

Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

Российская Академия Медицинских Наук

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА

Г. Г. Онищенко, О. И. Киселев, А. А. Соминина

**УСИЛЕНИЕ НАДЗОРА И КОНТРОЛЯ ЗА ГРИППОМ КАК
ВАЖНЕЙШИЙ ЭЛЕМЕНТ ПОДГОТОВКИ К СЕЗОННЫМ
ЭПИДЕМИЯМ И ОЧЕРЕДНОЙ ПАНДЕМИИ**

СБОРНИК МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Составлен по материалам Всемирной организации
здравоохранения, 56 Всемирной ассамблеи по здравоохранению,
Центра по контролю заболеваемости (Атланта, США) и
ГУ НИИ гриппа РАМН

Москва, Санкт-Петербург
2004 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

1. Введение	3
2. Основные задачи в области лабораторного надзора и контроля за гриппом птиц. Распространение гриппа птиц в Юго-Восточной Азии и других странах мира Приложения.....	5 12
3. Рекомендации ВОЗ по глобальному надзору за гриппом А/Н5 Приложения.....	14 22
4. Указания ВОЗ по сбору человеческих образцов для лабораторной диагностики гриппа А/Н5	36
5. Рекомендации ВОЗ по сбору образцов от животных для диагностики гриппа А/Н5.	40
6. Указания ВОЗ по хранению и транспортировке образцов от людей и животных для лабораторной диагностики гриппа А/Н5	44
7. Рекомендованные лабораторные тесты для выявления вируса гриппа А/Н5 в образцах от пациентов с гриппоподобными заболеваниями	46
8. Указания ВОЗ по работе с образцами, предположительно содержащими вирус высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5	52
9. Выделение вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK	55
10. Клиническая и эпидемиологическая характеристика гриппа А (Н5N1) во Вьетнаме (предварительные данные)	64
11. Птичий грипп А/Н5 в сельских районах Азии: соображения по пищевой безопасности	68
12. Рекомендации людям, проживающим в районах, где зарегистрированы заболевания, вызванные высокопатогенным вирусом птичьего гриппа (ВПГ)	70
13. Контроль за птичьим гриппом А(Н5N1): вопросы общественного здоровья	73
14. Использование сезонной гриппозной вакцины среди людей при риске инфекции Н5N1	75
15. Рекомендации ВОЗ по защите лиц, участвующих в массовом забое животных, потенциально инфицированных высоко патогенным вирусом гриппа птиц	76
16. Заключение	77

1. ВВЕДЕНИЕ

Грипп птиц - высоко контагиозная вирусная инфекция, которая может поражать все виды пернатых. Наиболее чувствительными из домашних видов являются индюки и куры. Дикие виды птиц могут служить переносчиками инфекции. В силу естественной резистентности они сами, как правило, при этом не заболевают и могут преодолевать в процессе миграции значительные расстояния. Известно, что естественным резервуаром для вирусов гриппа птиц (ВГП) являются водоплавающие птицы, которые чаще всего ответственны за интродукцию инфекции в домашние хозяйства.

Этиология. ВГП принадлежат к вирусам гриппа типа А семейства ORTHOMYXOVIRIDAE. Существует несколько субтипов возбудителя, которые определяются в зависимости от особенностей антигенной структуры гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). В настоящее время известно 15 субтипов H (H1-H15) и 9 субтипов нейраминидазы (N1-N9), которые могут реассортировать в различных комбинациях. Четыре из них (H3N8, H1N1, H2N2, H3N2) явились возбудителями гриппозных пандемий среди людей в XX столетии, другие – вызывают заболевания среди млекопитающих и птиц. Среди наиболее патогенных для домашних птиц выделяются вирусы с антигенной формулой H7N7 (вирус «куриной чумы») и H5N1, способные вызывать поголовную гибель кур. Высоко патогенные варианты вируса гриппа H7N7 вызвали в 2003 г. повсеместное поражение фермерских куриных хозяйств в Нидерландах, тогда как вирусы H5N1 явились причиной гибели миллионов кур в странах Юго-Восточной Азии, начиная с 1997 г.

Патогенность ВГП для людей. До недавнего времени считалось, что вирусы гриппа птиц не патогенны для людей и в случае заражения вызывают у них быстро преходящие симптомы конъюнктивита, легкое недомогание и иногда – слабо выраженный респираторный синдром. Это положение оказалось опровергнутым в 1997 г., когда вирусы гриппа А(H5N1) вызвали чрезвычайно тяжелые формы заболевания среди людей в Гонконге, в трети случаев закончившиеся летально. В результате быстрого поголовного уничтожения кур в этом регионе случаи дальнейшего инфицирования людей были предотвращены, однако спустя 5 лет (в 2003 г.) вирусом вновь заразились члены путешествующей по Китаю семьи с последующей гибелью отца семьи и мальчика.

В декабре 2003 г. и первом квартале 2004 г. вирус А(H5N1) *быстро распространился по 8 странам* Юго-Восточной Азии. Во время вспышки во Вьетнаме и Таиланде тяжело заболели 34 человека, более чем в 60% случаев заболевания закончились смертельными исходами. *В августе-октябре в этих странах вновь зарегистрированы случаи смертельных заболеваний, вызванных вирусом H5N1. Общее количество заболевших, по данным на 7 октября, 2004 г., составило 43 человека, 31 из них (72,1%) скончались.*

В последние годы в Китае, помимо H5N1, зарегистрированы случаи инфицирования людей вирусом гриппа H9N2, однако клиническая картина заболеваний была достаточно мягкой с благополучным исходом.

В Нидерландах в 2003 г. во время вспышки куриного гриппа А(H7N7) среди тесно контактирующего с птицей персонала были зарегистрированы случаи конъюнктивитов. Один из специалистов, задействованных в службе контрольных мероприятий, заразившийся гриппом, тяжело заболел и скончался от пневмонии. Других случаев тяжелых заболеваний зарегистрировано не было, что могло быть следствием применения среди персонала средств индивидуальной защиты и экстренной химиофилактики (озельтамивир).

Таким образом, за последние 7 лет вирусы гриппа птиц H5N1 и H7N7 в результате мутаций резко изменили свои биологические свойства и приобрели способность не только преодолевать хозяйский барьер с непосредственным инфицированием людей (минуя промежуточного хозяина), но и вызывать чрезвычайно тяжелые клинические формы заболеваний, значительная часть которых заканчивается летальными исходами.

Получены новые убедительные данные (Guan et al., 2004), что выделяемые вирусы субтипа H5N1 активно рассортируют и, преодолевая межвидовой барьер, «направляются» из резервуара водоплавающих птиц к домашним птицам, а в последнее время – к диким птицам, обитающим на суше, и к человеку. Это определяет необходимость более широкого надзора и контроля за инфекцией, в особенности, если учесть, что вирус гриппа (в отличие от других респираторных агентов, включая SARS) необычайно быстро распространяется и этот процесс не поддается контролю традиционными способами изоляции больных, карантинных мер или рекомендаций путешествующим людям. Это определяет срочную необходимость усиления надзора за гриппом для определения фактов, позволяющих птичьему вирусу передаваться людям и для последующей разработки эффективных вакцин против вируса H5 как для людей, так и для животных.

Если учесть, что источник инфекции удавалось инфицировать не во всех случаях, в особенности для детей, можно предположить, что вирус получил более широкое распространение в природе, чем предполагали до этого. В прессе появились сообщения о смертельных случаях среди кошек, хотя ранее считалось, что этот вид животных резистентен к гриппу.

Голландскими учеными в Эразмусском медицинском центре было осуществлено моделирование гриппозной H5N1 инфекции на 4-6 месячных европейских короткошерстных кошках, которых кормили мясом инфицированных цыплят или вводили вирус интратрахеально. Ученым удалось воспроизвести инфекцию с поражением нижнего респираторного тракта, включая альвеолярную ткань, с одним летальным исходом. Ими впервые показана возможность горизонтальной передачи инфекции – от инфицированных кошек здоровым. В этих исследованиях использовали вирус A/Вьетнам/1194/04(H5N1), выделенный от умершего больного. Т.о. впервые установлена возможность передачи инфекции домашним кошкам, которые могут способствовать адаптации вируса к другим млекопитающим (Kuiken et al., 2004). В сентябре сего года появились сообщения о случаях заболевания гриппом H5N1 собак и свиней. Вирусы, изолированные от свиней в провинции Fujian в 2001 и 2002 г.г., были родственны вирусу H5N1, выделенному недавно от птиц в Китае и имели высокий уровень гомологии с утиным штаммом H5N1.

Молекулярно-генетический анализ ВГП. Исследования первичной структуры генома высоко патогенных для людей штаммов вирусов гриппа H5N1 и H7N7 (1997-2004 гг. выделения), выполненные в различных лабораториях мира, включая Сотрудничающие с ВОЗ референс-центры по гриппу, Отдел вирусологии Эразмусского университета (Роттердам, Нидерланды) и др., показал, что они содержат в сайте расщепления молекулы гемагглютинина на две субъединицы множественные последовательности основных аминокислот (МАП), что является главным признаком патогенности возбудителя для кур Hatta et al (2001). Наличие таких мутаций обеспечивает вирусу высокую инфекционную активность и патогенность. В отличие от апаатогенных или слабо патогенных вирусов, у которых МАП последовательность не встречается, гемагглютинин высоко патогенных вирусов легко расщепляется не только трипсино-подобными протеазами, присутствующими в клетках респираторного тракта человека и кишечника птиц, но и убиквитарными фурино-подобными протеазами, которые экспрессируются в самых различных тканях, что придает патогенным вирусам способность поражать разные системы и органы (пантропизм).

Это положение было подтверждено на экспериментальных моделях в CDC (Атланта, США). В опытах на мышах, инфицированных вирусами H5N1, которые оказались высоко патогенными для них в исходном состоянии (без дополнительной специальной адаптации) обладали нейотропностью, были выявлены, что некоторые штаммы (например A/НК/483/97) реплицируются в различных органах, включая мозг, печень, селезенку, клетки крови, вызывая 100% гибель мышей на 7-8с после заражения,

тогда как другие вирусы были апатогенны и размножались только в легких (А/НК/486/97).

В мозгу высоко патогенные штаммы вируса вызвали очаговое поражение. Вирус обнаруживался как в глиальных клетках, так и в нейронах (Li et al., 1999).

