим МР).

7.3.2. Пробирку с гомогенатом центрифугируют при 10000 – 12000 g в течение 5 – 10 минут.

7.3.3. Супернатант переносят в стерильную промаркированную пробирку, отбирают 100 мкл образца для ОТ-ПЦР.

7.3.4. Часть образца используют для заражения КЭ, остаток хранят при температуре минус 70 – 80 °С.

7.4. Введение в КЭ вирусосодержащего материала.

7.4.1. Отмечают на каждом яйце воздушную камеру и положение эмбриона. Фиксируют эмбрион вертикально воздушной камерой вверх. Подписывают номер пробы КЭ (по 3 КЭ на каждую пробу).

7.4.2. Обрабатывают поверхность эмбриона ватным тампоном, смоченным 70 – 72 % этиловым спиртом. Делают шилом небольшое отверстие в скорлупе на 2 – 2,5 мм выше границы воздушной камеры, в противоположной стороне от эмбриона.

7.4.3. Набирают в шприц 300 мкл биологического материала и вводят по 100 мкл в каждый КЭ, при этом иглу вводят параллельно продольной оси на глубину 10 – 12 мм (рис. 7.1). При исследовании некоторых штаммов допускается одновременное заражение в аллантоисную и в амниотическую полость по 100 мкл. Также, в отдельных случаях (например, при низкой концентрации вируса в образце по данным ОТ-ПЦР, при отрицательном результате в первом пассаже) допускается увеличение дозы заражения. Для заражения КЭ используют затупленные иглы.

7.4.4. После инъекции вирусосодержащего материала иглу извлекают, отверстие в скорлупе заклеивают каплей расплавленного парафина или воска.

7.4.5. Для выделения вируса гриппа В культивируют КЭ при температуре плюс 32 – 33 °С в течение 72 часов. При работе с высокопатогенными изолятами вируса гриппа культивируют КЭ при температуре плюс 36 – 37 °С в течение 24 – 48 часов. При работе с низкопатогенными изолятами вируса гриппа А культивируют КЭ при температуре плюс 35 – 37 °С в течение 48 – 72 часов. Просматривают КЭ ежедневно для выявления погибших эмбрионов (погибшие КЭ помещают в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С на 4 – 24 часов или от 30 минут до 2 часов при температуре минус 18 – 20 °С).

7.4.6. После окончания инкубации охлаждают КЭ при температуре плюс 4 – 8 °С в течение 4 – 24 часов или от 30 минут до 2 часов при температуре не выше минус 20 °С. Охлаждение КЭ необходимо, чтобы собирать аллантоисную жидкость, свободную от эритроцитов эмбриона, на которых могут сорбироваться вирусные частицы.

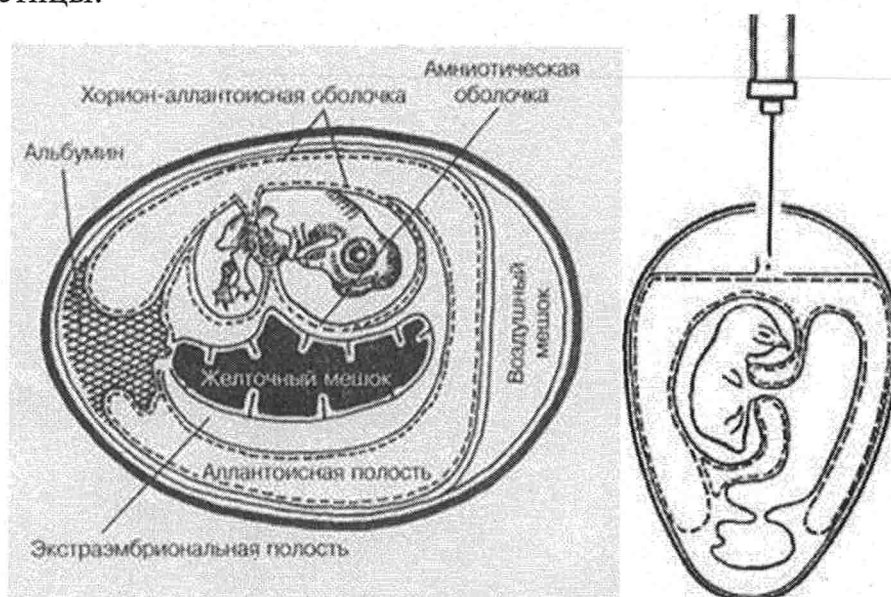


Рис. 7.1. Схематическое строение 9 – 11-суточного куриного эмбриона (слева) и введение вируса гриппа в аллантоисную полость

7.4.7. Перед вскрытием скорлупу эмбриона обрабатывают 70 – 72 % раствором этилового спирта. Вскрытие производят стерильными инструментами. Аккуратно надрезают скорлупу хирургическими ножницами с одним острым концом, при этом часть надрезанной скорлупы держат пинцетом. Скорлупу удаляют стерильным пинцетом над воздушной камерой, через которую заражали. При этом яйцо держат под некоторым углом, чтобы скорлупа не упала внутрь. Пинцет не должен касаться и повреждать лежащую под воздушной камерой оболочку, для этого срез должен проходить несколько выше границы воздушной камеры.

7.4.8. Аллантоисную жидкость в количестве до 10 мл отбирают пипеткой или дозатором с наконечником с противоаэрозольным фильтром, прокалывая подскорлуповую и хорион-аллантоисную оболочки над телом куриного эмбриона. Такое направление инструмента предотвращает случайный разрыв стенки желточного мешка и смешивание его содержимого с аллантоисной жидкостью.

7.3.9. Аллантоисную жидкость отбирают в промаркированные пробирки, объединяя жидкости из КЭ, зараженных одним и тем же образцом биологического материала.

7.4.10. Наличие вируса гриппа в аллантоисной жидкости тестируют по наличию гемагглютинации в РГА<sup>22</sup>.

7.4.11. Хранят вирусосодержащую аллантоисную жидкость при температуре плюс 4 – 8 °С не более 1 недели. Для длительного хранения вирусосодержащей аллантоисной жидкости используют низкотемпературный холодильник с температурой не выше минус 70 °С.

7.4.12. Образцы, в которых не было выявлено гемагглютинирующей активности в первом пассаже, используют для проведения второго пассажа. В соответствии с результатами РГА проводится два – три пассажа. Второй и третий пассаж проводят аналогично первому. Перед введением в эмбрион аллантоисную жидкость осветляют центрифугированием в течение 10 минут при 2000 – 3000 г. При отсутствии гемагглютинирующей активности после второго и третьего пассажа делают вывод об отсутствии жизнеспособного вируса гриппа в исходном образце соответствующего биологического материала.

7.5. Интерпретация результатов внутреннего контроля качества.

При заражении КЭ в качестве отрицательного контрольного образца используют стерильный фосфатно-солевой буфер. В качестве положительного контрольного образца используется штамм вируса гриппа, адаптированный к КЭ, в заражающей дозе  $10^4$  эмбриональной (куриного эмбриона) инфицирующей дозы вируса (далее – ЭИД<sub>50</sub>)<sup>23</sup>.

Результаты заражения КЭ считаются достоверными, если:

- в отрицательном контроле отсутствует гемагглютинация;
- в положительном контроле фиксируется гемагглютинация.

В ином случае результаты следует признать недостоверными и повторить заражение КЭ с использованием всех контролей.

7.6. Подтверждение выделения вируса гриппа в КЭ.

Подтверждение наличия в аллантоисной жидкости вируса гриппа осуществляют методами амплификации НК или в РТГА с контрольными сыворотками. Подтверждающие исследования необходимы, т.к. исходный материал может быть контаминирован вирусами других семейств, имеющими гемагглютинирующую активность (например, вирус болезни Ньюкасла).

## **VIII. Реакция гемагглютинации, реакция торможения гемагглютинации для типирования и субтипирования штаммов (изолятов) вируса гриппа**

### **8.1. Общие положения.**

Гемагглютинин вируса гриппа может прикрепляться не только к эпителиальным клеткам, в которых происходит эффективное размножение

<sup>22</sup> Приложение 2 МУ 3.1.3490-17 «Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации», утвержденных руководителем Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 27.10.2017.

<sup>23</sup> Пункт 4 МУ 3.3.2.1758-03.

вируса, но также к эритроцитам человека, морской свинки, кур, индейки, других птиц и млекопитающих, вызывая образование своеобразной решетки, поскольку одна вирусная частица может связаться с двумя эритроцитами (рис. 8.1). Это свойство вирусов гриппа называется гемагглютинацией. Для проведения реакции гемагглютинации (далее – РГА) в лунках 96 луночного серологического планшета с U- или V-образным дном готовятся двукратные последовательные разведения вируса, после чего добавляется равный объем 0,5 – 1 % суспензии эритроцитов птиц или млекопитающих (приложение 3 к настоящим МР). Эритроциты, которые не связались с вирусом гриппа, оседают на дно лунки и образуют «пуговку». Эритроциты, связавшиеся с вирусными частицами, образуют решетку, покрывающую лунку, и получается «зонтик» (рис. 8.2).

РГА проста в постановке, и ее проведение, в зависимости от типа используемых эритроцитов, занимает всего 0,5 – 2,5 часа. В связи с этим РГА часто используют в лабораториях для определения относительных количеств вирусных частиц в вирусосодержащей аллантоисной или культуральной жидкости. По оценкам, имеющимся в литературных источниках, 1 гемагглютинирующая единица (далее – ГАЕ) вируса эквивалентна приблизительно  $10^6$  вирусных частиц. В РГА такое количество вируса образует последний «зонтик».

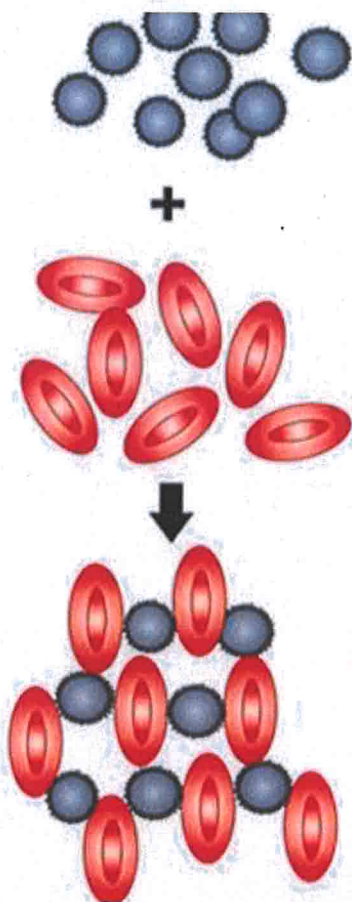


Рис. 8.1. Схема взаимодействия вируса гриппа и эритроцитов [3]

