

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГРИППА

«Согласовано»

И.о.начальника отдела по координации
научно – исследовательской
деятельности МЗ РУз.
Гулямов Т.Д


«28» сентября 2012 г.



«Утверждаю»

Начальник главного управления
науки и учебных заведений МЗ Уз.

Атаханов Ш.Э.


«29» сентября 2012 г.

**ПОРЯДОК ВЗЯТИЯ, ХРАНЕНИЯ, УПАКОВКИ И
ТРАНСПОРТИРОВКИ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ БОЛЬНЫХ С
ПОДОЗРЕНИЕМ НА ГРИПП И ОРИ ДЛЯ ПЦР**

Методические указания

Ташкент – 2012

Учреждение – разработчик

Научно – исследовательский институт
Вирусологии МЗ РУз, Национальный
центр гриппа

Составитель

Р.А.Рахимов – д.м.н., руководитель
Национального центра гриппа
Ибадуллаева Н.С. – к.м.н., врач-вирусолог
Национального центра гриппа

Методические указания утверждены на заседании Ученого совета НИИ
Вирусологии МЗ РУз 27 сентября 2012 г., протокол № 8

Директор института
д.м.н., профессор



Э.И. Мусабаев

Рецензенты:

Мустафаев Х.М. – д.м.н., профессор,
заместитель директора по науке НИИ
Вирусологии

Камилов Ф.Х. – д.м.н., профессор
кафедры инфекционных болезней и
вирусологии ТаШИУВ

Методические рекомендации предназначены для вирусологов,
эпидемиологов, инфекционистов, реаниматологов, терапевтов, педиатров и
врачей общей практики.

Введение

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются наиболее распространенными инфекционными заболеваниями, на долю которых приходится до 80-90% от всей инфекционной заболеваемости. Для оперативного и целенаправленного проведения мероприятий против гриппа и ОРВИ требуется быстрая и достоверная идентификация циркулирующих вирусов. Применяемые в настоящее время в практическом здравоохранении иммунохроматографические, иммунофлуоресцентные, серологические, вирусологические методы исследования являются или недостаточно специфичными и чувствительными или требуют длительного времени для получения результатов исследования.

В настоящее время широко применяется метод идентификации возбудителей респираторных инфекций – полимеразная цепная реакция (ПЦР), основным достоинством которого является высокий уровень чувствительности, специфичности и прямое обнаружение возбудителя в течении нескольких часов. ПЦР является удобным, оперативным, высокочувствительным и высокоспецифичным методом, поэтому наиболее приемлем для проведения лабораторного контроля заболеваемости. С помощью данного метода можно проводить достоверное обнаружение вируса в течении нескольких часов и с высокой степенью достоверности проводить не только индикацию, но и субтипирование вирусов гриппа и ОРВИ. Совершенствование метода ПЦР-диагностики привело к созданию технологии постановки ПЦР в режиме реального времени, что значительно повысило чувствительность метода и сократило время получения результата до нескольких часов, а также проводить дифференцировку между типами вируса. Данный метод активно применяется для выявления специфических фрагментов генетического материала инфекционных агентов. Принципиальной особенностью этого метода является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения реакции, возможность количественного определения ДНК/РНК возбудителя

в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов, что является наиболее практичным, информативным и удобным для применения в практическом здравоохранении.

Важным условием для обеспечения качества лабораторных исследований является качество забора, хранения и транспортировки клинических образцов. Для обеспечения качества сбора последующих клинических образцов, для выявления больных гриппом и ОРВИ необходимо правильное взятие, хранение и транспортировка клинических образцов.

В настоящее время диагностика гриппа и ОРВИ проводится специализированными лабораториями методом ПЦР, обеспечивающей быстрое и точное обнаружение РНК/ДНК вируса. Обеспечение правил биобезопасной транспортировки образцов и сохранение живого вирусного материала в образцах, является одним из важных условий обеспечения достоверности последующих лабораторных исследований.

Для диагностики респираторных вирусов и последующих вирусологических исследований большое значение имеет правильный сбор взятых образцов, правильное хранение перед лабораторным тестированием и ускоренная транспортировка в лабораторию, с соблюдением холодового температурного режима на всех этапах.