Другой особенностью высоко патогенных штаммов ВГП является их способность сорбироваться не только на сиаловых рецепторах птиц (α 2,3), но и на человеческих рецепторах (α 2,6), что позволяет им расширить круг хозяев и инфицировать людей непосредственно в результате прямого контакта с пораженными птицами или их органами. По имеющимся сообщениям, высоко патогенные вирусы H5N1 2004 года выделения в сравнении с вирусами 1997-2003 года изоляции имеют дополнительные мутации в гене НА, что отразилось и на изменении их антигенных свойств. Большая часть изолятов оказалась резистентной к ремантадину, так что единственным препаратом, который мог быть применен для защиты от ВГП групп повышенного риска инфицирования, контактирующих с птицей, и особенно людей, занятых уничтожением инфицированного поголовья, был ингибитор вирусной нейраминидазы – озельтамивир.

Вирулентность вирусов гриппа H5N1, выделенных от людей в 1997 г., связывают также с особенностями строения неструктурного белка (NS), в частности, с присутствием в молекуле NS1 глутаминовой кислоты в 92 положении, что сообщает вирусам с замещением такого рода устойчивость к антивирусному действию интерферонов и фактора некроза опухолей (TNF α)(Seo et al., 2002).

Клинические особенности и патогенез заболеваний, вызванных ВГП А(H5N1), у людей. Заболевания отличаются тяжестью клинических проявлений, связанных на ранних стадиях болезни с развитием первичной вирусной пневмонии, осложняющейся респираторным дистресс-синдромом. Проявлениями пантропизма вируса и развивающегося в процессе инфекции токсикоза являлось поражение печени, почек, развитие лейко- и лимфопении.

Другими характерными признаками инфекции были гемофагоцитоз, повышенное содержание провосполительных цитокинов, в особенности интерлейкина 6, интерферона χ и TNF α , что является проявлением цитокиновой дисрегуляции (TO et al., 2001, Hatta et al., 2001).

2. ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ В ОБЛАСТИ ЛАБОРАТОРНОГО НАДЗОРА И КОНТРОЛЯ ЗА ГРИППОМ ПТИЦ. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГРИППА ПТИЦ В ЮГО-ВОСТОЧНОЙ АЗИИ И ДРУГИХ СТРАНАХ МИРА.

Недавние события, связанные с распространением птичьего гриппа H5N1, H5N7, H7N1 и H7N7, а также заболеваний, вызванных новым коронавирусом – возбудителем SARS показали важность усиления надзора за гриппом и другими ОРЗ.

Современной стратегической задачей в области охраны здоровья населения планеты, определенной Резолюцией 56-ой Всемирной Ассамблеи Здравоохранения, состоявшейся в Женеве 19-28 мая 2003 г., является предупреждение и контроль гриппозных пандемий и ежегодных эпидемий гриппа.

Всемирная организация здравоохранения заявила об отсутствии готовности к предстоящей гриппозной пандемии на национальном и глобальном уровне, что представляет существенную важность с учетом ожидаемой высокой смертности, социальных разрушений и громадного экономического ущерба. ВОЗ информировала также о том, что значимость гриппа в развивающихся странах недостаточно оценена и плохо документирована. Декларируется необходимость улучшения состава гриппозных вакцин, увеличения производственных мощностей предприятий, повышения всеобщей доступности лекарственных средств и улучшения надзора за заболеваемостью.

Создание действенных планов подготовки к пандемии позволит осуществлять более рациональные и экономически выгодные подходы и при текущих сезонных эпидемиях гриппа.

В резолюции 56 Всемирной Ассамблеи по здравоохранению даны рекомендации для стран-участников (приложение 1), поставлены дополнительные задачи перед ВОЗ (приложение 1 и 2).

Эти материалы со всей очевидностью свидетельствуют о том, что надзор за гриппом с лабораторной расшифровкой природы заболеваемости приобретает все большую значимость, в том числе на региональном, общегосударственном и глобальном уровне.

К настоящему времени созданы глобальные современные компьютерные системы представления и двустороннего обмена информацией по гриппу (Flu Net), где даются оперативные сведения о выделении вирусов гриппа и по эпидобстановке в различных странах мира.

Оперативность представления данных быстрой лабораторной диагностики (ИФ) становится одним из главных условий своевременного анализа ситуации по гриппу и ОРЗ, в частности, определения этиологической природы сезонных подъемов заболеваемости, что представит чрезвычайную важность в случае возникновения нового пандемического вируса, циркуляция которого (в отличие от ежегодных эпидемий) не носит сезонного характера и может начаться весной, летом или осенью. За последние годы изменилась биология возбудителей и вирусы гриппа птиц все чаще приобретают способность непосредственно инфицировать людей, вызывая клинически тяжелые формы заболеваний, в значительной части случаев заканчивающиеся летально. Известно, что вирусы гриппа, инфицирующие куриные хозяйства, подразделяются на 2 отдельные группы, отличающиеся по патогенности. Высоко патогенные вирусы гриппа (ВПГ) поражают кур с летальностью, достигающей 100%. Эти вирусы ограничиваются субтипами H5 и H7, хотя не все из них вызывают столь обширные поражения.

Вирусы других подтипов мало патогенны (МППВ) и служат причиной мягких респираторных заболеваний, депрессии и снижения яйценосности у кур.

События последних лет подтверждают гипотезу о том, что ВПГ субтипов H5 и H7 происходят из МПВ в результате серии последовательных мутаций, а МПВ интродуцируются в куриные хозяйства от диких перелетных птиц.

До настоящего времени инфекции, вызываемые ВПГ, редко встречались среди домашней птицы. За 40-летний период (1959 – 1998 г.) было зарегистрировано только 17 таких эпизодов.

Однако, начиная с 1997 г. до 2003 г. (т.е. за 6 лет) процесс активизировался - возникло 16 крупных вспышек в куриных хозяйствах, три из которых сопровождалось заболеваниями среди людей.

Вспышки гриппа птиц в разных странах мира (1997 - 2004 г.)

Вспышки гриппа А (H5N1) в Гонконге за период с 1997 по май 2003 г.г.

Первая вспышка гриппа А(H5N1) была зарегистрирована в Гонконге в марте – мае 1997 г. и затем повторилась в ноябре. Вирус был изолирован от ребенка, который умер от гриппа.

К декабрю 1997 г. вирус был выделен от 18 тяжело больных людей, 6 из которых скончались. Позднее серологическими методами было выявлено ограниченное распространение вируса от человека к человеку. Контроль за рынками птиц в Гонконге в 1997 г. показал широкое распространение вируса. В результате было принято решение о поголовном уничтожении кур во всех хозяйствах.

Однако, спустя 4 года высоко патогенный вирус H5N1 снова появился в фермерских хозяйствах. Вспышки были зарегистрированы в 2001 и 2002 г. Хотя вирус был генетически отличным от выделенного в 1997 г., около миллиона птиц было вновь уничтожено в 2002 г.

В феврале 2003 г. вирусы H5N1 вновь преодолели барьер хозяина и инфицировали членов китайской семьи, путешествующей по Китаю, с 2 летальными исходами (отец и сын). Вирус А (H5N1) был изолирован от умершего мальчика.

Эпидемия гриппа А (H5N1) в странах Юго-Восточной Азии (декабрь 2003г.-май 2004г.).

В декабре 2003-апреле 2004 г.г. за короткий промежуток времени вирус гриппа А(H5N1) вызвал беспрецедентную по размеру и скорости распространения эпидемию, которая за короткое время (около 2 мес.) охватила восемь стран Юго-Восточной Азии, поражая птицеводческие хозяйства, занятые разведением не только кур, но и уток, которые до этого времени проявляли устойчивость к предшествующим вариантам ВПГ. Вирус оказался способным инфицировать и вызывать тяжелые заболевания среди людей, по данным ВОЗ на 14 мая 2004 г. официально было зарегистрировано 34 случая заболеваний гриппом А(H5N1) среди людей, заразившихся ВПГ от кур. В результате этих заболеваний 23 человека, в том числе дети, скончались от гриппа (смертность составила 67,6%), т. е. в 2 раза выше, чем в 1997 году.

Хронология распространения

12 декабря 2003 г., Южная Корея: первая вспышка птичьего гриппа А(H5N1) была зарегистрирована в Южной Корее в фермерских хозяйствах, расположенных юго-восточнее Сеула, с уничтожением содержащихся в них 12000 цыплят и уток. Официальное подтверждение этиологии вспышки, связанной с высоко патогенным штаммом H5N1, было получено 17.12. 2003г. 26 декабря 2003 года в Южной Корее погибло и было уничтожено более 1.3 млн кур и уток.

5 января 2004 года:Вьетнам информировал ВОЗ о регистрации случаев тяжелых респираторных заболеваний у 11 ранее здоровых детей, госпитализированных в Ханое.

9 января 2004 года Вьетнам сообщил о вспышке гриппа птиц, которая привела к массовой гибели птиц.

13 января 2004 года: Япония подтвердила вспышку, в результате которой на юго-западе страны более 6000 цыплят было найдено умершими. Эта ферма поставляла кур в Гонконг и на Тайвань.

15 января 2004 года: Вьетнам сообщил о 13 случаях смерти среди людей, предположительно связанных с ВГП.

23 января 2004 года: Таиланд подтвердил первые два случая гриппа птиц у мальчиков и зарегистрировал птичий грипп в одной из своих провинций.

23 января 2004 года: Индонезия официально заявила, что вирус убил тысячи цыплят на острове Бали за последние три месяца, однако доказательств присутствия ВГП не получено.

25 января 2004 года: Камбоджа сообщила о случаях гриппа H5N1 в птичьих хозяйствах страны.

27 января 2004 года: Лаос включился в число стран, пораженных вирусом H5N1.

27 января 2004 года: Китай сообщил об обнаружении высоко патогенного вируса H5N1 в образцах от уток в южной провинции Гуанси.

6 февраля 2004 года: Индонезия. Доказана связь заболеваний гриппом птиц с вирусом H5N1.

11 февраля 2004 года: Китай. 23 фермы в 14 из 31 провинции охвачены гриппом H5N1

Реакция со стороны официальных органов на развитие эпидемии.

Продовольственная сельскохозяйственная организация при ООН (FAO) сообщила о своём намерении направить группы экспертов во Вьетнам для расследования вспышек ВГП 9 января 2004 года.