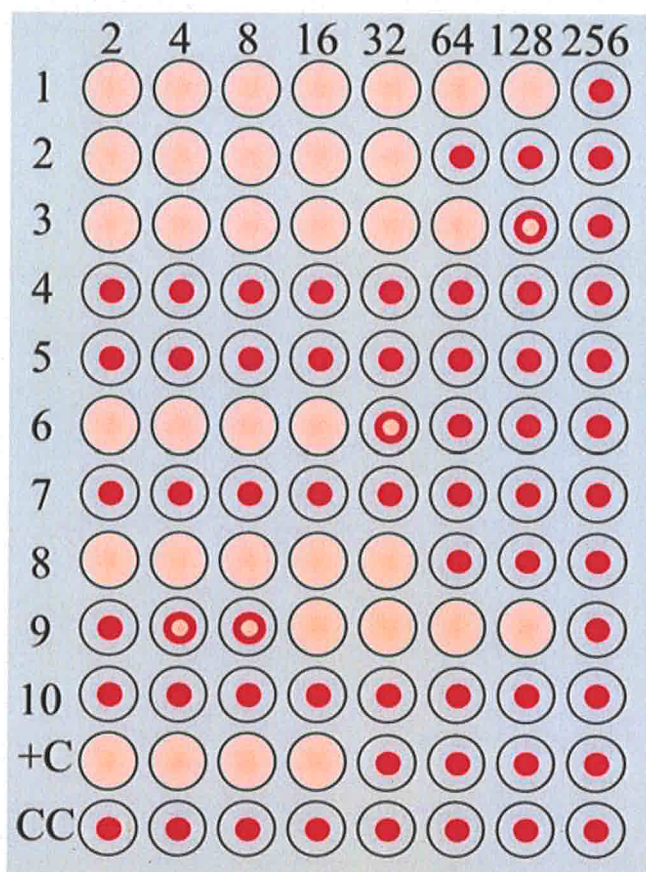


Рис. 8.2. Результат реакции гемагглютинации [3]:  
 CC – контроль эритроцитов; +C – положительный контроль; образцы 1-3, 6, 8, 9 – гемагглютинирующие штаммы вируса гриппа; 4, 5, 7, 10 – образцы, не содержащие гемагглютинирующих штаммов вируса гриппа

РТГА с референс-сыворотками к разным типам/субтипам вируса гриппа позволяет проводить типирование изолятов вирусов гриппа, выделенных из первичного материала, полученного от людей (клинический и аутопсийный материал) или животных (например, птиц, свиней). Схема реакции торможения гемагглютинации представлена на рис 8.3.

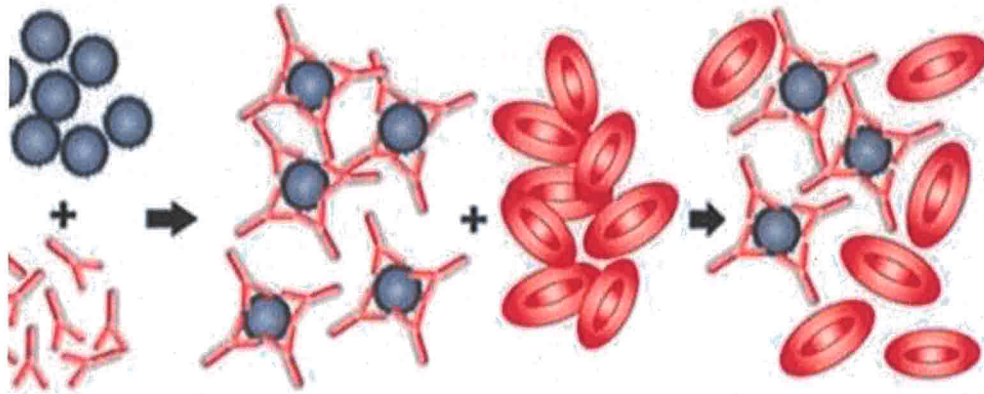


Рис. 8.3. Схема реакции торможения гемагглютинации [3]

Анализ проводится в 96-луночной планшете для серологических реакций. В ходе постановки РТГА 4 – 8 ГАЕ исследуемого вируса (в объеме 25 – 50 мкл) в течение 30 – 35 минут инкубируют при комнатной температуре с двукратными разведениями референс-сывороток (в объеме 25 – 50 мкл), после чего в реакционную смесь добавляют 50 – 100 мкл 0,5 – 1 % суспензии эритроцитов петуха (гуся, индейки, морской свинки, человека) и помещают планшет в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С. После того, как эритроциты осядут, регистрируют результаты РТГА.

Суть реакции торможения гемагглютинации заключается в том, что антитела к вирусу гриппа препятствуют прикреплению вируса к эритроцитам. Поэтому, если в референс-сыворотке есть антитела к исследуемому изоляту и их количество достаточно для связывания 4 (8) ГАЕ вируса, гемагглютинация подавляется в присутствии сыворотки. В этом случае гемагглютинации в лунках наблюдаться не будет, пока разведение сыворотки не приведет к такому разбавлению антител, что их будет недостаточно для торможения гемагглютинации. Таким образом, исследуемые изоляты вирусов гриппа будут реагировать в РТГА только с такими референс-сыворотками, которые были получены на антигенно-сходные с ними штаммы вируса гриппа. Поэтому в РТГА надо использовать как можно больше референс-сывороток, полученных на разные антигенные варианты вирусов гриппа А и В, чтобы точнее типировать новые изоляты вируса гриппа.

#### 8.2. Подготовка сывороток крови для постановки РТГА.

В качестве референс-сывороток используют: 1) коммерческие сыворотки крови овец, коз или других животных, 2) сыворотки крови хорьков, приготовленные и паспортизированные в Сотрудничающем центре ВОЗ по изучению гриппа в точках пересечения экосистем человека и животных, функционирующего на базе отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ

«Вектор» Роспотребнадзора. Титры референс-сывороток к гомологичному штамму вируса должны быть не менее 1:80.

Сыворотки крови животных и людей содержат различные полисахариды, включающие сиаловые кислоты, которые могут прикрепляться к гемагглютинирующему вирусу гриппа и искажать результаты РТГА. Для удаления этих неспецифических ингибиторов гемагглютинации образцы сыворотки обрабатывают ферментом, разрушающим рецептор (англ. Receptor Destroying Enzyme (далее – RDE), или нейраминидаза холерного вибриона).

8.2.1. До начала работ растворяют лиофилизированный фермент согласно инструкции производителя (во флакон с высушенным RDE добавляют 20 мл фосфатно-солевого буфера или физиологического раствора). После полного растворения высушенного фермента раствор аккуратно перемешивают и фасуют. Хранят при температуре минус 18 – 20 °С.

8.2.2. Быстро размораживают исследуемые сыворотки крови при комнатной температуре (плюс 19 – 23 °С).

8.2.3. Размораживают необходимое количество раствора RDE.

8.2.4. Добавляют 20 мкл образца нативной сыворотки в пробирку.

8.2.5. К отобранной аликвоте сыворотки добавляют 60 мкл RDE.

8.2.6. Закрывают пробирку крышкой, аккуратно перемешивают.

8.2.7. Выдерживают смесь сыворотки с RDE в суховоздушном термостате (или на водяной бане) при температуре плюс 37 – 38 °С 18 – 20 часов.

8.2.8. Затем помещают пробирки в водяную баню при температуре плюс 55 – 56 °С на 30 – 35 минут.

8.2.9. К обработанной сыворотке добавляют 120 мкл фосфатно-солевого буфера, рН 7,2 – 7,3, получится разведение сыворотки 1:10 от исходного образца сыворотки. Конечный объем 200 мкл.

8.2.10. Обработанные сыворотки хранят 20 – 24 часа при температуре плюс 4 – 8 °С. Если необходимо более долгое хранение, замораживают сыворотки при температуре минус 18 – 20 °С или ниже.

8.3. Проверка сыворотки крови на наличие неспецифической гемагглютинирующей активности.

8.3.1. Готовят двукратные разведения сыворотки в 25 мкл ФСБ, к разведениям сыворотки добавляют 25 мкл ФСБ и 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов индейки, петуха или др. После оседания эритроцитов регистрируют результаты. Если эритроциты в лунках с разведениями сыворотки осели на дно как в контроле эритроцитов, образовали «пуговку», а при наклоне планшета образовали «каплю» (потекли), то такая сыворотка не обладает неспецифической гемагглютинирующей активностью и может быть использована в РТГА. Если же в лунках с разведениями сыворотки произошла гемагглютинация (образовался «зонтик»), то такая сыворотка содержит неспецифические агглютинины, которые необходимо удалить перед постановкой РТГА. Для этого сыворотки обрабатывают осадком эритроцитов.

8.3.2. Для получения осадка эритроцитов суспензию эритроцитов осаждают центрифугированием при 200 g в течение 5 – 10 минут, после чего удаляют супернатант.

8.3.3. В центрифужной пробирке к одному объему осадка эритроцитов добавляют 20 объемов обработанной RDE сыворотки. Аккуратно перемешивают и ставят в холодильник при температуре плюс 4 – 7 °С на 1 час, периодически помешивают для ресуспендирования оседающих эритроцитов.

8.3.4. После завершения инкубации, центрифугируют 5 – 10 минут при 200 g. Отбирают супернатант (сыворотку, обработанную эритроцитами) в чистую пробирку. Повторно проверяют сыворотку на наличие гемагглютинирующей активности. Если сыворотка не агглютинирует эритроциты, ее используют в постановке РТГА. Если у сыворотки сохраняется гемагглютинирующая активность, ее повторно обрабатывают эритроцитами.

#### 8.4. Реакция гемагглютинации.

8.4.1. В качестве антигена в РГА и РТГА используют вируссодержащую культуральную или аллантоисную жидкости, а также вируссодержащую жидкость, инактивированную бэта-пропиолактоном (приложение 4 к настоящим МР). Никогда не используют размороженный и повторно замороженный вирус!

8.4.2. Вносят 25 мкл фосфатно-солевого буфера во все лунки в рядах А и В.

8.4.3. В лунку А1 добавляют 25 мкл исследуемой вируссодержащей суспензии. Перемешивают посредством пипетирования. После перемешивания отбирают 25 мкл раствора из лунки А1 и переносят в лунку А2. Перемешивают пипетированием, после чего отбирают 25 мкл раствора из лунки А2 и переносят в лунку А3. Повторяют описанную процедуру вплоть до лунки А12. После того как в лунке А12 раствор будет перемешан с помощью пипетирования, забирают из нее 25 мкл раствора и сбрасывают его в дезинфицирующий раствор. Таким образом приготовлены двукратные разведения антигена. Приготовление двукратных разведений можно производить без смены наконечника автоматической пипетки.

8.4.4. Добавляют 25 мкл фосфатно-солевого буфера во все лунки рядов А и В. Таким образом суммарный объем во всех лунках составляет 50 мкл.

8.4.5. Добавляют 50 мкл 1 % суспензии эритроцитов во все лунки в рядах А и В. Закрывают крышку планшета и аккуратно стучат по планшету, чтобы перемешать содержимое.

8.4.6. Помещают планшет в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С на 30 – 40 минут при использовании эритроцитов птиц (петуха, гуся, индейки) или на 2 – 2,5 часа при использовании эритроцитов млекопитающих (морской свинки, человека).

8.4.7. В ряду «В» располагают контроль эритроцитов, поэтому во всех лунках ряда В эритроциты должны осесть на дно лунки, образовав пуговку. При наклоне планшета на 60 – 80° эритроциты в контроле должны образовать каплю. В ряду А, где расположены двукратные разведения антигена, должен наблюдаться феномен гемагглютинации: в лунках планшета, содержащих достаточное количество антигена, видны «зонтики», которые не изменятся при наклоне планшета. Необходимо определить гемагглютинационный титр антигена. За титр вируса, или антигена, принимают последнее разведение вируссодержащей культуральной или аллантоисной жидкости, в котором образовался «зонтик». Так, если гемагглютинация наблюдается в первых трех лунках, то титр вируса будет равен 1:8. При указании титра вируса **ОБЯЗАТЕЛЬНО** отметить, что РГА

проводилась в 25 мкл.