ЭТАПЫ ЗАБОРА, ХРАНЕНИЯ, УПАКОВКИ И ТРАНСПОРТИРОВКИ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Клинические образцы.

Клиническими образцами для лабораторного исследования на грипп и ОРВИ являются мазки, взятые из зева или носа, помещенные в криовал (пробирка из материала, устойчивого к глубокому замораживанию) с Вирусной Транспортной Средой (ВТС). Предпочтительнее брать мазки из зева, чем из носа, так, как при исследовании они чаще дают положительный результат. Клинические образцы берут у больных с подозрением на грипп,

ОРИ или тяжелую пневмонию в стационаре, поликлинике или на дому. Взятие клинического образца целесообразно проводить в первые 3 суток после начала появления клинических симптомов до начала проведения противовирусной терапии. Лабораторному обследованию подвергаются все больные тяжелыми клиническими формами гриппа, ОРВИ и острой пневмонии, а также умершие от этих инфекций (см. приложение). Остальные больные могут быть обследованы выборочно в рамках проведения эпидемиологического надзора или по эпидемиологическим показаниям.

Репродукция вирусов гриппа и ОРВИ в основном происходит в клетках эпителия верхних дыхательных путей, поэтому забор мазков для лабораторного исследования необходимо проводить из зева или носа больных. Взятие мазков проводится аппликатором. Аппликатор – стержень с тампоном из синтетического волоконного материала на алюминиевых или пластиковых стержнях. Использование аппликатора с деревянным стержнем или приспособленных тампонов из ваты не рекомендуется, так как они могут содержать вещества, которые могут исказить результат ПЦР.

Правильная техника забора и соблюдение холодовой цепи обеспечивают достоверность результатов лабораторного исследования.

ОБОРУДОВАНИЕ, ИНСТРУМЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ВЗЯТИЯ, ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

- Аппликаторы;
- Шпатель для языка (для взятия мазков из зева);
- Штатив для криопробирок;
- Криопробирки с вирусной транспортной средой (ВТС); ВТС храниться при температуре +4°C;
- Холодильник +4°C для хранения ВТС и клинических образцов;
- Одноразовые перчатки;
- Спирт 70°C;

- Ножницы;
- CD маркер;
- Сумка-холодильник и хладоэлементы.

ВЗЯТИЕ МАЗКОВ ИЗ ЗЕВА И НОСА

Клинические образцы должен брать специально обученный медицинский работник. Необходимо всегда соблюдать стандартные меры предосторожности (гигиена рук, использование средств индивидуальной защиты (СИЗ)). При взятии мазков из зева или носа нужно правильно держать аппликатор. Его держат между большим, указательным и средним пальцами так, чтобы стержень аппликатора находился между большим пальцем и указательным и средним пальцами (как карандаш) (рис.1), а не между большим и указательным пальцами, когда тыльный конец стержня аппликатора упирается в ладонь (рис.2). При правильном положении аппликатора исключается риск травмировать пациента, если он сделает произвольное движение при взятии мазка, поскольку стержень аппликатора скользнет в безопасном направлении (рис.3). При неправильном положении аппликатора его движение по оси ограничено и пациент будет испытывать дискомфорт и даже может получить травму (рис.4). Аппликатором намного легче манипулировать, если его держать правильно.



Рисунок 1.

Аппликатор держат правильно



Рисунок 2.

Аппликатор держат неправильно



Рисунок 3.

Правильно взятый аппликатор скользит по оси и не может травмировать пациента



Рисунок 4.

Неправильно взятый аппликатор может травмировать пациента

ПОРЯДОК ЗАБОРА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У БОЛЬНОГО

Порядок взятия мазка из зева

1. Мазки следует брать тампоном аппликатора вращательными движениями с поверхности миндалин и задней стенки ротоглотки (рис.5).
2. Тампон с аппликатором поместить в криовал с ВТС.
3. Конец аппликатора, выступающий из криовала отломить или отрезать, чтобы можно было плотно закрыть крышку криовала.
4. Криовал с тампоном плотно закрыть крышечкой.
5. Криовал с образцом промаркировать (не следует маркировать крышку криовала).