14 января 2004 года: ВОЗ информировала, что текущая вспышка гриппа птиц в Азии потенциально более опасна, чем SARS. Генеральный секретарь ВОЗ J. W. Lee заявил о необходимости безотлагательного начала тяжелой и дорогостоящей работы по предотвращению дальнейшего распространения гриппа птиц.

23 января 2004 года: Эксперты FAO сообщили, что по результатам контроля выяснено, что Вьетнам не проводит уничтожение цыплят в нужном объеме, чтобы предотвратить распространение вспышки.

27 января 2004 года: Совместное заявление ВОЗ, FAO и Всемирной организации охраны здоровья животных (OIE): “Быстрое распространение высоко патогенного вируса гриппа птиц в ряде регионов Азии является угрозой для здоровья людей и катастрофой для сельскохозяйственной промышленности”. “В результате эволюции вирус птичьего гриппа может превратиться в опасного для людей возбудителя”.

FAO, OIE и ВОЗ обратились к странам мира с просьбой о финансовой и технической поддержке в связи с повсеместным распространением птичьего гриппа в развивающихся странах для усиления контрольных мероприятий в целях предотвращения угрозы возникновения нового возбудителя пандемии.

28 января 2004 года: Пресс-релиз FAO/ВОЗ: Беспрецедентная по размерам вспышка гриппа H5N1 в странах Азии представляет серьезную угрозу для здравоохранения во всем мире. В документе подчеркивается необходимость принятия срочных специфических мероприятий для предотвращения дальнейших случаев заболеваний среди людей и снижения возможности появления нового пандемического вируса. Первоочередной мерой является быстрое и безопасное уничтожение всех птиц в инфицированных хозяйствах в странах, где зарегистрированы вспышки высоко патогенного птичьего гриппа H5N1. Генеральный директор ВОЗ призвал мировое медицинское сообщество включиться в борьбу с куриным гриппом. Рекомендовано усилить эпиднадзор и положить начало системам национального уведомления о вспышках заболеваний и гибели животных, которые могут иметь отношение к куриному гриппу. Кроме того, необходимо укрепить

эпиднадзор и в отношении заболеваний у человека, в частности, контролировать возникновение респираторных инфекций и пневмоний невыясненной этиологии, особенно среди лиц, имеющих контакты с зараженной птицей.

9 февраля 2004 года: Официальные представители и эксперты ВОЗ и FAO совместно с китайскими специалистами посетили различные провинции Китая в целях формирования плана борьбы с птичьим гриппом по всей стране.

Перспективы заноса гриппа А(Н5N1) в Россию.

Рисовые поля и банановые рощи Таиланда привлекают стаи мигрирующих аистов, уток и других водоплавающих птиц. Они прибывают сюда из Индии и Сибири. Зимой 2004 года многие дикие птицы умирали, что свидетельствует о высокой патогенности возбудителя. Предполагается, что перелётные птицы играют центральную роль в распространении гриппозной инфекции. Нельзя исключить, что они могут занести вирус гриппа H5N1 в северные провинции Китая, а затем в Сибирь и Дальневосточные регионы России при возвращении после зимовки в места гнездования.

Перспективы профилактики гриппа А(Н5N1) среди людей

По мнению специалистов Сотрудничающих Центров ВОЗ последняя вспышка гриппа птиц является беспрецедентной по числу вовлеченных стран и поражению птицеводческих хозяйств. Отмечается, что чем больше людей будет инфицировано, тем более высока вероятность того, что вирус может породить всемирную пандемию в результате приобретения способности к распространению от человека к человеку.

Это может произойти в результате мутаций в генах вируса или реассортации генома с заимствованием части внутренних генов от человеческих штаммов как результат одновременной коинфекции человека птичьим вирусом и эпидемическим штаммом (H3N2 или H1N1). Серьёзность проблемы до конца ещё не оценена. ВОЗ начала рассылку реагентов для идентификации вируса H5N1 в европейских лабораториях на случай, если вирус начнёт распространяться далее. “Необходимо быть готовым к наихудшему сценарию” – считают специалисты Эразмусского университета в Роттердаме. Перед лицом этой угрозы принимаются усилия к разработке вакцины для людей, способной предотвратить тяжелые последствия пандемии. В двух лабораториях мира – в составе Национального института биологических стандартов (Великобритания) и Детского исследовательского госпиталя в Мемфисе (США) были подготовлены прототипы вирусов гриппа, которые могли бы быть использованы для массового производства вакцин. Они были разработаны на основе птичьего вируса гриппа H5N1, послужившего причиной смерти человека в Гонконге в 2003 году. Однако проверка на животных защиты, формирующейся после иммунизации вакцинным штаммом 2003г., от последних возбудителей птичьего гриппа, выделенных в 2004 году, показал ее низкий уровень в связи с произошедшими выраженными антигенными изменениями вирусного гемагглютинаина. Установлено, что штаммы 2004 года, выделенные в Юго-Восточной Азии, слабо взаимодействуют с антисыворотками, полученными к вирусам гриппа H5N1, изолированным в 2003 году, что определяет необходимость введения новых референс-штаммов. Для подготовки нового вакцинного штамма из вируса 2004 года изоляции, который сильно мутировал от возбудителей 2003 года, использованы приемы обратной генетики в целях получения апатогенного варианта H5N1.

Вместе с тем ожидается, что массовое производство вакцины будет сдерживаться недостатком куриных эмбрионов, а также ограничениями со стороны контролирующих органов, поскольку вакцины, полученные методом обратной генетики, ещё не прошли клинических испытаний.

В отсутствие таких вакцин (само производство займет не менее трех месяцев) первой линией обороны против пандемического гриппа может явиться использование противовирусного препарата тамифлю (озельтамивир) – ингибитора вирусной нейраминидазы, поскольку вирусы гриппа H5N1 2004 г. выделения в результате точечной мутации в М-гене оказались резистентными к амантадину и ремантадину.

Вспышки гриппа среди животных иной этиологии

Грипп H9N2 в Гонконге (1999).

Вслед за первым фактом преодоления в 1997 г. хозяйских барьеров вирусами гриппа птиц H5N1 непосредственного инфицирования людей (минуя промежуточного хозяина) в марте 1999 г. в том же регионе (Гонконг) от двух детей (1 и 4 лет) был выделен новый птичий вирус А (H9N2), который в отличие от А (H5N1) в естественных условиях обычно не вызывает высокой смертности в куриных хозяйствах и никогда ранее не обнаруживался у людей. Источник и пути заражения детей вирусом А(H9N2) остались невыясненными. Дети были госпитализированы и полностью выздоровели. Роста респираторной заболеваемости в Гонконге среди людей в этот период не наблюдалось. Вместе с тем, необычные явления прямого инфицирования людей птичьими вирусами различной антигенной структуры в одном и том же регионе настораживают как возможный предвестник развития будущих пандемических событий, к которым необходимо готовиться.

Грипп H7N1 в Италии (1999 – 2001гг.)

В марте 1999 г. мало патогенный вирус гриппа H7N1 был изолирован в куриных хозяйствах Италии и за 9 месяцев в стране оказались инфицированными 199 ферм. В декабре вирус мутировал в высоко патогенный вариант, вызвавший еще 413 вспышек в последующие 2 года. Более 13 млн. кур погибло или было уничтожено. Случаев заболеваний среди людей зарегистрировано не было.

Грипп H7N7 в Нидерландах, Бельгии и Германии (2003 г.)

В конце февраля 2003 г. ВПГ субтипа H7N7 поразил ряд ферм в Нидерландах. Инфекция быстро распространилась и вызвала инфицирование кур более чем в 250 фермах с массовой гибелью и уничтожением около 30 млн. кур. К середине апреля несмотря на жесткие противоэпидемические меры инфекция распространилась на Бельгию (8 вспышек) и пограничный район Германии (1 вспышка). Был принят запрет на экспорт кур и связанных продуктов, ежегодный вклад которого в экономику страны составлял более 280 млн. евро.

Персоналу, обслуживающему куриные хозяйства, на вспышках была оказана поддержка в профилактике заболеваний. Были выданы мандаты на получение противовирусного препарата – озельтамивира и вакцинацию «человеческими» гриппозными вакцинами для снижения риска реассортации вирусов гриппа человека и птиц, опасность которой еще существовала, поскольку эти события по времени совпали с эпидемией гриппа А(H3N2).

Детальное обследование персонала пораженных ферм и контактных лиц, проведенное в период с марта по июнь 2003 г., позволило выявить 453 случая различных заболеваний, среди которых 349 (77%) человек имели симптомы острого конъюнктивита, 90 (20%) – гриппоподобных заболеваний, 67 человек – иные жалобы.

Вирус А/Н7 был обнаружен с помощью RT–PCR, выделения вируса или обоими методами в 82 первичных случаях инфицирования, 3 вторичных случаях и в 2 случаях, не имевших иных симптомов, кроме покраснения глаз. Кроме того, вирус был обнаружен еще у двух людей, не предъявлявших вообще каких-либо жалоб. В целом заболевания протекали доброкачественно и на фоне лечения озельтамивиром заканчивались выздоровлением, за исключением одного случая тяжелого гриппа с летальным исходом. Это заболевание развилось у одного из ветеринаров спустя 2 дня после посещения фермы с инфицированными курами. На фоне полного здоровья внезапно поднялась высокая температура, появились жалобы на сильную головную боль без признаков поражения дыхательной системы или глаз. Этот пациент не использовал антивирусной профилактической терапии. Спустя неделю после его визита на ферму у больного были взяты пробы для диагностических исследований. Результаты RT–PCR на птичий грипп Н7 и ряд других возбудителей ОРЗ из 2-х лабораторий оказались отрицательными. 9 дней спустя у больного была обнаружена пневмония, состояние пациента, несмотря на лечение антибиотиками, продолжало ухудшаться и к 12 дню были зарегистрированы признаки поражения различных органов. На 15 день болезни пациент скончался от дыхательной недостаточности. Вирус А/Н7 был обнаружен в бронхоальвеолярных смывах (на 11 день болезни) с помощью RT–PCR и выделения в клеточной культуре. При гистопатологическом исследовании легких были выявлены выраженные диффузные повреждения альвеолярной ткани.