8.4.8. РГА можно проводить в объеме антигена по 25 мкл, или объеме по 50 мкл (в данном случае 2-кратные разведения антигена выполняют в объеме 50 мкл, после чего сразу добавляют 50 мкл суспензии эритроцитов). При указании титра вируса ОБЯЗАТЕЛЬНО отметить, что РГА проводили при использовании антигена в объеме 50 мкл.

8.4.9. После работы все остатки вируса утилизируют.

8.5. Приготовление рабочего раствора вирусного антигена для РТГА.

8.5.1. Рабочий раствор антигена должен содержать 4 ГАЕ в 25 мкл или 8 ГАЕ в 50 мкл!

8.5.2. Перед постановкой РТГА определяют нужный объем рабочего раствора антигена. Так, на один 96-луночный серологический планшет необходимо приготовить 3200 – 3600 мкл рабочего раствора антигена.

8.5.3. Разведение вирусной суспензии.

При постановке РГА в 25 мкл антиген имеет титр 1:X (например, 1:64), где X (64) – кратность разведения антигена, при котором наблюдается последний «зонтик». Для получения рабочего раствора антигена с концентрацией 4 ГАЕ в 25 мкл разводят исходную вирусную суспензию по формуле (1):

$$Z = \frac{X}{4} \quad \text{или} \quad Z = \frac{64}{4}, \quad (1)$$

где: X – обратный титр антигена в РГА;

Z – кратность разведения исходной вирусной суспензии.

То есть, для получения рабочего раствора разводят исходную вирусную суспензию в 16 раз.

Если исходную вирусную суспензию необходимо развести более чем в 10 раз, рекомендуется проводить разведение в 2 шага. Например, для разведения исходной вирусной суспензии в 16 раз сначала разводят суспензию в 4 раза, а потом полученную суспензию разводят еще в 4 раза.

Например, для приготовления рабочего раствора в объеме 3200 мкл схема разведения может быть следующей:

– в пробирку № 1 вносят 660 мкл ФСБ и 220 мкл исходной суспензии антигена, размешивают на вортексе. Исходная суспензия антигена разведена в 4 раза.

– в пробирку № 2 вносят 2400 мкл ФСБ и 800 мкл вирусной суспензии из пробирки № 1, размешивают на вортексе. Исходная вирусная суспензия разведена в 16 раз. Далее используют рабочий раствор из пробирки № 2 для постановки РТГА.

8.5.4. Обязательно необходимо убедиться в том, что приготовленный рабочий раствор имеет концентрацию 4 ГАЕ в 25 мкл или 8 ГАЕ в 50 мкл. Для этого проводят постановку РГА с рабочим раствором, как описано выше. Гемагглютинационный титр должен равняться 1:4 (в 25 мкл) или 1:8 (в 50 мкл).

8.5.5. Рабочий раствор антигена готовят непосредственно перед постановкой РТГА. Кратковременное хранение (не более 20 часов) допускается

при температуре плюс 4 – 8 °С.

#### 8.6. Контроль приготовления рабочего раствора антигена.

Стандартный рабочий раствор вируса должен иметь титр гемагглютинина, соответствующий 4 ГАЕ в 25 мкл. При таком титре антигена наблюдается гемагглютинация в первых двух лунках при титровании вируса в РГА (если постановка РГА проводится в следующих объемах: 25 мкл антигена плюс 25 мкл ФСБ плюс 50 мкл 0.5 – 1 % суспензии эритроцитов). Если полная гемагглютинация наблюдается в четырех лунках, вирус имеет титр 16 ГАЕ/25 мкл и антиген должен быть разбавлен в 4 раза. И наоборот, если гемагглютинация наблюдается только в первой лунке, то антиген имеет титр 2 ГАЕ/25 мкл. В этом случае к рабочему разведению вируса надо добавить такой же объем исходной вирусной суспензии, какой был взят вначале. Это удвоит концентрацию вируса в рабочем разведении, чтобы дать титр 4 ГАЕ/25 мкл. Если после одного или двух исправлений титр 4 ГАЕ/25 мкл не получился, процедуру приготовления рабочего раствора антигена повторяют сначала, с постановки РГА.

8.6. Реакция торможения гемагглютинации для типирования изолятов и антигенной характеристики штаммов вируса гриппа.

Ниже описана методика, где для характеристики вируса используется четыре референс-сыворотки.

8.7.1. При комнатной температуре размораживают сыворотки, обработанные RDE и разведенные 1:10.

8.7.2. Вносят по 25 мкл ФСБ во все лунки в столбцах 1 – 5 в 96-луночном планшете.

8.7.3. Вносят 50 мкл ФСБ во все лунки столбца 6 (контроль эритроцитов).

8.7.4. Контрольные сыворотки. В качестве отрицательного контроля используют отрицательную сыворотку человека или животных. В качестве положительного контроля используют референс-сыворотки, имеющие титр к гомологичному антигену не менее 1:80. В лунку А1 вносят 25 мкл референс-сыворотки № 1, в лунку А2 – 25 мкл референс-сыворотки № 2, в лунку А3 – 25 мкл референс-сыворотки № 3, в лунку А4 – 25 мкл референс-сыворотки № 4, в лунку А5 – 25 мкл отрицательной контрольной сыворотки. Количество контрольных референс-сывороток может варьироваться от 3 до > 5.

8.7.5. Готовят серию двукратных разведений пяти внесенных в планшет сывороток. Для этого многоканальной пипеткой размещивают сыворотки в лунках А1 – А5 путем пипетирования. После этого отбирают из лунок А1 – А5 по 25 мкл раствора и переносят их в лунки В1 – В5 соответственно. Размещивают содержимое лунок В1 – В5 с помощью пипетирования, после чего отбирают 25 мкл раствора из лунок В1 – В5 и переносят их в лунки С1 – С5 соответственно. Проводят титрование аналогичным образом вплоть до ряда Н. Отбирают по 25 мкл раствора из лунок Н1 – Н5 и сбрасывают вместе с наконечниками в емкость с дезинфицирующим раствором.

8.7.6. Во все лунки, содержащие разведения референс-сыворотки (все лунки в столбцах 1 – 5), добавляют по 25 мкл рабочего раствора исследуемого изолята вируса гриппа (с концентрацией 4 ГАЕ/25 мкл).

8.7.7. В планшет с разведениями сывороток, приготовленный для тестирования референс-антигена № 1, вносят 25 мкл рабочего раствора референс-

антигена №1, содержащего 4 ГАЕ в 25 мкл, во все лунки в столбцах 1 – 5.

8.7.8. То же для референс-антигена № 2, № 3, № 4.

8.7.9. Аккуратно стучат по планшетах, чтобы перемешать содержимое.

8.7.10. Инкубируют планшеты при комнатной температуре в течение 30 – 35 минут.

8.7.11. Добавляют 50 мкл 0 – 5 – 1 % суспензии эритроцитов во все лунки в столбцах 1 – 6. Закрывают планшеты крышками.

8.7.12. Аккуратно стучат по планшету, чтобы перемешать содержимое.

8.7.13. Выдерживают при температуре плюс 4 – 8 °С в течение 35 – 40 минут при условии использования эритроцитов птиц или в течение 2 – 2,5 часов при использовании эритроцитов млекопитающих.

8.7.14. После того, как в контроле (шестой столбец) эритроциты осядут, определяют титры сывороток, наклонив планшет под углом 45° – 60°. Осевшие эритроциты образуют «пуговку», а при наклоне планшета на 60 – 80° каплю. Лунки, где произошло полное торможение гемагглютинации, выглядят как контрольные.

8.8. Оценка результатов внутреннего контроля качества при постановке РТГА.

При постановке РТГА в тестирование включают референс-антигены, гомологичные к каждой из используемых в тестировании референс-сывороток, и отрицательную сыворотку человека (или животного).

Результаты РТГА являются достоверными, если:

а) титр каждого рабочего раствора антигена равен 4 ГАЕ/25 мкл или 8 ГАЕ/50 мкл;

б) титр каждой положительной референс-сыворотки с гомологичным референс-антигеном равен 1:80 – 1:320 или выше, с негомологичным антигеном не выше 1:20;

в) титр отрицательной сыворотки с каждым референс-антигеном не выше 1:20;

г) оседание эритроцитов произошло через необходимый период времени (эритроциты гуся осели через 30 – 35 минут, петуха – через 35 – 40 минут, лошади, морской свинки или человека через 120 – 150 минут).

В ином случае результаты признают недостоверными и реакцию следует повторить после предварительной постановки всех контролей.

8.9. Интерпретация результатов РТГА.

Если произошло взаимодействие антиген/антитело, гемагглютинация эритроцитов будет ингибирована. Возможны следующие события в каждой конкретной лунке: полная гемагглютинация («зонтик»), частичная гемагглютинация (ни «зонтик», ни «пуговка»), полное торможение гемагглютинации («пуговка»).

Титр сыворотки в РТГА соответствует наибольшему разведению сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинацию (последняя «пуговка»), например, 1:640. Если на разных планшетах титр сыворотки различается в два раза, за титр принимают наименьшее разведение сыворотки с полным торможением гемагглютинации. Например, на первом планшете титр

сыворотки 1:80, на другом 1:160. За титр принимают 1:80.

Обратный титр сыворотки – это величина, обратная титру. Например, если титр сыворотки 1:640, то обратный титр равен 640. Чаще всего именно так представляют результаты в протоколе и (или) отчете.

Пример интерпретации результатов.

В случае, если для исследуемого изолята торможение гемагглютинации наблюдается только с референс-сывороткой anti-A(H1N1)pdm09, тогда как в реакции с другими сыворотками (anti-A(H3N2), anti-B/Victoria и anti-B/Yamagata) торможения гемагглютинации нет, то исследуемый штамм относится к подтипу A(H1N1)pdm09.

Чем выше обратный титр референс-сыворотки в РТГА с исследуемым изолятом вируса гриппа, тем ближе по антигенным свойствам данный вирусный изолят к штамму, на который получена референс-сыворотка.

#### 8.10. Ограничения метода РТГА.

8.10.1. Бактериальная контаминация исследуемых образцов вирусов и других реагентов может привести к внесению гемагглютининов невирусной природы, что исказит результаты РТГА. В таком случае антитела из референс-сыворотки нейтрализуют гемагглютинин вируса гриппа, но невирусные гемагглютинины будут по-прежнему связывать эритроциты, что не позволит определить тип или субтип изолята.

8.10.2. При исследовании вируса гриппа субтипа А/Н5 следует помнить, что референс-сыворотки к штаммам, принадлежащим разным генетическим кладам, часто не взаимодействуют в РТГА с гемагглютинином негомологичного штамма. Например, референс-сыворотка к штамму A/Sichuan/26221/2014 RG42A (H5N6) клада 2.3.4.4a не взаимодействует в РТГА со штаммом A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) клада 2.3.4.4h. Поэтому типирование изолятов А/Н5 рекомендуется первоначально проводить методом ПЦР, а РТГА использовать в дальнейшем для исследования антигенных свойств охарактеризованных вирусных штаммов.