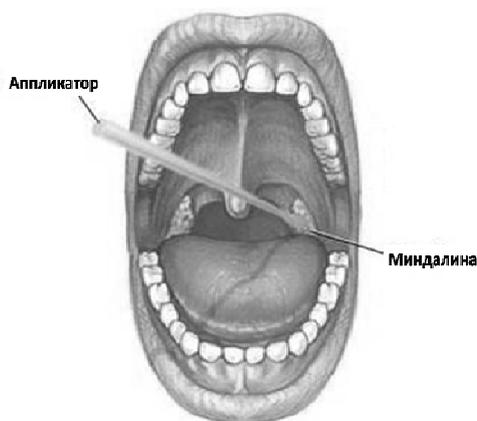


Рисунок 5.

Взятие мазка из зева

Порядок взятия мазка из носа

1. Тампон аппликатора осторожно ввести через ноздрю в носовую полость (у взрослых – приблизительно на глубину 2–3 см) и сделать несколько осторожных вращательных движений, чтобы собрать отделяемое со слизистой оболочки носовой полости (рис.7). У детей тампон аппликатора вводят в носовую полость осторожно и не глубоко, чтобы не повредить слизистую носовой полости.
2. Затем тем же аппликатором мазок берется из другой ноздри.
3. Тампон с аппликатором поместить в криовал с ВТС.
- 4.Конец аппликатора, выступающий из криовала отломить или отрезать, чтобы можно было плотно закрыть крышку криовала.
- 5.Криовал с тампоном плотно закрыть крышечкой.
- 6.Криовал с образцом промаркировать (не следует маркировать крышку криовала).

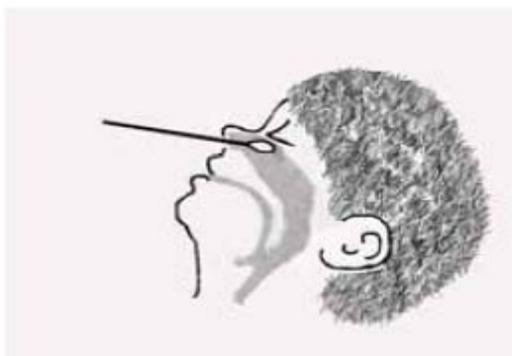


Рисунок 7. Взятие мазка из носа

У умерших больных в качестве клинического образца используется аутопсийный материал (ткани легких, трахеи, сегментарных бронхов). Аутопсийный материал собирают в одноразовые стерильные флаконы с завинчивающимися крышками и доставляют в лабораторию.

У умерших больных без аутопсии клинический образец берется из зева или носа.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ В СТАЦИОНАРЕ И ПОЛИКЛИНИКЕ

Образцы в ВТС, предназначенные для ПЦР, до их транспортировки в лабораторию, следует хранить при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, в течение 48 часов. Образцы нельзя замораживать в холодильнике при минусовой температуре.

Все клинические образцы, помещенные в ВТС, доставляют в вирусологическую лабораторию не позднее 48 часов с момента взятия клинического образца.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

При поступлении клинических образцов в лабораторию их регистрируют. До проведения лабораторных исследований клинические образцы нужно хранить при температуре -70°C . При отсутствии морозильной камеры обеспечивающей температуру -70°C , образцы можно хранить при температуре $-16-20^{\circ}\text{C}$ не более 1 недели. Нельзя размораживать и повторно замораживать клинические образцы.

УПАКОВКА ДЛЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ В ПРЕДЕЛАХ СТРАНЫ

При транспортировке инфекционных клинических образцов автомобильным или авиатранспортом местных авиалиний все образцы, подлежащие транспортировке, должны быть упакованы в **трехслойную упаковку**. Упаковка должна быть достаточно прочной для того, чтобы вынести возможные удары и нагрузки во время транспортировки. Необходимо предусмотреть, чтобы упаковка предотвращала какую-либо потерю содержимого, которая может быть вызвана в нормальных условиях транспортировки вибрацией или изменениями температуры, влажности или давления.