В целях определения возможности передачи вируса А/Н7 от человека к человеку, было проведено обследование лиц, контактировавших с 83 больными, у которых диагноз был подтвержден лабораторно. В результате было выявлено 3 случая внутрисемейного инфицирования, которые протекали с симптомами конъюнктивита (2 случая) или конъюнктивита в сочетании с гриппоподобными симптомами (1 человек). Эти 3 случая контактной передачи инфекции были подтверждены лабораторными методами.

Анализ данных вирусологического обследования пациентов показал, что с наибольшей частотой вирус выделяется в первые дни болезни (до 4 с), причем более эффективно при обследовании мазков с конъюнктивы (позитивны до 44% случаев в первые 2 дня заболевания), тогда как в мазках из глотки вирус выделялся лишь в 12% случаев.

Вирусологическое обследование материалов, предварительно идентифицированных как позитивные в RT–PCR, позволяло повысить частоту изоляции вируса до 79%.

Все изолированные вирусы содержали внутренние гены от птичьих вирусов гриппа А и не имели в своем составе генов вирусов гриппа человека, что свидетельствует о том, что птичьи вирусы сами по себе стали потенциально патогенными для человека.

Выделенный вирус принадлежал к высокопатогенным птичьим вирусам гриппа А (H7N7) и был генетически связан с вирусами, выделенными в 2000г. от уток в Нидерландах в ходе планового надзора за гриппом.

В начале апреля в Нидерландах было начато выполнение программы серологического надзора в целях определения, инфицировал ли вирус гриппа А (H7N7) свиней, что могло иметь последствия как для этих животных, так и для людей.

Было обследовано 13 хозяйств высокого риска (ВР) инфицирования (смешанное содержание домашней птицы и свиней). Обследование сывороток, обработанных для удаления неспецифических ингибиторов токсином холерного вибриона и куриными эритроцитами, было проведено в РТГА с использованием вируса А (H7N7) в качестве антигена. Пороговым значением для отнесения в группу серопозитивных образцов считали титр 1/40.

В 5 из 13 хозяйств ВР выявлены животные с титрами $\geq 1/40$ с частотой от 5,1% до 26% (в контрольной группе животных – 1,1%), что свидетельствовало о состоявшейся

интродукции вируса в свиную популяцию, с одной стороны, и достаточной специфичности теста РТГА, оцененной в 97,4%, с другой.

Результаты дальнейших расширенных наблюдений привели специалистов к важному выводу: при смешанном содержании с инфицированной домашней птицей свиньи могут заразиться вирусом гриппа субтипа H7N7, но без дальнейшей трансмиссии возбудителя и его закрепления в популяции свиней (после удаления из хозяйств первичного источника инфицирования).

Лечение всех людей в инфицированных хозяйствах было начато только в середине марта (после подтверждения нескольких случаев заболевания гриппом A/H7 и первого случая передачи инфекции по контакту), поскольку до этой вспышки считалось, что риск инфицирования людей вирусом A (H7N7) очень невелик, и единичные заболевания проявляются в виде конъюнктивитов. Кроме того, не было четких рекомендаций по широте охвата и длительности профилактического использования озельтамивира. Аргументами против его широкого применения служили:

- 1) Этическая дилемма назначения препарата с возможными побочными эффектами здоровым людям для того, чтобы защитить других.
- 2) Массовое назначение препарата без учета индивидуальных медицинских показаний могло негативно повлиять на национальную политику ограничения использования медикаментов.
- 3) Потенциал формирования резистентности к химиопрепарату.
- 4) Применение и совершенствование мер личной защиты может быть столь же эффективным, как и использование препарата.
- 5) Нежелание принимать озельтамивир может быть достаточно частым.

Полученный опыт с наиболее крупной и тщательной документированной вспышкой птичьего гриппа A (H7N7) среди людей дал новые данные о потенциале трансмиссии птичьих вирусов людям. Частота инфицирования значительно превышала имевшиеся ранее данные, однако осталось не ясным, явилось ли это следствием изменения биологии возбудителя или результатом тщательности проведенного обследования с учетом и слабо выраженных форм заболеваний.

Размер вспышки, которая совпала с пиком активности “человеческих” вирусов гриппа, усилил опасение относительно возможности возникновения нового пандемического вируса в результате реассортации генов птичьих и “человеческих» вирусов непосредственно в организме человека, а также показал крайнюю сложность отслеживания и ограничения распространения таких вирусов.

Несмотря на чрезвычайно быстрое принятие решения о мерах профилактики и усилий по их проведению (через неделю после первого подтвержденного случая инфицирования человека) более 1000 человек в Нидерландах и других странах подверглось опасности инфицирования. Таким образом, если бы появился вариант вируса с более эффективной способностью к распространению, сдержать его было бы крайне трудно. Это определяет необходимость предварительной апробации имеющихся планов подготовки к пандемии, включая создание запасов необходимых средств контроля, таких как вакцины и противовирусные препараты (Koormans M. et al., 2004).

Другие случаи недавнего инфицирования людей вирусами гриппа неизвестного происхождения.

Грипп A(H7N2), штат Нью-Йорк, США.

В ноябре 2003г. в один из госпиталей поступил пациент из штата Нью-Йорк с симптомами, не типичными для гриппа, но с кашлем. Ему был поставлен первичный диагноз грипп A(H1N1) и вирус был направлен в CDC для антигенной характеристики. В апреле был получен ответ, что по результатам серологических исследований и

типирования изолята действительным возбудителем заболевания является мало патогенный вирус А(Н7N2).

Источник инфекции не был найден. Пациент не работал ранее с птицами, ни у членов его семьи, ни у сотрудников не было найдено следов этой инфекции.

Грипп А(Н10N7), Египет.

Вирус гриппа А (Н10N7) ранее периодически выделялся от диких и домашних птиц в разных частях мира, а также от млекопитающих (норки) и характеризовался низкой патогенностью.

Недавно он был выделен от двух больных детей (кашель с лихорадкой) в возрасте 1 года в Египте. Источник инфицирования не идентифицирован, хотя установлено, что отец одного из заболевших занимался торговлей домашней птицей.

Грипп Н5N7 в Дании (2003г.)

В сентябре 2003 г. впервые от уток в Дании выделен вирус Н5N7. Этот тип никогда ранее не идентифицировался и не обнаруживался у людей. Пока этот вирус отнесен к разряду МПВ.

Грипп А (Н7N3) в штате Техас (США), май 2004.

В конце мая 2004г. появилось сообщение о депопуляции одного из коммерческих птицеводческих хозяйств (Hopkins County) с уничтожением более 24000 кур в связи с появлением лабораторных (серологических) данных об инфицировании птицы вирусом гриппа А(Н7N3).

Вирус не вызвал тяжелых форм заболевания или повышенной смертности, что свидетельствовало о его низкой патогенности. Тем не менее ветеринарными службами были введены необходимые ограничения для всех форм в радиусе 10 миль до завершения лабораторного тестирования образцов крови и мазков от птиц в этих хозяйствах.

Вспышка гриппа А(Н7N3) в Канаде (февраль-апрель 2004г.)

Крупная вспышка, вызванная вирусом гриппа А(Н7N3), была зарегистрирована в одном из регионов (Fraser Valley) Британской Колумбии в Канаде.

Вспышка началась в феврале 2004 г. в хозяйствах Abbotsford и широко распространилась в марте по Британской Колумбии. К концу апреля 36 форм оказались пораженными вирусом, следствием чего было решение об уничтожении 19 млн. поголовья кур в регионе, расположенном между городами Ванкувер и Хоуп. Среди работников ферм диагностировано 2 лабораторно подтвержденных (RT-PCR и выделение вируса) случая инфицирования вирусом А (Н7N3). Заболевшие рабочие были в тесном контакте с инфицированной птицей. Они использовали защитные средства (перчатки, маски, спецодежду), но не были вакцинированы и не принимали профилактически противовирусных препаратов. Заболевания протекали в мягкой форме в виде конъюнктивитов с головной болью и завершились полным выздоровлением после лечения озельтамивиром. Факторов передачи вируса от человека к человеку не зарегистрировано. Хотя к началу апреля симптомы конъюнктивита или ОРЗ были выявлены ещё у 10 работников ферм, лабораторного подтверждения гриппа Н7 получено не было.

Вирус гриппа А (Н7N3) ранее был известен как мало патогенный, однако в результате небольших мутаций в геноме (вставка в месте расщепления молекулы гемагглютинина на две субъединицы) он приобрел высокую патогенность для кур. По данным специалистов CDC (Британская Колумбия) в составе этого вируса гены «человеческих» вирусов гриппа не обнаружены.

Заключение

Один из наиболее настораживающих аспектов недавних вспышек птичьего гриппа состоит в том, что некоторые из них (H5N1, H7N3, H7N2, H10N7, H7N7, H9N2) приобрели способность непосредственно инфицировать людей, минуя так называемых "промежуточных хозяев". Это создает возможность одновременной коинфекции людей человеческими и птичьими вирусами с результирующим возникновением реассортантов, несущих поверхностные гены от птичьих вирусов, а внутренние гены от эпидемических человеческих вирусов, которые могут придать возбудителю способность к трансмиссии в популяции людей и породить новый пандемический вирус.

Сказанное определяет необходимость расширения надзора за гриппом с особым вниманием к вирусам, обладающим высокой патогенностью (H5, H7). Чрезвычайно важно контролировать случаи инфицирования людей, в особенности, если эти события совпадают по времени с текущими эпидемиями.

Тесное взаимодействие с ветеринарными службами становится новым важным элементом совершенствования надзора за гриппом в плане подготовки к очередной пандемии.

При этом основные направления в области совершенствования лабораторного надзора за гриппом и другими ОРВИ в России сводятся к следующим мероприятиям:

- увеличение объема и результативности исследований по выделению вирусов гриппа от больных людей и животных и лабораторной диагностик гриппа, в т. ч. среди животных.
- повышение оперативности представления в Федеральный и Национальные центры по гриппу и ОРЗ данных быстрой диагностики ОРВИ с применением иммунофлуоресцентного анализа (еженедельно, одновременно с данными по заболеваемости).
- расширение спектра идентифицируемых агентов, вызывающих ОРВИ с включением возбудителей коронавирусных инфекций, микоплазмы пневмонии и вирусов герпеса.
- установление взаимодействия с региональными ветеринарными службами, контролирующими заболеваемость на птицефабриках (контроль за появлением вирусов H5, H7, H9, способных напрямую инфицировать человека)
- проведения серологических исследований иммунитета к вирусам H5, H7, H9 у работников птицефабрик, как маркера прямого инфицирования людей вирусом птичьего гриппа.