### **IX. Реакция торможения гемагглютинации для тестирования сывороток крови**

#### 9.1. Общие положения.

РТГА позволяет определить уровень антител к определенному серотипу вируса гриппа А или разным генетическим линиям вируса гриппа В в образцах сыворотки крови. Для этого необходимо иметь референс-антигены к основным типам/подтипам, генетическим линиям вирусов гриппа. Сначала готовят рабочие растворы референс-антигенов, которые будут применять при постановке РТГА. Рабочий раствор вируса (референс-антигена), должен содержать 4 ГАЕ в 25 мкл или 8 ГАЕ в 50 мкл.

Анализ проводят в 96-луночном планшете для серологических реакций. В ходе постановки РТГА 4 ГАЕ референс-антигена в течение 30 – 35 минут инкубируют при комнатной температуре с двукратными разведениями исследуемых сывороток, после чего в реакционную смесь добавляют суспензию

эритроцитов и помещают планшет в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С. После того, как эритроциты оседут, регистрируют результаты РТГА.

Если в исследуемой сыворотке крови есть антитела к данному штамму и их количества достаточно для связывания 4 ГАЕ вируса, гемагглютинация подавляется в присутствии сыворотки. В этом случае гемагглютинации в лунках наблюдаться не будет, пока разведение сыворотки не приведет к такому разбавлению антител, что их будет недостаточно для торможения гемагглютинации. Наивысшее (наибольшее) разведение сыворотки (наименьшая концентрация антител), останавливающее гемагглютинацию, называется титром сыворотки в РТГА.

Многочисленные исследования 1952 – 2011 гг. показали, что титры в РТГА, равные около 1:40, коррелируют со снижением риска инфицирования гриппом в популяции как минимум на 50 %. Поэтому титр сыворотки 1:40 стали считать пороговым титром, или наименьшим значимым титром. При этом не имеет значения, какое абсолютное количество специфических антител содержится в 1 мл сыворотки. Т.е. все образцы сыворотки, которые при разведении 1:20 не тормозят процесс гемагглютинации (недостаточно специфических антител против используемого вируса гриппа), считают отрицательными по отношению к используемому вирусу. Если после разведения сыворотки 1:40 и выше наблюдается торможение гемагглютинации, такие образцы считают положительными.

Сыворотки крови могут быть отрицательными к одному или нескольким штаммам вируса гриппа (например, к вирусу A/California/04/2009 H1N1pdm09) и положительными к другим вирусам гриппа (например, к вирусу A/Aichi/2/68 H3N2). Было показано, что в полностью смешанной популяции передача вируса гриппа от человека к человеку может быть прервана, если около 52 % населения имеют титры, равные или выше 1:40 к этому или родственным штаммам. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения (далее – ВОЗ) рекомендует проводить ежегодную вакцинацию от сезонного гриппа с охватом более 50 % населения. Метод РТГА используется как золотой стандарт для исследования популяционного иммунитета населения, а также в надзоре за появлением в сыворотках крови человека антител к вирусам зоонозного гриппа. Появление положительных сывороток человека к вирусу зоонозного гриппа может косвенно свидетельствовать о том, что идет адаптация вируса гриппа животных к человеку [8]. Такой патоген может вызвать вспышку заболевания, эпидемию или пандемию.

#### 9.2. Подготовка сывороток крови и антигенов вируса гриппа к РТГА.

При исследовании популяционного иммунитета одновременно можно тестировать сыворотки только против одного антигена, при этом в работе может находиться не более 100 образцов.

Сыворотки крови животных и людей содержат различные полисахариды, включающие сиаловые кислоты, которые могут прикрепляться к гемагглютинину вируса гриппа и затруднять связывание специфических антигемагглютинирующих антител. Для удаления этих неспецифических рецепторов гемагглютинации образцы сыворотки обрабатывают ферментом, разрушающим рецепторы (см. пункт 8.2).

### 9.3. РГА.

РГА и приготовление рабочего раствора вирусного антигена для РТГА подробно описаны в главе VIII.

### 9.4. РТГА.

9.4.1. При комнатной температуре размораживают исследуемые сыворотки, обработанные RDE и доведенные до разведения 1:10 после обработки препаратом RDE или другим препаратом нейраминидазы холерного вибриона.

9.4.2. Вносят 25 мкл ФСБ во все лунки в столбцах 1 – 11 96-луночного планшета.

9.4.3. Вносят 50 мкл ФСБ во все лунки столбца 12.

9.4.4. В лунку А1 вносят 25 мкл тестируемой сыворотки № 1, в лунку А2 – 25 мкл тестируемой сыворотки № 2, и т.д., в лунки А10 и А11 вносят контрольные сыворотки.

9.4.5. Контрольные сыворотки. Если тестируют сыворотки человека, то в качестве отрицательного контроля используется отрицательная человеческая сыворотка. В качестве положительного контроля берется сыворотка, имеющая титр к используемому антигену не менее 1:80. В лунку А10 добавить 25 мкл сыворотки, являющейся положительным контролем, в лунку А11 – 25 мкл сыворотки, являющейся отрицательным контролем.

9.4.6. Готовят серию двукратных разведений одиннадцати внесенных в планшет исследуемых сывороток. Для этого многоканальной пипеткой размещают сыворотки в лунках А1 – А11 с помощью пипетирования. После этого отбирают из лунок А1 – А11 по 25 мкл раствора и переносят их в лунки В1 – В11 соответственно. Проводят разведение вплоть до ряда Н. Отбирают по 25 мкл раствора из лунок Н1 – Н11 и сбрасывают раствор вместе с наконечниками в дезинфицирующий раствор.

9.4.7. Добавляют 25 мкл рабочего раствора вируса, содержащего 4 ГАЕ, в лунки, содержащие сыворотки (все лунки в столбцах 1 – 11).

9.4.8. Аккуратно стучат по планшету, чтобы перемешать содержимое.

9.4.9. Инкубируют антиген с разведениями сыворотки при комнатной температуре в течение 30 – 35 минут.

9.4.10. Добавляют стандартный объем суспензии эритроцитов (50 мкл) во все лунки 96-луночного планшета (стандартный объем эритроцитов определяют, как описано в приложении 2 к настоящим МР). Закрывают крышку планшета.

9.4.11. Аккуратно стучат по планшету, чтобы перемешать содержимое.

9.4.12. Планшет оставляют в БМБ II класса при температуре плюс 22 – 25 °С на 40 минут при условии использования эритроцитов птиц или на 2 часа при использовании эритроцитов млекопитающих.

9.4.13. Определяют титры сывороток, наклонив планшет под углом 45 – 60°. Осевшие эритроциты в колонке 12 (контроль эритроцитов) должны «потечь» и образовать каплю. Дожидаются, пока эритроциты в контроле не перестанут течь, после чего отмечают те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговки» и потекли так же, как в 12 колонке. Лунки, где произошло полное торможение гемагглютинации, будут выглядеть как контрольные.

9.5. Интерпретация результатов внутреннего контроля качества.

При постановке РТГА в тестирование включают положительную хорьковую референс-сыворотку, специфичную по отношению к тестируемому антигену, и отрицательную сыворотку крови человека (или животного).

Результаты РТГА являются достоверными, если:

- а) титр рабочего раствора антигена равен 4 ГАЕ/25 мкл или 8 ГАЕ/50 мкл;
- б) титр положительной сыворотки равен 1:80 или выше;
- в) титр отрицательной сыворотки не выше 1:20;
- г) оседание эритроцитов произошло через необходимый период времени (эритроциты гуся осели через 30 – 35 минут, петуха – через 40 – 45 минут, лошади и морской свинки через 120 – 150 минут).

В ином случае результаты следует признать недостоверными и реакцию повторить после предварительной постановки всех контролей.

#### 9.6. Интерпретация результатов РТГА.

Если произошло взаимодействие антиген/антитело, гемагглютинация эритроцитов будет ингибирована. Возможны следующие события в каждой конкретной лунке: полная гемагглютинация («зонтик»), частичная гемагглютинация (ни «зонтик», ни «пуговка»), полное торможение гемагглютинации («пуговка»). Титр в РТГА соответствует наибольшему разведению сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинацию (последняя «пуговка»).

Титр сыворотки в РТГА – это разведение сыворотки в последней лунке с полным торможением гемагглютинации, например, 1:640.

Если на разных планшетах титр сыворотки различается в два раза, за титр принимают наименьшее разведение сыворотки с полным торможением гемагглютинации. Например, на первом планшете титр сыворотки 1:80, на другом 1:160. За титр принимают 1:80.

Если на разных планшетах титр сыворотки различается больше, чем в два раза, тестирование этой сыворотки следует повторить.

Обратный титр сыворотки – это величина, обратная титру. Например, если титр сыворотки 1:640, то обратная величина титра равна 640. Чаще всего именно так представляют результаты.

Серонегативными в отношении определенного штамма вируса гриппа считаются лица, у которых обратный титр сыворотки крови в РТГА с этим вирусом равен или меньше 20.

Серопозитивными в отношении определенного штамма вируса гриппа считаются лица, у которых обратный титр сыворотки в РТГА с этим вирусом равен или больше 40.

#### 9.7. Ограничения метода РТГА.

9.7.1. Исходно серопозитивная сыворотка крови может быть определена как серонегативная, если она хранилась или транспортировалась неправильно, без охлаждения, в связи с чем имеющиеся в ней антитела деградировали.

9.7.2. Бактериальная контаминация исследуемых сывороток и других реагентов может привести к внесению гемагглютининов невирусной природы, что исказит результаты. В таком случае антитела из серопозитивной сыворотки нейтрализуют гемагглютинин вируса гриппа, но невирусные гемагглютинины

будут по-прежнему связывать эритроциты, что будет учтено как негативный результат.

9.7.3. При тестировании сывороток в РТГА с вирусом А/Н5 следует помнить, что сыворотка, определенная как серонегативная, может содержать антитела к другим штаммам А/Н5, поэтому при подаче результатов РТГА необходимо полностью указывать название штамма вируса гриппа, который использовали при постановке реакции.

## **Х. Тестирование чувствительности изолятов (штаммов) вируса гриппа к антинейраминидазным препаратам**

### 10.1. Принципы процедуры.

Первым этапом жизненного цикла вируса является процесс присоединения вирусной частицы к рецепторам клеток. У вируса гриппа для этой цели служит гемагглютинин (НА). После цикла репликации вновь синтезированные вирусные частицы должны выйти из инфицированной клетки. Оба эти процесса проходят при прямом участии вирусной нейраминидазы (далее – NA). Препараты, ингибирующие нейраминидазу, такие как занамивир и осельтамивир, связываются с высоко консервативным сайтом активного ферментативного центра NA, тем самым ингибируя ее ключевые функции. Путем измерения ингибирующего действия препарата на активность фермента нейраминидазы можно определить, восприимчив или устойчив вирус к препаратам этого класса. Флуоресцентный метод измеряет интенсивность флуоресценции конечного продукта (4-метилумбеллиферона), освобожденного из субстрата MUNANA (2'-(4-метилумбеллиферил)-ADN-ацетилнейраминовой кислоты) благодаря ферментативной активности нейраминидазы вируса гриппа. Тестирование начинается с подбора оптимального разведения вируса, которое позволит корректно определить чувствительность к антинейраминидазным препаратам. Затем инкубируют десятикратные разведения ингибиторов с одной и той же, оптимальной, дозой вируса. После этого вносят субстрат MUNANA, из которого в присутствии активной NA выделяется флуоресцирующий продукт. После измерения уровня флуоресценции во всех смесях вычисляют числовые показатели ингибирования и определяют концентрацию препарата, необходимую для снижения активности нейраминидазы на 50 %. Это величина IC<sub>50</sub> – 50-процентная ингибирующая концентрация. Показатели ингибирования исследуемых вирусов сравнивают с показателями контрольных вирусов, среди которых есть чувствительные и устойчивые к каждому ингибитору, и делают заключение об уровне чувствительности к NA-ингибиторам исследуемых вирусов.