Первичная упаковка - это сам криовал с ВТС, содержащий образец (рис.8).

Первичные емкости должны быть помещены во вторичную упаковку таким образом, чтобы в нормальных условиях транспортировки они не разбились, не были проткнуты или чтобы их содержимое не разлилось бы во вторичную упаковку.



Рисунок 8. Криовал с клиническим образцом и ВТС

Вторичная упаковка – прочная водонепроницаемая герметичная тара (коробка) из ударопрочного материала, закрывающая и защищающая первичную упаковку (криовал с клиническим образцом) (рис.9). В одну вторичную упаковку можно поместить один или несколько первичных упаковок, завернутых в амортизирующий материал (вата, мягкая бумага или др.), отдельно друг от друга. Однако необходимо также поместить достаточное количество абсорбирующего материала, способного впитать всю жидкость при повреждении контейнера.

Вторичная упаковка должна быть помещена в последнюю, внешнюю упаковку с соответствующим прокладочным материалом. Какая-либо протечка жидкости содержимого не должна существенным образом ослаблять защитные свойства прокладочного материала или внешней упаковки.



Рисунок 9. Вторичная упаковка

Наружная упаковка. Наружная упаковка необходима для защиты вторичной упаковки и маркировки при транспортировке авиатранспортом. В качестве наружной упаковки можно использовать сумку-холодильник с охлаждающим хладоэлементом (рис.10). Вторичную упаковку помещают в наружную транспортную упаковку с достаточным количеством амортизирующего материала. При перевозке наружная упаковка должна защищать содержимое от неблагоприятных внешних воздействий, таких например, как механическое повреждение. На окончательно упакованный груз необходимо приложить соответствующую сопроводительную документацию.

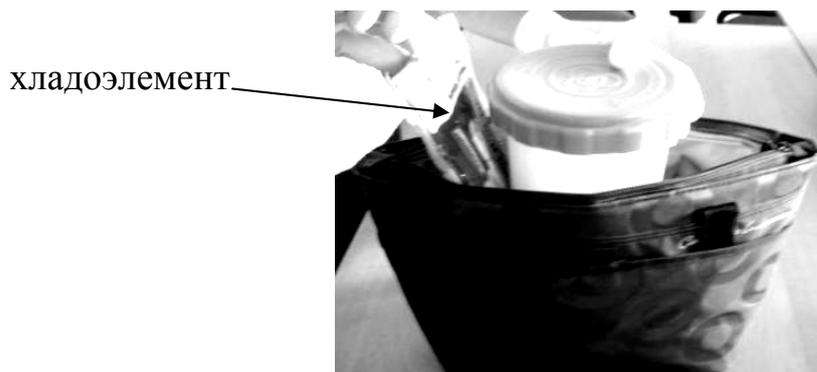


Рисунок 10. Наружная упаковка

Обеспечение холодового режима

Для обеспечения холодового режима хранения и транспортировки, клинических образцов используются одно из ниже перечисленных.

Сумка-холодильник

Для обеспечения холодого режима хранения и транспортировки клинические образцы помещают во вторичную упаковку с абсорбирующим материалом, а вторичная упаковка в сумку холодильник и обкладывают со всех сторон хладоэлементами (рис.10). Хладоэлементы перед транспортировкой замораживают в морозильной камере холодильника.

Дюары - это сосуды (вакуумные резервуары) для перевозки и хранения, клинических образцов. Дюары заправляют жидким азотом ($t^0 - 196^0\text{C}$). При работе с жидким азотом необходимо соблюдать меры предосторожности, так как при попадании на кожу и слизистую может вызвать холодовой ожог. При перевозке клинических образцов в Дюаре автотранспортом образцы поместить в Дюар наполненный жидким азотом . При перевозке авиатранспортом используются специальные транспортные Дюары в которых содержится абсорбирующий материал, удерживающий жидкий азот от разливания. Дюар необходимо поместить в наружную упаковку (коробка) и промаркировать надписью «Жидкий азот».