Приложение 1

«Предупреждение и контроль гриппозных пандемий и ежегодных эпидемий»

Резолюция 56 всемирной ассамблеи по здравоохранению для стран-участников (Женева, 19-28 мая, 2003 год)

- Для стран, где осуществляется национальная политика вакцинации против гриппа, увеличить охват вакцинацией всех людей, входящих в группы высокого риска, с охватом не менее 50% лиц пожилого возраста к 2006 г. и 75 % к 2010 г.
- Для стран, где нет национальной политики защиты от гриппа - ввести ее, с определением заболеваемости и экономического ущерба от ежегодных эпидемий.
- Ввести в действие национальные планы подготовки к гриппозным пандемиям, в особенности в части адекватного снабжения вакцинами, противовирусными препаратами и другими жизненно важными медикаментами.
- Повысить готовность к эпидемиям и пандемии путем усиления национальных систем надзора и лабораторных служб.
- Поддерживать исследования и разработки по совершенствованию гриппозных вакцин и повышению эффективности противовирусных препаратов, в особенности, в части их доступности для применения в развивающихся странах.

Приложение 2

Рекомендации для всемирной организации здравоохранения
(из резолюции 56 Всемирной Ассамблеи по здравоохранению)

- Продолжить работу по борьбе с гриппом с вовлечением новых партнеров;
- Осуществлять координацию в области определения приоритетов деятельности (в соответствии с положениями, определенными в руководстве по глобальному надзору и контролю за гриппом;

- *Оказывать поддержку развивающимся странам в вопросах определения медицинского и экономического ущерба от гриппа и формирования национальной политики профилактики и защиты от гриппа;*
- *Усилить систему глобального надзора как решающего компонента подготовки к сезонным эпидемиям и к пандемии гриппа;*
- *Обеспечить техническую поддержку государств-участников в разработке национальных планов подготовки к пандемии;*
- *Совместно с другими партнерами изыскивать способы преодоления существующего в мире дефицита с обеспечением странам равной доступности гриппозных вакцин и противовирусных препаратов и расширением их применения.*

3. РЕКОМЕНДАЦИИ ВСЕМИРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ПО ГЛОБАЛЬНОМУ НАДЗОРУ ЗА ГРИППОМ А(Н5)

В настоящее время в Азии широко распространилась эпидемия, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа птиц (ВПГ) А(Н5N1) в популяциях животных, особенно среди кур, которая представляет реальную угрозу для здравоохранения. Эти вирусы не только могут инфицировать людей, вызывая тяжелые заболевания с высокой смертностью, но в результате их адаптации или реассортации с другими вирусами гриппа появляется возможность возникновения нового пандемического вируса.

В целях глобального мониторинга ситуации и координации глобальных усилий Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует усилить надзор за гриппом А(Н5). По мере развития ситуации ВОЗ будет корректировать эти рекомендации и обновлять их по мере необходимости.

Цель и основные задачи

Осуществлять мониторинг за распространением вирусов гриппа А/Н5 среди людей и в популяциях животных для того, чтобы оценить их глобальное распространение, уровень риска для здравоохранения, их пандемический потенциал в целях определения времени начала деятельности органов здравоохранения по подготовке к пандемии в соответствии с *Планом подготовки к пандемии* (документ WHO/CDC/CSR/EDC/99/1, доступный в Интернете по адресу: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/n/whocdscsredc991.pdf>)

Специфические задачи

1. Осуществлять мониторинг за появлением случаев гриппа А/Н5 среди людей на глобальном уровне.
2. Проводить идентификацию и давать характеристику каждого появившегося штамма вируса гриппа Н5 для уточнения стратегии контроля.
3. Осуществлять мониторинг изменений в характере трансмиссии вирусов гриппа А/Н5 и выявлять их потенциал к распространению в человеческой популяции.
4. Проводить мониторинг необычной заболеваемости и смертности при острых респираторных заболеваниях.
5. Давать дополнительную информацию к мониторингу вспышек ВПГ в популяциях животных.

Способы, содействующие осуществлению надзора за распространением вируса гриппа А(Н5).

В соответствии с эпидемиологической ситуацией потребуется разработка руководства по терапии и форм регистрации случаев заболевания для каждой отдельной страны или территории с иерархической идентификацией случаев. В приложении 1 дается пример идентификации случаев птичьего гриппа, примененный во Вьетнаме, где вирусы гриппа А/Н5 были распознаны как этиологические агенты заболеваний среди людей и в популяциях животных. В целом, страны или территории, где зарегистрированы вспышки среди животных, нуждаются в более чувствительном способе идентификации случаев, для того чтобы начать лабораторное исследование (по сравнению со странами или территориями, где вспышки ВПГ не зарегистрированы).

Идентификационные признаки случаев гриппа А/Н5, принятые на региональном уровне (для руководства органов здравоохранения и инфекционных стационаров) могут меняться в зависимости от характера вспышки ВПГ среди животных и размеров страны. Вместе с тем, определение подтвержденных случаев гриппа А/Н5 должно быть стандартизировано на всех уровнях (см. ниже: *Определение подтвержденных случаев*).

Схема классификации случаев заболевания, включенная в данные рекомендации, основана на применявшейся во Вьетнаме. Государства-участники должны адаптировать эти рекомендации к собственным схемам классификации.

1. Мониторинг возникновения случаев инфекции вирусом гриппа А/Н5 у людей (на глобальном уровне)

Введение надзора за гриппом А/Н5 среди людей имеет решающее значение для:

- обеспечения руководящих органов здравоохранения свежей информацией о возникновении случаев гриппа А/Н5 среди людей;
- выявления регионов, где зарегистрирован грипп А/Н5 для последующего целевого надзора и осуществления контрольных мероприятий;
- содействия координации международных усилий ученых для подготовки рекомендаций по разработке гриппозных вакцин из нового возбудителя пандемии

Ситуации, подлежащие надзору

С целью глобального надзора стран-участников просят сообщать в ВОЗ о всех лабораторно подтвержденных случаях гриппа А/Н5, следуя определению зарегистрированного случая, приведенному ниже, и в соответствии с процедурами, описанными в разделе «Сообщение и распространение информации», приведенном ниже. Стран-участников также просят сообщать в ВОЗ информацию о случаях гриппа А(Н5) в ситуациях, изложенных в Разделе 3, «Мониторинг изменений в путях передачи вируса и выявление возможной передачи вирусов А/Н5 от человека к человеку».

А. Для стран и территорий, где вирусы гриппа А/Н5 были идентифицированы как причина заболевания в популяциях людей или животных с 1 октября 2003, решение, проводить ли тестирование на вирусы А/Н5, должно быть результатом обоснованной оценки степени риска с учетом следующих факторов:

- клиническая характеристика, включая смерть от невыясненного респираторного заболевания;
- анализ сообщений о вспышках ВПГ среди местных популяций животных (птиц);
- наличие контакта за 7 дней до появления клинических симптомов (непосредственно или на расстоянии) с заболевшим, у которого подтвержден случай инфекции вирусом А(Н5);
- наличие контакта за 7 дней до появления клинических симптомов (непосредственно или на расстоянии), с заболевшим острым респираторным заболеванием невыясненной этиологии, позднее приведшим к смерти;
- положительный лабораторный тест на грипп А(Н5).

Примечание: Лабораторные исследования на грипп А(Н5) могут также проводиться в контексте намеченных эпидемиологических исследований. О случаях, подтвержденных

лабораторно в этих обстоятельствах, также должно быть сообщено, невзирая на клиническую картину.

В. Для стран и территорий, где вирусы гриппа А(Н5) не были обнаружены как причина заболевания в человеческой популяции или в популяции животных с 1 октября 2003 г., решение, проводить ли тестирование на вирусы гриппа А/Н5, должно быть результатом обоснованной оценки риска с учетом как географической близости к странам и территориям, откуда поступали сообщения о вспышках ВПГ в популяциях животных, так и при следующих обстоятельствах:

- Тяжелая клиническая картина невыясненного острого респираторного заболевания, в т. ч. закончившаяся смертельным исходом;
- профессиональный риск инфицирования;
- проживание в области, где имеются сообщения о случаях смерти среди домашней птицы;
- выявление случаев, при которых за 7 дней до появления клинических симптомов в анамнезе указывается о путешествии в страну или на территорию, где имеются сообщения о вспышках ВПГ гриппа А (Н5N1) в популяциях животных, а также одного или более из следующих данных:

- тесный контакт (в пределах 1 метра) любого характера с инфицированной (живой или мертвой) домашней птицей, другими видами птиц или со свиньями;
- нахождение в условиях, где содержалась домашняя птица или свиньи в предшествовавшие 6 недель;
- контакт (прямой или опосредованный) с лицом у которого был подтвержден случай человеческой инфекции вирусом А/Н5;
- контакт (прямой или опосредованный) с больным с невыясненной острой респираторной инфекцией, которая позже привела к смерти;
- положительный лабораторный тест на грипп А

Определение «подтвержденного» случая

«Подтвержденными» случаями гриппа А/Н5, прижизненными или посмертными, считаются заболевания, при которых лабораторное тестирование дает следующие результаты:

- Положительная вирусная культура на А/Н5 (выделение возбудителя);
- Положительные результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) на А/Н5;
- Положительный иммунофлюоресцентный анализ на Н5-антиген с использованием Н5-моноклональных антител;
- 4-х кратное повышение титра специфических Н5 – антител в парных образцах сыворотки от заболевших.

Лабораторные тесты для диагностики гриппа А/Н5, включенные в определение «подтвержденного» случая, считаются стандартными при выявлении этих вирусов.

ВОЗ рекомендует чтобы лабораторные результаты на грипп А/Н5 были подтверждены Национальным центром по гриппу или иной соответствующей лабораторией. Любой образец или изолят, который не типизируется как подтип Н3 или Н1 гриппа А, должен быть немедленно послан в Сотрудничающий по гриппу центр ВОЗ или иную, рекомендованную ВОЗ, референс-лабораторию.

ВОЗ также рекомендует, чтобы первичное лабораторное обнаружение вируса гриппа А/Н5 у людей в любой стране и на любой территории было подтверждено одной из референс-лабораторий ВОЗ по диагностике гриппа А/Н5.