### 10.2. Подготовка и хранение реагентов.

10.2.1. Готовят 2X Буфер (2X АВ): 13 г MES (2-(N-Морфолино) этансульфоновая кислота), 8 мл 1М CaCl<sub>2</sub>, 992 мл дистиллированной воды. Смешивают компоненты до однородности, затем доводят pH буфера до 6,5, с помощью 10 М гидроксида натрия (NaOH). Фильтруют буфер, используя стерильный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

10.2.2. Готовят 1X Буфер (1X АВ) разбавлением 2X АВ дистиллированной водой в соотношении 1:1.

10.2.3. Буферы 1X и 2X АВ следует хранить при температуре плюс 4 – 8 °С.

10.2.4. Готовят ингибирующие препараты.

Раствор занамивира 300 мкМ готовят добавлением 5 мг в 50.13 мл 2X АВ буфера. Из этого исходного раствора делают последовательные разведения 1:10 для достижения концентраций 30000 нМ, 3000 нМ, 300 нМ, 30 нМ, 3 нМ, 0.3 нМ, 0,03 нМ.

Раствор карбоксилата осельтамивира 300 мкМ в 2X АВ буфере. Из этого исходного раствора делают последовательные разведения 1:10 для достижения концентраций 30000 нМ, 3000 нМ, 300 нМ, 30 нМ, 3 нМ, 0.3 нМ, 0.03 нМ.

10.2.5. Хранят все разведения ингибиторов при температуре плюс 2 – 8 °С. Стоковые растворы можно хранить при температуре минус 20 °С и ниже.

10.2.6. Исходные растворы должны быть заменены после 12 месяцев, а разведения ингибиторов после 6 месяцев хранения.

10.2.7. Подготовка стокового (базового) и рабочего растворов MUNANA.

Готовят 2.5 мМ MUNANA базовый раствор добавлением 20 мл дистиллированной воды к 25 мг MUNANA и хранят в аликвотах по 800 мкл при минус 20 °С или ниже. Рабочий раствор (0.3 мМ) получают добавлением 720 мкл 2.5 мМ раствора MUNANA к 5,28 мл 1X АВ буфера, это достаточный объем для одного 96-луночного серологического планшета. Держат рабочую концентрацию MUNANA на льду, если не используют немедленно. По окончании работы все неиспользованные материалы должны быть утилизированы.

10.2.8. Подготовка стоп-раствора.

Готовят стоп-раствор, добавив 2,225 мл 0.824 М NaOH к 11,0 мл 96 % этанола (эквивалент на один 96-луночный планшет). Стоп-раствор готовится непосредственно перед употреблением, т.к. при хранении может выпасть осадок.

10.2.9. Подготовка образцов вирусов.

Вирусы должны быть разведены в растворе для разведения вируса (1X АВ с 0,1 % NP-40 по объему). Для тестирования вируса в отношении двух препаратов (например, осельтамивир и занамивир) требуется вирусная суспензия объемом 1000 мкл.

10.3. Анализ активности нейраминидазы.

Эта процедура необходима для определения рабочего разведения вируса, которое будет использовано в анализе ингибирования нейраминидазы.

10.3.1. Вносят 60 мкл раствора для разведения вируса (1X АВ с 0.1 % NP-40 по объему) в строки А – Н столбцов 2 – 12 96-луночного серологического планшета с U-образным дном. Вносят 120 мкл вирусов без разведения в столбец 1 строки А – Н. Используя многоканальную пипетку, смешивают вирусы и раствор для разведения в столбце 1 и переносят 60 мкл в столбец 2 (не меняя наконечники), перемешивают и переносят 60 мкл в столбец 3. Продолжают процедуру до столбца 11 (60 мкл из этой колонки удаляют в дезраствор). Столбец 12 должен содержать только раствор для разведения вируса.

10.3.2. После подготовки разведений вируса в серологических планшетах с U-образным дном переносят 50 мкл в соответствующие лунки 96-луночного плоскодонного планшета для измерения флуоресценции и добавляют 50 мкл рабочего раствора MUNANA в каждую лунку с помощью многоканальной

пипетки. Слегка стучат по боковым сторонам планшета для перемешивания, и затем инкубируют смесь в течение 60 – 65 минут при температуре плюс 37 – 37,2 °С. Закрывают планшет крышкой для предотвращения испарения.

10.3.3. После инкубации реакцию следует остановить добавлением 100 мкл на лунку стоп-раствора. Интенсивность флуоресценции измеряют на планшетном ридере TECAN Infinite M Plex<sup>24</sup> с использованием параметров, представленных в таблице 10.1.

Таблица 10.1

### Параметры для измерения флуоресценции

Входящий сигнал	Длина волны	Ширина щели
Свет возбуждения	360 нм	2.5 нм
Флуоресценция (испускаемый свет)	448 нм	20 нм

Для обработки результатов следует использовать Microsoft Excel. Надо определить среднее фоновое значение флуоресценции в лунках, содержащих субстрат MUNANA и буфер 1X AB (столбец 12). Из измеренной интенсивности флуоресценции опытных лунок, содержащих разведения вируса, вычесть значение фона. Нарисовать график зависимости интенсивности флуоресценции от разведения вируса. Для каждого вируса нужно выбрать разведение, соответствующее средней точке линейного убывающего участка полученной S-образной кривой. Это разведение вируса (рабочее разведение вируса) следует использовать в последующем тестировании его чувствительности к антинейраминидазным препаратам.

10.4. Оценка чувствительности вирусов к антинейраминидазным препаратам.

10.4.1. В ряд А 96-луночного плоскодонного планшета для флуоресцентных исследований добавляют 50 мкл буфера 2X AB. В ряд В добавляют по 50 мкл 0.03 нМ раствора препарата, в ряд С – по 50 мкл 0.3 нМ раствора, в ряд D – по 50 мкл 3 нМ раствора, в ряд E – по 50 мкл 30 нМ раствора, в ряд F – по 50 мкл 300 нМ раствора, в ряд G – по 50 мкл 3 000 нМ раствора, в ряд H – по 50 мкл 30 000 нМ раствора.

10.4.2. Во все лунки столбца 1 добавляют по 50 мкл вируса № 1 в рабочем разведении. В столбец 2 аналогичным образом добавляют по 50 мкл исследуемого вируса № 2 в рабочем разведении. Аналогично в столбцы 3 – 8 добавляют по 50 мкл разведенных исследуемых вирусов № 3 – 8.

10.4.3. В столбец № 9 добавляют по 50 мкл разведенного контрольного вируса, чувствительного к осельтамивиру и занамивиру, например, A/California/04/2009 H1N1pdm09.

10.4.4. В столбец № 10 добавляют по 50 мкл рабочего разведения вируса, имеющего в нейраминидазе аминокислотную замену H275Y и характеризующегося

<sup>24</sup> Многофункциональный планшетный ридер TECAN Infinite M Plex [lifesciences.tecan.com/plate\\_readers/fluorescence\\_absorbance\\_luminescence?p=tab—1](http://lifesciences.tecan.com/plate_readers/fluorescence_absorbance_luminescence?p=tab—1).

**Примечание:** для измерения интенсивности флуоресценции допускается использовать оборудование с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

резистентностью к осельтамивиру, тогда как его чувствительность к занамивиру сохранена, например, вируса A/North Carolina/39/2009.

10.4.5. В столбец 11 добавляют по 50 мкл рабочего разведения вируса, имеющего в нейраминидазе аминокислотную замену R292K и характеризующегося резистентностью как к осельтамивиру, так и занамивиру, например, вирус A/Bethesda/956/2006. Вирусы разводят в буфере для разведения вирусов (1X АВ, 0,1 % NP40).

10.4.6. Во все лунки столбца 12 вносят по 50 мкл буфера 1X АВ, 0,1 % NP40.

10.4.7. Слегка стучат по боковым стенкам планшета для перемешивания. Закрывают планшет и инкубируют при температуре плюс 37 – 37,2 °С в течение 44 – 46 минут. План планшета для этой процедуры представлен на рис. 10.1.

10.4.8. После инкубации добавляют 50 мкл раствора MUNANA в рабочей концентрации во все лунки планшета с помощью многоканальной пипетки. Слегка стучат по планшету для перемешивания, закрывают планшет крышкой для предотвращения испарения и инкубируют в течение 60 – 65 минут при температуре плюс 37,0 – 37,2 °С.

10.4.9. После окончания инкубации реакцию следует остановить добавлением 100 мкл на лунку стоп-раствора.

Результаты должны быть прочитаны на флуориметре с использованием параметров, представленных в таблице 10.1.

Пятидесятипроцентную ингибирующую концентрацию, IC<sub>50</sub>, рассчитывают с помощью программы GraphPad Prism<sup>25</sup> или специально разработанной для этого формы Excel или другой аналогичной программы.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0 (2ХАВ)	A												
0,03 нМ	B												
0,3 нМ	C												
3 нМ	D												
30 нМ	E												
300 нМ	F												
3,000 нМ	G												
30,000 нМ	H												
		Вирус 1	Вирус 2	Вирус 3	Вирус 4	Вирус 5	Вирус 6	Вирус 7	Вирус 8	A/California/7/2009	A/North Carolina/39/2009	A/Bethesda/956/2006	

Рис 10.1. План планшета для проведения анализа чувствительности вирусов к антинейраминидазным препаратам

<sup>25</sup> Программное обеспечение для статистического анализа данных <https://www.syssoft.ru/GraphPad-Software/GraphPad-Prism/>. **Примечание:** допускается использовать программное обеспечение с аналогичными или лучшими характеристиками.

10.5. Интерпретация результатов внутреннего контроля качества при тестировании чувствительности вирусов гриппа к антинейраминидазным препаратам.

Рассчитывают  $IC_{50}$  для контрольных вирусов (могут варьироваться в разных лабораториях) и сравнивают полученные результаты с диапазонами допустимых значений (таблица 10.2).