Сухой лед (твердый углекислый газ)¹

Клинические образцы, можно перевозить с использованием сухого льда в специально изготовленных контейнерах или приспособленных влагоустойчивых коробках, способных пропускать наружу газообразный CO_2 . Сухой лед следует помещать снаружи вторичной упаковки. Помещать сухой лед внутрь вторичной упаковки нельзя, из-за опасности взрыва. Если для перевозки авиатранспортом используется сухой лед, то упаковку следует промаркировать надписью «Сухой лед».

¹ С образцами, хранимыми и перевозимыми при очень низких температурах, следует работать в соответствующих защитных рукавицах и при надетых средствах защиты глаз; особенно это касается работы с жидким азотом.

СТАНДАРТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ И ЛЕТАЛЬНЫХ СЛУЧАЕВ ГРИППА, ОРИ И ОСТРОЙ ПНЕВМОНИИ

ГРИПП

1. Стандартное определение случая гриппа тяжелой формы

Диагноз «Грипп – тяжелая форма» ставится на основании наличия гипертермии 40°C и выше и:

- нарушения сознания;
- и/или одышки (28 и более дыханий в 1 мин.);
- и/или судорог;
- и/или ригидности затылочных мышц.

2. Стандартное определение летального случая гриппа

Летальным случаем от гриппа, считается случай смерти больного гриппом, наступившей в срок не позднее 3 недель после начала заболевания, явившийся следствием:

или инфекционно-токсического шока;
и/или острой дыхательной недостаточности,
и/или отека мозга.

Летальным случаем от гриппа, также считается обнаружение, при аутопсии умершего больного острым респираторным заболеванием патологоанатомических признаков:

- острой патологической дыхательной недостаточности;
- и геморрагического синдрома в легких;
- и/или отека головного мозга.

ОРИ

1. Стандартное определение ОРИ ВДП тяжелой формы

Диагноз «ОРИ ВДП - тяжелая форма» ставится на основании острого начала заболевания и наличия:

- гипертермии (выше 40°C);
- и/или нарушения сознания;
- и/или судорог;
- и/или одышки (более 25 дыханий в минуту) с затруднением выдоха;
- и/или затрудненного дыхания и/или глотания;
- и/или ригидности затылочных мышц;
- и/или аускультативно - сухих свистящих хрипов.

2. Стандартное определение случая ОРИ НДП тяжелой формы

Диагноз «тяжелая форма – ОРИ НДП» ставится на основании острого начала заболевания, гипертермии (выше 40⁰С) и наличия:

- затрудненного дыхания и одышки (более 25 дыханий в минуту);
- и/или выделения гнойной или пенистой мокроты с прожилками крови;
- и/или аускультативно - сухих свистящих или крепитирующих хрипов.

3. Стандартное определение летального случая ОРИ

Летальным случаем от ОРИ считается случай смерти больного ОРИ ВДП или НДП, наступившей в срок не позднее 3 недель после начала заболевания, и явившейся следствием:

- или инфекционно-токсического шока;
- и/или острой дыхательной недостаточности.

ОСТРАЯ ПНЕВМОНИЯ

1. Стандартное определение случая острой пневмонии тяжелой формы

Диагноз «острая пневмония - тяжелая форма» ставится на основании острого начала заболевания и гипертермии 40⁰С и выше и наличия:

- нарушения сознания;
- и/или затрудненного дыхания или одышка (частота дыхания более 30 в 1 мин.)
или задержка дыхания (менее 8 дыханий в 1 мин.);
- и/или кашля с кровянистой или гнойной мокротой.

2. Стандартное определение летального случая острой пневмонии

Летальным случаем от острой пневмонии, считается случай смерти больного «острой пневмонией», наступившей в течение 3 недель после начала заболевания и явившейся следствием:

- или острой дыхательной недостаточности;
- и/или инфекционно-токсического шока.

Летальным случаем от острой пневмонии, следует также считать обнаружение, при аутопсии умершего больного острым респираторным заболеванием, патологоанатомической картины крупозной или очаговой пневмонии.