В дополнение, и до особого распоряжения, ВОЗ просит чтобы все выделенные от людей вирусы H5 или образцы посылались в одну из референс-лабораторий ВОЗ по диагностике гриппа А/Н5.

Странам или территориям, где отсутствует возможность осуществлять лабораторные исследования гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) или острых респираторных заболеваний (ОРЗ) рекомендуется консультироваться с соответствующими представительствами ВОЗ (Национальный центр по гриппу) в стране или с региональными представительствами ВОЗ для получения совета и технической помощи, а также информировать их о случаях отправки образцов для идентификации и последующего изучения.

¹Профессии, связанные с риском: работники птицеводческих хозяйств или свиноферм, работники предприятий по обработке домашней птицы, сортировщики птицы (лов, упаковка или транспортировка птиц, утилизация мертвых птиц), работники зоорынков, работающие с живой или только что забитой домашней птицей, дилеры и продавцы домашних птиц, работники лабораторий, где проводятся тесты на вирусы гриппа А/Н5, работники системы здравоохранения

² К домашней птице относится та, которая обычно выводится для получения мяса, яиц, перьев и содержится в загонах или сходных помещениях, включая цыплят, уток, гусей, индеек, цесарок

Сообщение и распространение информации

ВОЗ просит, чтобы страны-участники немедленно сообщали о первом же отдельно выявленном случае, осуществляли подтверждение случая в соответствующее представительство ВОЗ в стране, региональное представительство ВОЗ и штаб-квартиру ВОЗ по эл.почте или факсу.

Как только выявлен первый случай, ВОЗ просит, чтобы резюмированные сообщения о подтвержденных случаях ежедневно посылались в соответствующее представительство ВОЗ в стране, региональное представительство и Штаб-квартиру ВОЗ (см. Приложение 2: Форма таблицы для ежедневных сводок по стране). Стран-участников просят ежедневно присылать сводки по электронной почте или факсу или через защищенный паролем веб-сайт «Глобальный Атлас ВОЗ». Любая страна-участник, желающая сообщать ежедневные сводки через веб-сайт «Глобальный Атлас ВОЗ» должна связаться по адресу outbreak@who.int для получения своего url-адреса и специального пароля.

ВОЗ просит чтобы информация по каждому случаю еженедельно посылалась в виде списка (см. Приложение 3 и 4). Список должен включать подтвержденные случаи всех лиц, кому поставлен диагноз гриппа А(Н5) и все неподтвержденные случаи. Форма, отражающая уведомление о случае заболевания, представлена в Приложении 5.

Кроме того, ВОЗ просит стран-участников посылать формулировки своих определений случаев и любые последующие пересмотры этих определений в соответствующее представительство ВОЗ в стране, региональное представительство ВОЗ и Штаб-квартиру ВОЗ по эл.почте или факсу.

Только информация, отражающая подтвержденные случаи, будет доступна для общественности.

2. Идентификация и характеристика каждого появившегося штамма для информирования контролирующих органов

Лабораторные тестирования для определения подтвержденных случаев относятся только к гемагглютиниру H5, но не к N- гликопротеиду (нейраминидазе). В случае подтвержденной вспышки гриппа А (H5N1) в популяции животных не исключена вероятность, что случаи гриппа у людей обусловлены тем же вирусом. Хотя лабораторные исследования по определению подтипа N должны быть проведены, сообщать о них не нужно. Стран-участников, не имеющих возможности проведения субтипирования N, просят направлять образцы в одну из соответствующих референс-лабораторий по диагностике гриппа А(Н5).

В процессе подтверждения случая инфекции вирусом А(Н5) должен быть выполнен генетический и антигенный анализ вируса. ВОЗ просит стран-участников передавать копии оригинальных образцов и выделенные вирусы в одну из референс-лабораторий ВОЗ по диагностике гриппа А(Н5) для дополнительного генетического и антигенного анализа.

Сообщение и распространение информации

ВОЗ просит, чтобы результаты субтипирования гриппа А/Н5 включались в списки и обновлялись сразу, как только они становятся доступными.

ВОЗ просит, чтобы результаты генетической и антигенной характеристики штаммов вируса были интегрированы в Глобальную Программу ВОЗ по гриппу по электронной почте или факсу.

Для дальнейшей информации, касающейся лабораторного процессинга, см.:

- указания ВОЗ по сбору человеческих образцов для лабораторной диагностики гриппа А/Н5
- указания ВОЗ по хранению и транспортировке образцов от людей и животных для лабораторной диагностики гриппа А(Н5), а также
- указания ВОЗ по биозащите при обращении с образцами, подозреваемыми на содержание неизвестных подтипов вируса гриппа человека.

Эти документы доступны на сайте:

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/en

3. Мониторинг изменений в характере трансмиссии и выявление возможной передачи вирусов гриппа А/Н5 от человека к человеку.

Изменения в характере трансмиссии гриппа А/Н5, в особенности начало его передачи от человека к человеку, могут быть индикатором антигенного дрейфа, сигнализирующего об усилении способности вируса вызывать заболевания у людей и увеличении риска генетической реассортации вирусов в человеческой популяции. Своевременное обнаружение этих событий в сочетании с соответствующим лабораторным надзором будет содействовать скорейшей разработке гриппозных вакцин из пандемического вируса и служить основанием для введения специфических мероприятий в целях снижения распространения вируса в человеческой популяции.

Осуществление надзора

Форма регистрации случая заболевания должна быть заполнена по каждому индивидууму (лицу), у которого предполагается диагноз гриппа А/Н5 (см. Приложение 5). Это обеспечит предварительную информацию о предшествующем анамнезе и помощь в дальнейших углубленных исследованиях. Все лица должны быть подвергнуты классификации, согласно принятому в стране определению случая заболевания.

А. ВОЗ рекомендует проводить широкие исследования первого подтвержденного случая гриппозной вирусной инфекции А/Н5, выявленного районными органами

здравоохранения любой страны или территории, чтобы определить распространение и вероятность передачи инфекции от человека к человеку.

Последующие подтвержденные случаи должны быть исследованы подобным образом с приоритетом, отданным:

- случаям с наиболее ранними датами начала заболевания;
- случаям среди постоянных жителей в областях, где не было зарегистрировано вспышек в популяциях животных;
- случаям среди работников здравоохранения;
- случаям с зарегистрированным контактом с подтвержденным случаем заболевания при отсутствии других факторов риска;
- Случаям, являющимся частью кластера³;
- Спорадическим случаям без зарегистрированного воздействия факторов риска.

ВОЗ будет отдавать приоритеты в формировании групп содействия для сотрудничества в этих исследованиях.

В. ВОЗ предлагает странам-участникам ежедневно регистрировать число вновь госпитализированных лиц с предполагаемым диагнозом А/Н5. Это является индикатором потенциального распространения заболевания в популяции и включено в Форму ежедневных обобщенных данных по стране (см. Приложение 2).

С. ВОЗ предлагает странам-участникам содействовать проведению ежедневной регистрации подтвержденных случаев заболевания, при которых не зарегистрирован контакт с животными⁴ в лаборатории. В дополнение ВОЗ предлагает проводить регистрацию числа подтвержденных случаев заболевания, при которых анамнез о возможном контакте не известен или не выявлен. Эти индикаторы включаются в форму ежедневных обобщенных данных по стране (см. Приложение 2). ВОЗ будет использовать эти индикаторы для проверки возможности передачи вируса от человека к человеку.

Д. В заключение, ВОЗ предлагает проводить детальное ежедневное описание текущего числа лиц с предполагаемым диагнозом А/Н5. Это детальное описание включается в Форму ежедневных обобщенных данных по стране (см. Приложение 2). Увеличение числа лиц с предполагаемым диагнозом А/Н5 может быть одним из первых индикаторов изменения характера трансмиссии.

Сообщение и распространение информации

ВОЗ предлагает странам-участникам незамедлительно посылать краткий отчет о любых свидетельствах передачи возбудителя от человека к человеку в соответствующий офис ВОЗ в стране, региональный офис или штаб-квартиру ВОЗ по e-mail или факсу. Описание должно включать информацию о числе случаев и вероятных цепях передачи.

ВОЗ предлагает чтобы страны-участники адаптировали Форму ежедневных обобщенных данных по стране (см. Приложение 2) к своим схемам классификации случая заболевания и ежедневно докладывали суммарные данные по e-mail или факсу или через защищенный web. сайт ВОЗ.

³ – «кластер» - 2 или более лиц, у которых диагноз гриппа А/Н5 был подтвержден (включая умерших от необъясненного респираторного заболевания), с появлением симптомов в течение 2-х недель и тех, кто связан по месту проживания (дом, семья, госпиталь и др., казарма.....)

⁴ – «не зарегистрирован контакт с животными групп риска» – определяется как отсутствие контакта с живыми или мертвыми домашними птицами, дикими птицами или свиньями в любом месте, отсутствие контакта по месту, где была домашняя птица или свинья в предыдущие 6 недель, отсутствие профессионального контакта с животными из групп риска.

Любой член ВОЗ, желающий ежедневно докладывать суммарные данные через веб-сайт ВОЗ, должен связаться по outbreak@who.int для получения адреса и собственного специфического пароля.

ВОЗ также предлагает, чтобы информация о случаях заболевания посылалась еженедельно в формате line-listing. Документ должен включать подтвержденные случаи, всех лиц, у которых предполагается диагноз А/Н5 и неподтвержденные (исключенные) случаи.

Только информация о подтвержденных случаях заболевания может быть доступна общественности.

4. Мониторинг необычной заболеваемости и смертности от острых респираторных заболеваний.

Выявление необычного увеличения заболеваемости и смертности от острых респираторных заболеваний должна быть отправной точкой для своевременных лабораторных исследований и соответствующих мероприятий со стороны органов здравоохранения.

Осуществление надзора.

ВОЗ рекомендует странам-участникам продолжить существующий надзор за гриппоподобными инфекциями и острыми респираторными заболеваниями.

ВОЗ рекомендует странам-участникам, обладающим *системой раннего оповещения* о заразных заболеваниях или *системой надзора за тяжелыми или опасными острыми респираторными заболеваниями*, такими как тяжелый острый респираторный синдром (SARS), активно исследовать любые необычные случаи и обеспечить надлежащий уровень лабораторных исследований по гриппу.