Таблица 10.2

**Допустимые значения  $IC_{50}$  для контрольных вирусных штаммов**

Контрольный вирус	Допустимые значения $IC_{50}$	
	Занамивир (нМ)	Осельтамивир (нМ)
Вирус гриппа А, чувствительный к ингибиторам нейраминидазы, например, A/California/09/09 H1N1pdm09 - wt	0,1 – 1,5	0,1 – 1,0
Вирус гриппа В, чувствительный к ингибиторам нейраминидазы, например, B/Phuket/3073/2013 wt	0,9 – 5,2	4,0 – 15,31
Вирус, резистентный к осельтамивиру, но чувствительный к занамивиру, например, A/North Carolina/39/2009 H1N1pdm09 H274Y	0,2 – 1,5	60,0 – 180,0
Вирус, резистентный к осельтамивиру и занамивиру, например, A/Bethesda/956/2006 H3N2 R292K	13,64 – 17,22	773,47 – 1114,73

Если все  $IC_{50}$  контрольных вирусов окажутся в интервалах допустимых значений, значит полученные результаты являются достоверными (диапазоны допустимых значений  $IC_{50}$  могут варьироваться в разных лабораториях, при использовании препаратов различного производства; допустимые интервалы могут быть установлены для конкретной лаборатории в ходе валидации методики).

Если  $IC_{50}$  нескольких контрольных вирусов не попадают в указанный интервал допустимых значений, следует повторить тестирование только контрольных вирусов. Если результат повторится, необходимо заново приготовить все растворы, используемые для проведения анализа.

Если  $IC_{50}$  одного из контрольных вирусов не попадает в указанный диапазон, следует заново наработать данный штамм вируса, используя для этого образец из коллекции.

**10.6. Интерпретация результатов.**

Для тестируемых вирусов гриппа А оценку чувствительности к антинейраминидазным препаратам следует проводить с использованием критериев, сформулированных рабочей экспертной группой ВОЗ по надзору за чувствительностью вирусов гриппа к противовирусной терапии (AVWG), согласно которым вирус гриппа А считается чувствительным к препарату, если определенное для него значение  $IC_{50}$  превышает среднее значение  $IC_{50}$  для вирусов данного подтипа не более чем в 10 раз. Чувствительность для вируса гриппа А считается сниженной, если  $IC_{50}$  вируса превышает среднее значение для исследуемого подтипа в 10 – 100 раз и значительно сниженной, если  $IC_{50}$  вируса

превышает среднее значение более чем в 100 раз. Для вируса гриппа В чувствительность считается нормальной, сниженной или значительно сниженной, в случае если  $IC_{50}$  вируса превышает среднее значение для исследуемой генетической группы менее чем в 5 раз, в 5 – 50 раз и более чем в 50 раз соответственно. Среднее значение по подтипу высчитывается после исключения выбросов. В альтернативном варианте сравнение может проводиться с медианным значением для подтипа/генетической линии.

10.7. Ограничения метода тестирования чувствительности вирусов гриппа к антинейраминидазным препаратам.

Контаминация исследуемых образцов вирусов и других реагентов бактериями или вирусами других семейств, имеющими нейраминидазную активность, может привести к искажению результатов.

## **XI. Получение и характеристика хорьковой штаммоспецифичной референс-сыворотки для исследования антигенных свойств штаммов вируса гриппа в реакции торможения гемагглютинации**

### 11.1. Общие положения.

В реакции торможения гемагглютинации в качестве референс-сывороток или контрольных положительных сывороток наиболее часто используют сыворотки крови хорьков, переболевших гриппом, поскольку хорек (*Mustela putoris*) является наиболее адекватной моделью для изучения вируса гриппа человека. Однако, перед работой необходимо подтвердить серонегативный статус в отношении гриппа, т.к. хорьки высоко восприимчивы к гриппу человека, особенно к развитию гриппозной пневмонии.

Принцип метода получения штаммоспецифичной референс-сыворотки от хорьков заключается в получении антисыворотки после однократного или двукратного интраназального инфицирования животного охарактеризованным по антигенным свойствам штаммом вируса гриппа. При этом достигается оптимальный титр (не менее 1:80) антивирусных антител в сыворотке крови.

Для получения штаммоспецифичной референс-сыворотки необходимо использовать хорьков в возрасте от 6 месяцев, в крови которых нет антител к вирусам гриппа человека.

Титр штаммоспецифичных противовирусных антител на всех этапах процедуры тестируют в реакции торможения гемагглютинации.

Все манипуляции с животными должны проводиться с соблюдением требований нормативных документов<sup>26</sup>.

### 11.2. Скрининг животных.

За 3 дня до инфицирования у каждого подопытного животного берут пробу крови (нулевая сыворотка) для тестирования в РТГА (Раздел IX), чтобы оценить

<sup>26</sup> Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ); Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

отсутствие в сыворотке антител к актуальным вирусам гриппа А и В, циркулирующим в человеческой популяции: штамм, которым будет впоследствии инфицирован хорек (целевой антиген), контрольные штаммы – А/Н1N1 pdm09, А/Н3N2, В/Victoria, В/Yamagata.

В эксперимент отбирают только серонегативные животные с титром антител против целевого и контрольных вирусов  $<1:20$ . При титре антител  $\geq 1:20$  животное нельзя использовать для получения штаммоспецифичной референс-сыворотки.

### 11.3. Методика забора крови животных.

Работы с инфицированными животными проводятся в виварном блоке 2 или 3 уровня биологической безопасности.

Подготавливаются пробирки для крови и маркируются номером животного. В БМБ 2 класса проводится наркотизация хорька (пункт 12.6).

По наступлению наркотизации (мышцы расслаблены, отсутствие рефлексов, роговичный рефлекс отсутствует) придать животному положение – лежа.

Место укола при необходимости выстригают (забривание).

Дезинфекция кожи при помощи антисептических растворов (например, 70 % раствор этилового спирта).

Процедура проводится с помощью одноразовых трехкомпонентных шприцев с иглой (19 – 23G) в зависимости от метода (сердечная пункция или забор из кровеносных сосудов).

При сердечной пункции:

Пальпацией определяют положение сердца путем выявления верхушечного толчка. Местом пункции служит второе межреберье слева на 1 – 1,5 см выше конца мечевидного отростка. От левого края грудины отступают на 2 мм и вертикальным уколом прокалывают грудную клетку. При верном попадании кровь начинает поступать в канюлю иглы. Если в шприц поступают пузырьки воздуха или серозной жидкости, это указывает, что игла находится в легких. В таких случаях иглу нужно вытянуть несколько назад. Затем медленно отбирают кровь.

Забор из кровеносных сосудов:

Накладывают жгут. Визуализация вены. Прокол и постепенное продвижение иглы вдоль сосуда. При верном попадании кровь начинает поступать в канюлю иглы. Ослабляют жгут и медленно отбирают кровь. Перенос крови в пробирку.

После проведения забора крови необходимо провести мероприятия по остановке кровотечения и дезинфекцию кожи ватным тампоном смоченным антисептическим раствором, а после сухим ватным тампоном.

Проверяется общее состояние, наличие ровного дыхания и сердцебиения животного.

После забора крови животное помещают в клетку.

### 11.4. Приготовление сыворотки крови хорька.

Полученную от хорька кровь следует оставить на один час при комнатной температуре для ускорения свертывания, после чего образовавшийся сгусток отделить от стенок пробирки стеклянной палочкой/наконечником и поместить на 18 – 20 часов в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С. Далее

центрифугировать при 250 – 400 g в течение 10 минут. Получившуюся сыворотку перенести в чистую пробирку. Правильно приготовленная сыворотка должна быть прозрачной, бесцветной или желтого цвета, без следов гемолиза. Сыворотку, полученную после тотального сбора крови, дополнительно необходимо профильтровать через стерильные фильтр-насадки с размером пор 0,22 мкм. Сыворотки можно оставить на ночь при температуре плюс 4 – 8 °С. Если необходимо более долгое хранение, необходимо заморозить сыворотки при температуре минус 20 °С или ниже.

#### 11.5. Подготовка рабочего раствора вирусной суспензии.

Для заражения одного хорька необходимо приготовить суспензию, содержащую дозу вируса  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub> в 500 мкл физиологического раствора<sup>27</sup>.

#### 11.6. Подготовка наркотизирующего средства для животных.

Заражение вирусом и взятие крови проводят только после наркотизации животного, для этого используют смесь препаратов Золетил 100 и Ксила или другие зарегистрированные в Российской Федерации препараты, согласно инструкции производителя.

#### 11.7. Техника инфицирования животных.

При работе с хорьками следует использовать краги для защиты рук. Перед инфицированием следует наркотизировать животное, придать ему положение лежа на спине с приподнятой головой. Используя автоматическую пипетку, вводят вирусный материал интраназально в объеме 500 мкл (по 250 мкл в каждый носовой ход).

Наблюдение за животными следует осуществлять ежедневно, оценивать активность, аппетит, употребление животным воды в течение 14 дней (при однократном заражении и 42 дней при двукратном заражении).

#### 11.8. Отбор контрольной пробы крови.

Пробу крови у хорьков берут на 14 сутки после инфицирования в количестве достаточном для проведения серологических исследований (0,5 – 2 мл). Сыворотку тестируют в реакции торможения гемагглютинации.

Если через 14 суток после заражения сыворотка хорька имеет титр антител к целевому штамму вируса гриппа  $\leq 1:40$ , то проводят реинфицирование. Реинфицирование проводят на 21 сутки после первого заражения. Реинфицирующая доза должна быть больше инфицирующей в 10 – 100 раз.

В случае гибели животного до тотального сбора крови, необходимо подтвердить, что гибель произошла именно от инфекции, вызванной заражаемым вирусом гриппа. Для этого забирают патологический материал от животного и передают на исследование (выявление РНК вируса гриппа в МАНК и (или) выделение вируса в культуре клеток MDCK). При положительном результате при повторном заражении здорового хорька следует уменьшить заражающую дозу вируса в 100 раз.

#### 11.9. Техника тотального сбора крови у хорька.

Сбор крови хорька осуществляют на 21 сутки после последнего инфицирования путем пункции сердца с тотальным забором крови (30 – 70 мл).

<sup>27</sup> МУ 3.3.2.1758-03.

После этого проводят эвтаназию животного, согласно нормативным документам<sup>28</sup>.

#### 11.10. Тестирование штаммоспецифичной сыворотки.

Готовую штаммоспецифичную сыворотку тестируют в РТГА против целевого и контрольных штаммов вируса гриппа. В тестирование включают и нулевую сыворотку этого животного. Титры антител полученной штаммоспецифичной сыворотки в РТГА с контрольными штаммами вируса гриппа, антигенно отличными от целевого, не должны отличаться от титров нулевой сыворотки больше, чем в 2 раза.

Штаммоспецифичная референс-сыворотка готова к использованию, если титр антител против целевого вируса гриппа  $\geq 1:80$ .

---

<sup>28</sup> Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ; Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей.

**Рекомендуемый алгоритм сбора, транспортировки и хранения образцов клинического, биологического, аутопсийного и секционного материала**

1. Материалом для исследования служит клинический материал (мазки со слизистой оболочки носоглотки (ротоглотки), мокрота, аспираты из зева, эндотрахеальный аспират, бронхоальвеолярная жидкость, промывные воды бронхов, мазки с конъюнктивы), фекалии, сыворотка крови; аутопсийный материал (ткани легких, трахеи, сегментарных бронхов, селезенки); биологический материал от птиц и других животных (трахеальные и клоакальные мазки; пробы фекалий; биологические жидкости и фрагменты внутренних органов птиц, птенцов; яйца птиц; фекалии птиц и (или) мазок из клоаки и трахеи; околотовные биотопы мелких млекопитающих; фрагменты трахеи, легких, селезенки, мозга, синусы, воздухоносные мешки, кишечник от забитой или павшей птицы, птенцов, а также мелких млекопитающих); вода и ил в местах гнездований дикой птицы; молоко коров.

2. Сбор клинических и аутопсийных образцов проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями<sup>29</sup>, а также методическими документами<sup>30</sup>. Мазки из носоглотки человека для лабораторного исследования вируса гриппа собирают стерильными зондами с вязкими тампонами со слизистой оболочки из нижнего носового хода. Зонд с тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2 – 3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход глубоко и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3 – 4 см для детей и 5 – 6 см для взрослых). После взятия материала тампон, не нарушая стерильности, помещают в пробирку с 2,0 – 5,0 мл вирусологической транспортной среды. Мазок с конъюнктивы собирают следующим образом: оттянув нижнее веко, проводят тампон вращающимися движениями по конъюнктиве 4 – 5 раз, захватывая внутренний и внешний углы глаза. Затем переносят тампон в пробирку с транспортной средой. Взятие клинического материала с целью выделения вирусов следует проводить не позднее трех дней от начала заболевания или в первый день госпитализации, предпочтительно до начала противовирусной терапии.

3. Мазки из клоаки и трахеи птиц берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Трахеальные мазки берут из дыхательного прохода (трахеи) в задней части ротовой полости птицы. Чтобы добиться его раскрытия, необходимо слегка вытянуть язык птицы вперед, что сделает трахею в задней части языка более доступной. После того, как птица сделает вдох, хрящ, защищающий трахею,

<sup>29</sup> Пункты 520 – 530, приложения 9 – 10 СанПиН 3.3686-21.

<sup>30</sup> Письмо Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О направлении рекомендаций по отбору проб на респираторные вирусы» от 26.09.2017 № 01/12890-17-32; МР 3.1.0117-17; методические рекомендации «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация», утвержденные руководителем Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18.04.2006 № 0100/4430-06-34).

открывается. После этого в нее вводят наконечник аппликатора, затем осторожным движением по стенкам и задней части трахеи берут мазок. Клоакальные мазки берут путем введения всего наконечника аппликатора внутрь клоаки и поворачивания его там двумя или четырьмя круговыми движениями. Прежде чем поместить мазок в криопробирку, с наконечника аппликатора аккуратно стряхивают крупные частицы помета.

4. Мазки из носа свиней и крупного рогатого скота берут последовательно с задних стенок обеих ноздрей возвратно-поступательными вращающимися движениями. Зонд вводят в ноздрю животного на 5 – 7 см. Взятый мазок помещают в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора или транспортной среды в стерильные одноразовые промаркированные криопробирки (мазок от каждой особи помещают в отдельную пробирку). После этого стержень отрезают или отламывают таким образом, чтобы конец аппликатора остался в транспортной среде, а криопробирка могла быть герметично укупорена.

5. Для отбора пробы молока часть разового удоя молока сразу после окончания дойки переливается в определенную емкость и тщательно перемешивается. Штативы с пробами молока должны храниться и транспортироваться при температуре плюс 4 °С до 48 часов, при температуре минус 20 °С до 7 суток.

6. Все мазки (человека и животных) до исследования хранят при температуре плюс 2 – 8° С не более 48 часов, при необходимости более длительного хранения – при температуре не выше минус 70 °С.

7. Образцы фекалий птиц собирают стерильным шпателем или стерильной ватной палочкой в пробирку. Объем образца составляет приблизительно 1 мл. Пробы собирают как в случае регистрации отдельных особей птиц, так и при взлете моновидовой стаи, при этом всегда фиксируется вид птицы. Обязательно отбирается единичный (отдельный) образец свежих, невысохших фекалий.

8. Аутопсийный материал из зоны поврежденной ткани и секционный материал (внутренние органы животных, фрагменты трахеи, легких, мозга, кишечника) забирают объемом 1 – 3 мл стерильными инструментами (индивидуально для каждого органа), помещают в одноразовые стерильные пробирки с герметично завинчивающейся крышкой, замораживают и хранят при температуре не выше минус 40 °С.

9. Сбор аутопсийного и секционного материала следует проводить в герметично-закрывающиеся пробирки или контейнеры. Для этой цели хорошо подходят стандартные лабораторные пластиковые (полипропиленовые) пробирки типа Фалькон на 15 или 50 мл с герметично завинчивающимися крышками или аналогичные пробирки на 5 мл. При использовании пробирок с завинчивающимися крышками на 1,5 – 2 мл предпочтительно использовать крышки с уплотнительным кольцом, обеспечивающим герметичное закрытие и предотвращающим протекание материала. Не рекомендуется использовать для сбора аутопсийного и секционного материала контейнеры для общего анализа мочи, которые закрываются негерметично, что приводит к протеканию материала в случае транспортировки на дальние расстояния. При упаковке материала следует руководствоваться санитарно-эпидемиологическими требованиями<sup>31</sup>.

<sup>31</sup> Приложение 8 СанПиН 3.3686-21.

10. Следует избегать оттаивания и повторного замораживания материала во время хранения и транспортирования, поскольку это приводит к утрате вирусами жизнеспособности. Транспортирование при температуре плюс 2 – 8 °С допускается не более 24 часов. При необходимости более длительной транспортировки следует обеспечить температуру не выше минус 70 °С (с использованием сухого льда, при этом биологический материал должен быть помещен в криобирки и упакован согласно руководству ВОЗ «Перевозка инфекционных материалов»<sup>32</sup>. В контейнер с целью поддержания холодной цепи помещают одноразовый индикатор, контролирующий соблюдение требуемой температуры.

11. Следует помнить, что транспортные среды для ПЦР-исследования не подходят для сбора проб с целью выделения вируса в культуре клеток или КЭ, так как компоненты таких транспортных сред приводят к инаktivации вируса.

Транспортные вирусологические среды.

11.1. При сборе проб с целью последующего выделения вирусов гриппа следует забирать образцы в специальную транспортную вирусологическую среду. Обычно используют коммерческую транспортную среду (сваб-система) или изготавливают самостоятельно в лаборатории. Среда могут быть приготовлены на основе питательных сред для культивирования клеток, или сбалансированного солевого раствора Хэнкса, или фосфатно-солевого буфера, или триптозо-фосфатного бульона. К данным средам и буферным растворам необходимо добавлять бычий сывороточный альбумин до концентрации 0,5 % для стабилизации вируса. Также в транспортную среду добавляют антибиотики и антимикотики.

11.2. Пример транспортной вирусологической среды.

Питательная среда для культивирования клеток 199 (или DMEM, или MEM).

Бычий сывороточный альбумин, фракция V (конечная концентрация 0.5 %).

Гентамицин (конечная концентрация 100 – 200 мкг/мл) или Пенициллин (конечная концентрация 100 ЕД/мл), Амфотерцин В (конечная концентрация 0,25 мкг/мл).

11.3. Для приготовления транспортной среды может использоваться либо бычий сывороточный альбумин (фракция V) в сухом виде, либо коммерчески-доступный готовый стерильный раствор бычьего сывороточного альбумина (7,5 %). В случае, если при приготовлении транспортной среды используются нестерильные реагенты (например, альбумин в сухом виде), необходимо стерилизовать приготовленную транспортную среду посредством стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

11.4. После приготовления вирусологическую транспортную среду аликвотируют в одноразовые стерильные пробирки из полипропилена стерильным наконечником в стерильных условиях (в боксе микробиологической безопасности 1 класса) по 1,0 мл (при использовании пробирок объемом 1,5 – 2 мл) или по 2,0 – 5,0 мл (при использовании пробирок объемом 5 – 15 мл), маркируют и хранят до использования при температуре плюс 2 – 8 °С.

Маркировка материала для лабораторного исследования.

<sup>32</sup> WHO/HSE/GCR/2015.2 Рекомендации по правилам перевозки инфекционных материалов 2015–2016 гг.

На этикетке пробирок (контейнеров) с материалом указывается: порядковый номер образца, соответствующий номеру в сопроводительном документе, и тип биоматериала. В сопроводительном документе (направлении) к биоматериалу, собранному от людей для исследования в лаборатории, необходимо указать: наименование учреждения, которое направляет клинический материал на исследования, телефон, адрес электронной почты; возраст или дата рождения; пол; дату взятия биоматериала для лабораторного исследования; тип материала; дату заболевания; предварительный клинический диагноз или повод к обследованию; степень тяжести заболевания; данные о вакцинации против гриппа в текущем эпидемическом сезоне (вакцинирован/не вакцинирован/нет данных); проводилась ли специфическая противовирусная терапия, название использовавшихся противовирусных препаратов; ФИО, должность сотрудника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным сотрудником.

Маркировка биологического материала от птиц (животных) включает в себя: полевой номер образца, время и место сбора, вид птицы (животного), от которой взята проба, тип биоматериала.

Транспортирование клинического и (или) биологического материала.

При необходимости транспортирования внутри одного здания, пробирки/контейнеры с материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. Транспортирование производится при температуре плюс 4 – 8 °С в течение 24 часов, более длительно – в замороженном состоянии в контейнере с сухим льдом. В этом случае образцы каждого пациента (или животного) помещают в индивидуальную герметичную емкость с адсорбирующим материалом и дополнительно упаковывают в общую герметичную тару, помещаемую в термоконтейнер. Минимальные размеры наружной тары должны быть не менее чем 10 x 10 см. Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от клинического или/и биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера.

Оценка приемлемости образцов.

После доставки образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку пробирок с образцами исследуемого материала, их целостность, и зарегистрировать поступивший материал. Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений на лабораторное исследование.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную (нечитаемую) маркировку;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением требований, установленных для данного типа материала;
- с нарушением целостности и (или) герметичности тары (например, пробирок) (в том числе пролитые образцы).

В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить отправителя образца и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

### Гомогенизация фрагментов органов и тканей человека и животных

1. Принцип метода заключается в получении 10 % гомогената органов и тканей человека и животных для дальнейших исследований.

2. Для получения гомогената используют автоматический гомогенизатор. Для каждого образца используют стерильные индивидуальные пробирки для гомогенизации, что позволяет исключить риск кросс-контаминации.

3. Получение 10 % гомогената органов и тканей человека и животных для выделения вируса гриппа в культуре клеток, куриных эмбрионах и для ПЦР-исследования проводить следующим образом.

4. Используя стерильные инструменты, аккуратно поместить в стерильные промаркированные пробирки 1 часть образца тканей или органов и 9 частей буфера (например, раствор Хенкса, культуральная или транспортная среда, фосфатно-солевой буфер с добавлением или без добавления антибиотика, антимикотика) исходя из цели исследования.

Гомогенизация проводится в соответствии с инструкцией к используемому измельчителю.

5. Пробирки загрузить в гомогенизатор. Режим гомогенизации зависит от типа ткани и прибора. При использовании механического гомогенизатора выбирают режим от 40 секунд до 5 минут и 15 – 50 Гц, (частота и продолжительность может быть изменена).

6. Пробирки центрифугировать в течение 5 – 10 минут при 10000 – 12000 g.

7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость автоматической пипеткой в стерильную промаркированную пробирку.