При отсутствии системы раннего оповещения о заразных заболеваниях или системы надзора за тяжелыми или опасными острыми респираторными заболеваниями страна-участник должна обеспечить выполнение надзора для выявления необычных или необъяснимых случаев острых респираторных заболеваний, для того чтобы начать необходимые лабораторные исследования и работу соответствующих служб здравоохранения.

Направления надзора должны определяться как уровнем риска, так и имеющимися возможностями и инфраструктурой.

При этом могут быть реализованы одно или более из направлений надзора:

- общий (или основанный на данных госпитализации) надзор за лицами или кластерами лиц с острыми респираторными заболеваниями при поступлении в стационар;
- надзор за необъяснимыми случаями смерти от острого респираторного заболевания в коллективах;
- надзор за необъяснимыми случаями смерти от острого респираторного заболевания в учреждениях по оказанию мед помощи;
- мониторинг продажи препаратов против гриппозной вирусной инфекции типа А, антимикробных препаратов, обычно применяемых для лечения острых респираторных инфекций, деконгестантных препаратов или препаратов от кашля.

В странах и на территориях, где вирусы гриппа А/Н5 были идентифицированы как причина заболевания в популяциях людей или животных, начиная с 1 октября 2003г., а также в странах и на территориях, граничащих с ними, но не имеющих никакой зарегистрированной активности гриппа А/Н5, внимание должно быть направлено на активный надзор за фебрильными заболеваниями в группах риска по

профессиям, определенным в *Форме 1: Надзор за глобальным распространением вирусной гриппозной инфекции А(Н5) у людей.*

Для увеличения способности выявления необычных или необъяснимых случаев острых респираторных заболеваний все институты и организации, ответственные за оказание медицинской помощи на уровне больниц в данной стране или на территории, обязаны поддерживать участников надзора и своевременно представлять информацию в органы здравоохранения.

Где это возможно, надзор за SARS и гриппом А/Н5 должен быть интегрирован.

ВОЗ будет продолжать изучать сведения международных служб здравоохранения, включая сведения о необычных случаях острых респираторных заболеваний, а также разыскивать дальнейшую информацию о таких сведениях от стран-участниц.

Сообщения и распространение информации

ВОЗ предлагает странам-участницам немедленно сообщать о любых необычных или необъяснимых случаях после исследования на грипп А/Н5 в соответствующей офис страны, региональный офис ВОЗ и штаб-квартиру ВОЗ по e-mail или факсу). Это даст возможность ВОЗ оказать своевременную помощь в изучении этих случаев, а также обеспечить своевременное и достоверное распространение информации среди других стран-участниц, средств информации и общественности.

5. Мониторинг глобальной активности вирусов гриппа А/Н5 в популяциях животных

Глобальный надзор за вспышками ВПГ у животных является основой для выявления циркуляции тех подтипов вируса гриппа типа А, которые способны стать причиной новой пандемии гриппа у людей. Во время текущей широко распространенной эпизоотии ВПГ среди животных в Азии, вызванной гриппом А(Н5N1), новейшая информация о вспышках ВПГ животных требуется ВОЗ и органам здравоохранения во всем мире для оценки опасности заболевания и риска заражения.

Надзор, регистрация и распространение информации

Страны-участницы Всемирной Организации Здоровья Животных (ОИЕ) в настоящее время обязаны срочно (в течение 24 часов) докладывать о предполагаемых или подтвержденных вспышках ВПГ у животных в ОИЕ. ОИЕ публикует на WEB-сайте информацию о любом зарегистрированном случае, ставит в известность главу ветеринарного офиса или генерального директора Департамента животноводства. Даже в отсутствие формальной регистрации, ОИЕ также отвечает за сообщения о странах и территориях, где выявлены вспышки ВПГ, вызванные вирусом гриппа А/Н5. Суммарные данные о текущих вспышках ВПГ у животных доступны на WEB-сайте ОИЕ (см. *Update on avian influenza in animals in Asia: http://www.oie.int/eng/en_index.htm*).

ВОЗ осуществляет сотрудничество как с ОИЕ, так и с Сельскохозяйственной Организацией при ООН (FAO). С помощью этого сотрудничества ВОЗ будет изучать сведения международных служб здоровья, включая сведения о случаях смерти животных групп риска или о вспышках ВПГ среди животных и разыскивать дальнейшую информацию о таких сведениях для стран-участниц. Любая информация, которую получит ВОЗ, о том, что эти сведения о вспышках ВПГ достоверны, будет сообщена в ОИЕ и FAO.

ВОЗ предлагает странам-участницам привлекать все соответствующие правительственные органы для координации надзора и обмена информацией о своевременном лабораторном подтверждении возможных вспышек ВПГ у животных, о своевременной регистрации этих случаев в ОИЕ и своевременной поддержке мер по их профилактике и контролю среди популяции животных, что снизит риск и для здоровья людей.

Схема идентификации случая гриппа H5, использованная во Вьетнаме

Пациент, которого необходимо обследовать

Любое лицо с лихорадкой ($t^{\circ}\geq 38^{\circ}\text{C}$) в сочетании с одним или несколькими из следующих симптомов: кашель; боль в горле; укороченное дыхание.

Пациент находится под врачебным наблюдением в стационаре и у него проводятся лабораторные исследования.

Возможный случай гриппа А(H5)

I. Любое лицо с лихорадкой ($t^{\circ}\geq 38^{\circ}\text{C}$) и в сочетании с одним или более из следующих симптомов: кашель; боль в горле; укороченное дыхание.

II. Лицо с одним или более из следующих данных:

- лабораторно подтвержденный грипп А, однако вирус не удается субтипировать;
- наличие контакта в течение 7 дней до появления симптомов с лицом с подтвержденным случаем гриппа А/Н5, в период его заразительности *;
- наличие контакта в течение 7 дней до появления симптомов с птицами, включая цыплят, которые умерли от болезни;
- лица, работавшие в лаборатории в течение 7 дней до появления симптомов, на заборе материалов от заболевших или животных, с предполагаемой инфекцией, вызванной ВПГ.

III. Смерть от нерасшифрованного острого респираторного заболевания с одним или более из следующих данных:

- проживание в районе, где предполагается или подтвержден ВПГ;
- наличие контакта в течение 7 дней до появления симптомов с лицом, у которого подтвержден грипп А/Н5 в период инфекционности ***

Вероятный случай гриппа А(H5)

Любое лицо с лихорадкой ($t^{\circ}\geq 38^{\circ}\text{C}$) в сочетании с одним или более из следующих симптомов: кашель; боль в горле; укороченное дыхание.

При этом имеются ограниченные лабораторные свидетельства в пользу гриппа А(H5), например (H5-специфические антитела выявлены в одном из образцов сывороток).

Подтвержденный случай гриппа А(H5)

Лицо **, у которого лабораторное исследование показало один или более из следующих результатов:

- положительный тест на вирус гриппа А(H5) в культуре клеток (выделение вируса);
- положительные результаты ПЦР на грипп А(H5);
- положительный иммунофлуоресцентный тест (ИФ) с применением моноклональных антител к вирусу гриппа А(H5);
- 4-х кратный прирост специфических антител к гриппу А(H5) в пробах парных сывороток.

* - лицо, инфицированное вирусом А/Н5, становится заразным за 1 день до появления симптомов до 7 дня

** - лабораторные исследования на грипп А/Н5 могут быть также проведены у умершего, что необходимо для дальнейших эпидемиологических исследований. Лабораторно подтвержденные случаи, выявленные после смерти, также должны быть зарегистрированы.

*** - лица, инфицированные вирусом гриппа А/Н5, считаются инфекционно опасными за день от начала симптомов и до 7 дня после их появления

Приложение 2.
Формы таблиц для ежедневных обобщенных данных по стране

Сообщающая страна или территория _____

Название сообщающего Учреждения/Организации _____

Контактная информация о сообщающем лице

Имя _____

Телефон _____

Факс _____

E-mail _____

Веб-страница _____

Дата текущего сообщения (день/мес./год) _____

Дата последнего сообщения (день/мес./год) _____

Таблица 1: Лабораторно подтвержденные случаи

Название сообщающей организации второго административного уровня ^{1,2}	Число новых подтвержденных случаев с момента последнего сообщения ³	Общее число подтвержденных случаев с 1 октября 2003 г.	Число новых смертей среди подтвержденных случаев после последнего сообщения ⁴	Общее число смертей среди подтвержденных случаев с 1 октября 2003 г.	Число работников здравоохранения среди подтвержденных случаев	Число подтвержденных случаев, не связанных с риском контакта с животными или лабораторного контакта ⁵	Число подтвержденных случаев, для которых история контактов неизвестна ⁶
Всего							

Таблица 2: Новые случаи госпитализации и лица, у которых предполагается диагноз гриппа А/Н5. Включает все категории случаев, которые не подтверждены.

Название сообщающей организации второго административного уровня ^{1,2}	Число новых госпитализаций ⁷	Вероятные случаи ^{8,9}			Возможные случаи ^{8,9}			Исследуемые случаи ^{8,9}		
		Текущее количество случаев	Текущее количество смертей	Текущее количество заразившихся работников здравоохранения	Текущее количество случаев	Текущее количество смертей	Текущее количество заразившихся работников здравоохранения	Текущее количество случаев	Текущее количество смертей	Текущее количество заразившихся работников здравоохранения
ИТОГО:										

Примечание [u1]:

Примечания:

¹Второй административный уровень определяется как уровень юрисдикции организации общественного здравоохранения на один ниже государственного.

²Добавьте необходимое количество строк для включения всех организаций второго административного уровня

³Также включает случаи, выведенные из категории подтвержденных.

⁴Также включает случаи смертей от заболеваний, выведенных из категории подтвержденных.

⁵Включает подтвержденные случаи, в которых не сообщается о риске, связанном с контактом с животными или с работой в органах здравоохранения

⁶Включает подтвержденные случаи, для которых история контактов неизвестна или не определена.

⁷Включает случаи из всех категорий.

⁸Категории случаев должны быть адаптированы таким образом, чтобы сделать их совместимыми со схемой классификации, применяемой в сообщающей стране или территории

⁹Добавьте или удалите необходимое количество категорий для соответствия классификационной схеме, применяемой в сообщающей стране или территории. Информация, касающаяся "текущего количества случаев", "текущего количества смертей" и "текущего количества заразившихся работников здравоохранения" должна быть представлена для каждой из обозначенных категорий.