Получившийся 10 % гомогенат либо сразу использовать для исследований, либо хранить при температуре минус 70 – 80 °С.

### Приготовление эритроцитов для РГА и РТГА

1. Эритроциты, или красные кровяные тельца – клетки крови позвоночных животных (включая человека) и гемолимфы некоторых беспозвоночных. Они насыщаются кислородом в легких или в жабрах и затем разносят кислород по телу животного.

2. Цитоплазма эритроцитов богата гемоглобином – пигментом красного цвета, содержащим двухвалентный атом железа, который способен связывать кислород и придает эритроцитам красный цвет.

3. Эритроциты птиц существенно отличаются от красных кровяных телец млекопитающих тем, что в зрелом состоянии содержат ядро, которое образует двустороннюю выпуклость. Кроме того, они крупнее по размерам и имеют овальную форму (Рис. ПЗ-1).

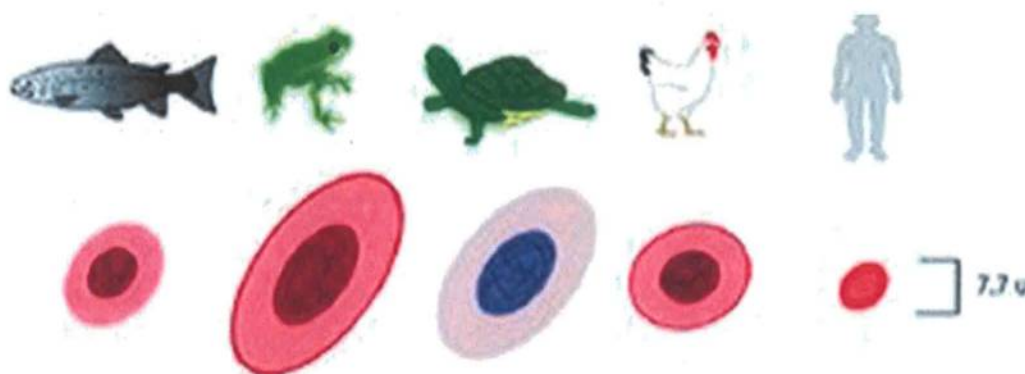


Рис. ПЗ.1. Схематическое изображение эритроцитов человека и животных

4. Гемагглютинация – это процесс склеивания и последующего осаждения эритроцитов крови; вызывается гемагглютинидами, бактериями и вирусами, агентами, способными адсорбироваться на поверхности эритроцитов.

4.1. Приготовление эритроцитов петуха, гуся, индейки, морской свинки, лошади, человека.

4.1.1. Аккуратно набирают, используя пипетку объемом 5 мл, примерно 1 – 3 мл крови (с антикоагулянтом) и помещают в коническую (или круглодонную) центрифужную пробирку объемом 13 или 15 мл.

4.1.2. Центрифугируют пробирки в течение 10 минут при 200 g.

4.1.3. Аккуратно удаляют из пробирок супернатант и лейкоцитарную пленку, которая может располагаться на поверхности осадка эритроцитов.

4.1.4. Осторожно добавляют в ту же коническую пробирку 10 мл ФСБ, закрывают крышкой и слегка перемешивают, переворачивая пробирку.

4.1.5. Центрифугируют при 200 g в течение 5 минут.

4.1.6. Удаляют надосадочную жидкость, используя пипетку объемом 5 мл. Следует быть внимательными: нельзя всколыхнуть осадок эритроцитов.

4.1.7. С осторожностью повторяют промывку ФСБ (пункты 4 – 6) еще два

раза, чтобы всего было три промывки эритроцитов. Для предотвращения гемолиза всегда следует бережно обращаться с эритроцитами, нельзя промывать эритроциты больше трех раз.

4.1.8. Удаляют оставшийся супернатант при помощи микропипетки.

4.2. Приготовление рабочей суспензии эритроцитов индейки, петуха, гуся, морской свинки.

4.2.1. Осадок, полученный из 1 мл крови гуся, петуха или индейки разводят в 70 мл ФСБ в стеклянном флаконе. Осадок, полученный из 1 мл крови морской свинки, человека размешивают в 65 мл ФСБ. Перемешивают суспензию с помощью вращательных движений.

4.2.2. Готовая суспензия эритроцитов будет использоваться в РГА и РТГА. Для этого необходимо определить оптимальный объем суспензии на лунку 96-луночного планшета.

4.2.3. Берут серологический планшет с V-или U-образным дном и вносят 50 мкл ФСБ в лунки ряда А. Перемешивают суспензию. В лунки А1 – А3 вносят по 30 мкл суспензии, в лунки А4 – А6 вносят по 40 мкл суспензии, в лунки А7 – А9 вносят по 50 мкл суспензии и в лунки А10 – А12 по 60 мкл суспензии. Накрывают планшет крышечкой и помещают его в холодильник при температуре плюс 4 – 8 °С.

4.2.4. После того, как эритроциты осядут, образовав «пуговку», выбирают объем добавляемых эритроцитов, обеспечивающий оптимальный размер «пуговки» – 2 – 3 мм, который впоследствии будет использоваться при постановке РГА и РТГА.

4.2.5. Эритроциты могут храниться при температуре плюс 4 – 8 °С для использования в РГА и РТГА в течение недели.

4.3. Интерпретация результатов внутреннего контроля качества.

4.3.1. Оседание эритроцитов должно произойти через определенный период времени: эритроциты гуся – через 30 – 35 минут, петуха – через 35 – 40 минут, человека, лошади и морской свинки через 120 – 150 минут.

4.3.2. После того, как эритроциты осядут, при наклоне планшета под углом 45 – 60° эритроциты должны «потечь» и образовать каплю.

4.3.3. В случае, если наблюдается феномен спонтанной геагглютинации эритроцитов («зонтик»), и эритроциты не потекли, то такие эритроциты не пригодны для применения.

### **Применение бета-пропиолактона для инактивации вируса гриппа и порядок проверки полученного антигена на остаточную инфекционность**

1. Бета-пропиолактон (англ. beta-propiolactone, далее – BPL) представляет собой высокоактивный алкилирующий агент, нестойкий в водных растворах и легко гидролизуемый с образованием безвредных веществ: гидроакриловой и бета-оксипропионовой кислот. В связи с этим отпадает необходимость в нейтрализации избытка бета-пропиолактона и продуктов его распада.

2. Бета-пропиолактон оказывает инактивирующее действие на многие вирусы. При оптимальной концентрации бета-пропиолактона снижается инфекционность вируса гриппа без существенного изменения его гемагглютинирующей, нейраминидазной и гемолизирующей активности.

3. Инактивация вирусов бета-пропиолактоном зависит от концентрации инактиватора, температуры взаимодействия и содержания белка в вирусной суспензии. Повышение концентрации бета-пропиолактона может привести к нежелательной реакции с вирусными белками и, вследствие этого, к изменению антигенных свойств.

4. Для инактивации используют водный стоковый раствор BPL. При работе с бета-пропиолактоном необходимо использовать защитные перчатки (нитриловые или латексные), так как BPL обладает канцерогенными свойствами. Раствор BPL держат на льду до использования.

5. В БМБ II класса к вирусосодержащей жидкости добавить инактивирующий агент BPL до конечной концентрации 0,05 % V/V (промежуточные разведения BPL можно готовить с использованием охлажденной дистиллированной воды (температура плюс 4 – 8 °С). Тщательно перемешивают вирусосодержащую жидкость, чтобы обеспечить наибольший контакт вируса с BPL.

6. Помещают суспензию в водяную баню на два часа при температуре плюс 36,5 – 37,5 °С, периодически помешивая.

7. Хранят инактивированный антиген при температуре минус 20 °С до использования.

8. Для работы антиген размораживают и хранят при температуре плюс 4 – 8 °С не больше месяца.

9. Чтобы работать с антигеном в помещениях, отвечающим требованиям I уровня биологической безопасности, необходимо провести тест на остаточную инфекционность антигена. Для подтверждения инактивации вирусов гриппа следует провести два – три пассажа в куриных эмбрионах или на культуре клеток MDCK. При отсутствии гемагглютинации в двух пассажах, третий пассаж можно не проводить.

### Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера».
6. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
7. Приказ Роспотребнадзора от 10.05.2007 № 144 «О создании научно-методического центра по референс-диагностике и изучению высокопатогенных штаммов вируса гриппа».
8. Приказ Роспотребнадзора от 24.08.2009 № 596 «Об организации работы референс-лаборатории ВОЗ по диагностике гриппа H5».
9. Приказ Роспотребнадзора от 30.09.2013 № 714 «Об организации мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа птиц».
10. Приказ Роспотребнадзора от 24.07.2015 № 627 «О совершенствовании мониторинга за циркуляцией вирусов гриппа».
11. Приказ Роспотребнадзора от 04.08.2016 № 842 «Об организации опорных баз по мониторингу за вирусом гриппа с пандемическим потенциалом».
12. Приказ Роспотребнадзора от 29.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».
13. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера».
14. МР № 0100/4430-06-34 «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация».
15. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».
16. МР 3.1.0117-17 Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции.
17. МУ 3.1.3490-17 «Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации».

18. МУК 4.2.2136-06 Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей.

19. МР 01/15701-8-34 «Организация мониторинга заносов и распространения гриппа птиц в природных условиях на территории Российской Федерации».

20. МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа».

21. МР 3.1.0417-26 «Санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия при выявлении случаев «возвращающихся» инфекций, общих для человека и животных».

22. Письмо Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.09.2017 № 01/12890-17-32 «О направлении рекомендаций по отбору проб на респираторные вирусы».

23. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

24. WHO/HSE/GCR/2015.2 Рекомендации по правилам перевозки инфекционных материалов 2015–2016 гг.

**Библиографические ссылки**

1. Relich RF, Loeffelholz MJ. Taxonomic Changes for Human Viruses, 2020 to 2022. *J Clin Microbiol.* 2023 Jan 26;61(1).
2. Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Панова А.Д. и др. Свойства вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России и странах мира в 2022-2023 гг. Эффективность вакцинопрофилактики. Вопросы вирусологии. 2024. Т. 69. №. 1. С. 42-55.
3. Ильичева Т.Н., Нетесов С.В., Гуреев В.Н. Вирусы гриппа. Методы. Новосибирск: ИПЦ НГУ; 2019.
4. Dawood F, Iuliano A, Reed C et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2012; 12, 687-695.
5. Ларина В.Н., Захарова М.И., Беневская В.Ф. и др. Острые респираторные вирусные инфекции и грипп: этиология, диагностика и алгоритм лечения. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение.* 2019;3(9-1):18-23.
6. Klivleyeva N, Saktaganov N, Glebova T, et al. Influenza A viruses in the swine population: ecology and geographical distribution. *Viruses.* 2024 Nov 1;16(11):1728.
7. Morse J, Coyle J, Mikesell L, et al. Influenza A(H5N1) virus infection in two dairy farm workers in Michigan. *N Engl J Med.* 2024 Sep 12;391(10):963-964.
8. Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 2017; 390:697–708.
9. Ильичева Т.Н., Моисеева А.А., Иванова К.И., Азаев М.Ш., Марченко В.Ю. Серомониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в Российской Федерации в 2021-2023 гг. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023. - № 4 - С. 46-52.