Приложение 4:
Словарь данных для списка

Переменное название	Информация	Формат	Обозначения	Комментарии
01_country	Полное название сообщающей Страны	Текст		
02_id	Единый идентификатор случаев	Любой формат		
03_geo01	Первый административный уровень	Текст		
03_geo02	Второй административный уровень	Текст		
03_geo03	Город/поселок/деревня откуда было сообщено о случае	Текст		
04_d_rep	Дата выявления случая	Формат даты	день/мес./год	
05_sex	Пол	Текст	M=муж. Ж=жен. N=неизв.	
06_dob	Дата рождения	Формат даты	день/мес./год	
06_age	Возраст	В цифрах		
06_unit	Единица изм.возраста	Текст	Г=годы, М=мес	
07_d_ons	Дата появления симптомов	Формат даты	день/мес./год	
08_adm01	Госпитализирован	Текст		
08_d_adm01	Дата госпитализации01			
08_d_dis	Дата последнего дня пребыв.в больнице			
08_iso	Изолирован или нет			
08_d_iso	Дата изоляции в последней больнице			
08_vent	На ИВЛ			
09_abroad	Выезд за границу			
10_occ_an	Работа с риском, связанным с животными			
10_occ_lab	Работник лаборатории			
10_occ_hcw	Работник здравоохранения			
11a_fowl	Контакт с домашней птицей			
11b_fowl	Контакт с клетками домашней птицы			
11c_fowl01	Страна контакта с домашней птицей			
11a_wild	Контакт с дикими птицами			
11b_wild	Контакт с одомашненной дикой птицей			
11c_wild01	Страна контакта с дикой птицей			
11a_swine	Контакт со свиньями			
11b_swine	Контакт с домашними свиньями			
11c_swine01	Страна контакта со свиньями			
13_clus_id	Идентификатор группы			
13_clus_sett	Характеристика группы			
14_no_an	Не было лабораторного контакта или контакта с животными			
14_ukn	История контактов неизвестна или не определена			
15_cultH5	Положительная вирусная культура на грипп А/Н5			
15_pcrH5	Положительная ПЦР на грипп А/Н5			
15_ifaH5	Положительный ИФА с моноклональными			

	антителами к вирусу гриппа А/Н5			
15_seroh5	4-кратное повышение титра специфических Н5- антител в парных образцах сыворотки	Текст		
15_subtype	Подтип гриппа А	Текст		
15_reflab	Образцы посланы на подтверждение в соответствующую лабораторию ВОЗ	Текст		
16_disp	Окончательное заключение	Текст	R=выздоровел D=умер F=не проследить	
16_d_disp	Дата определения окончательного заключения	Формат даты	день/мес./год	
17_d_dead	Если скончался, дата смерти	Формат даты	день/мес./год	
18_i_class	Промежуточная классификация случаев	Текст	Подтвержден Вероятен Возможен Исследуется Отвергнут	Если 18_i_class
19_fin_class	Окончательная классификация случаев	Текст	Подтвержден Вероятен Возможен Исследуется Отвергнут	Заполнять однократно Отвергнутые случаи должны оставаться в списке данных
19_d_fin_class	Дата проведения окончательной классификации случая	Формат даты	день/мес./год	

Приложение 5

Форма уведомления о случае – Грипп А(Н5)

Единый идентификатор случаев (02_id) _____

1. Сообщаемые детали

Название сообщаемой Страны или Территории (01_страна) _____
Дата сообщения в Национальные Органы Здравоохранения (день/мес/год) _____

Контактная информация о лице, подающем уведомление
ФИО _____
Учреждение/Организация _____
Адрес _____
Телефон _____
E-mail _____

Первый административный уровень, с которого было уведомлено о лице (03_geo01)
(определенный как первый государственный уровень
под юрисдикцией здравоохранения национального уровня) _____
Второй административный уровень, с которого было уведомлено о лице (03_geo02)
(определенный как второй государственный уровень
под юрисдикцией здравоохранения национального уровня) _____
Город/поселок/деревня, откуда было сообщено о лице (03_geo03) _____
Дата, когда лицо впервые обратилось к местным Органам Здравоохранения
(день/мес./год) (04_d_per) _____

2. Демографические детали

Пол (05_sex) М Ж Неизвестен

Дата рожд. (день/мес./год) (06_dob) ____/____/____
Возраст (06_age) _____ в (06_unit) _____ Годах
Месяцах

Текущие контактные детали Полный адрес _____
Страна _____
Телефон _____ Факс _____
Гражданство _____ Национальность _____

3. Признаки и симптомы

Дата проявления болезни (день/мес./год) (07_d_ons) ____/____/____
Температура тела выше 38⁰C Да Нет Неизвестно
Кашель Да Нет Неизвестно
Боль в горле Да Нет Неизвестно
Одышка Да Нет Неизвестно

4. История госпитализации

Было ли лицо госпитализировано (08_adm01) Да Нет Неизвестно

Если Да, заполните таблицу¹ ниже

Примечание: Если лицо заболело в больнице включите эти детали пребывания в больнице в разделе таблицы Больница 1. В этом случае дата госпитализации должна предшествовать дате появления симптомов.

	Название больницы	Второй административный уровень в месте расположения больницы	Дата госпитализации (день/мес./год)	Было ли лицо изолировано или нет	Дата изоляции	Дата выписки из больницы ² (день/мес./год)
Больница 1						
Больница 2						
Больница 3						
Больница 4						
Больница 5						

Для однократного заполнения:

Дата последнего дня пребывания в больнице (соответствует дате выписки из последней больницы или дате смерти) (08_d_dis) _____/_____/_____

В течение всех госпитализаций было ли лиц

Изолировано (08_iso) Да Нет Неизвестно Если Да то дата изоляции в последней больнице (день/мес./год) (08_d_iso) _____/_____/_____

Искусственно вентилировалось (08_vent) Да Нет Неизвестно

Поступало в отделение интенсивной терапии Да Нет Неизвестно

¹ Добавьте столько строк сколько необходимо для включения всех больниц в которых были поступления таких случаев ²

² Дата выписки соответствует дате выписки ИЛИ дате перевода ИЛИ дате смерти

5. История передвижения

В течение 7 дней до появления симптомов выезжало ли или находилось ли лицо вне информирующей страны или территории (09_abroad) Да Нет Неизвестно

Если Да заполните строки в таблице ниже¹

Место отправления	Страна/территория отправления	Вспышка ВПГ в популяции животных на территории страны/территории отправления	Дата отправления (день/мес./год)	Основной вид транспорта 1. Самолет 2. Корабль 3. Поезд 4. Автобус 5. Иное	Место прибытия	Страна/территория прибытия	Вспышка ВПГ в популяции животных на территории страны/территории прибытия	Дата прибытия (день/мес./год)
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
		Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>					Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	

Замечание: Хотя детальная информация, содержащаяся в этой таблице, не включена в список, ВОЗ может потребовать сделать её готовой и доступной в случае её необходимости для международных целей для контроля за вспышками.

3 Добавьте необходимое количество строк для включения всех посещенных мест

В течение 7 дней до появления симптомов перемещалось ли или находилось ли лицо в пределах информирующей страны или территории Да Нет Неизвестно
Если да, заполните строки в таблице ниже³

Область отправления	Вспышка ВПГ в популяции животных в области отправления	Дата отправления (день/мес./год)	Основной вид транспорта 1. Самолет 2. Корабль 3. Поезд	Место прибытия (второй административный уровень)	Вспышка ВПГ в популяции животных в области прибытия	Дата прибытия (день/мес./год)

			4. Автобус 5. Иное			
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	
	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>				Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	

Замечание: Хотя детальная информация, содержащаяся в этой таблице, не включена в список, ВОЗ может потребовать сделать её готовой и доступной в случае её необходимости для международных целей для контроля за вспышками.

³ Добавьте необходимое количество строк для включения всех посещенных мест

6. Контакты по работе

В течение 7 дней до появления симптомов работало ли лицо:

-6a На работе с риском, связанным с животными⁵ (10_occ_an)

Да Нет Неизвестно

-6b Работником лаборатории, где тестируются образцы на вирусы гриппа А/Н5 (10_occ_lab)

Да Нет Неизвестно

-6c Работником здравоохранения (10_occ_hcw)

Да Нет Неизвестно

7. История контакта с популяциями животных

В течение 7 дней до появления симптомов работало ли лицо:

	7a	7b	7c
	Контакт (в пред. 1 метра) с любым живым или мертвым из перечисл. животных	Условия содержания, в к-рых животные находились в течение 6 предшествующих недель	В случае Да на 7b или 7a и контакт произошел вне сообщаемой страны/терр. напишите все страны/терр. где были эти контакты
Домашние животные (птицы)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11a_fowl)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11b_fowl)	(11c_fowl) _____ _____ _____
Дикие птицы	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11a_wild)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11b_wild)	(11c_wild) _____ _____ _____
Свиньи	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11a_swine)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/> (11b_swine)	(11c_swine) _____ _____ _____

¹ К числу профессий, связанных с риском, относятся: работники птицеводческой или свинофермы, работники предприятий по обработке домашней птицы, сортировщики птицы (лов, упаковка или транспортировка птиц, утилизация мертвых птиц), работники зоорынков, работающие с живой или только что забитой домашней птицей, дилеры и продавцы домашних птиц, работники лабораторий, где проводятся тесты на вирусы гриппа А/Н5, работники системы здравоохранения

² К домашней птице относится та, которая обычно выводится для получения мяса, яиц, перьев и содержится в загонках или сходных помещениях. Включают кур, уток, гусей, индеек, цесарок

8. История контакта со случаями заболеваний среди людей

В течение 7 дней до появления симптомов контактировало ли лицо (посредством прямого контакта или разговора на расстоянии) с:

8a Подтвержденным случаем "человеческой" инфекции вирусом гриппа А/Н5 (12_cont_c)

Да Нет Неизвестно

Если Да, укажите единый идентификационный номер подтвержденного случая в пункте 8.a. (12_cont_id)

8b Лицом с невыясненным острым респираторным заболеванием, закончившимся смертью (12_cont_dth)

Да Нет Неизвестно

8c Любым лицом для которого диагноз гриппа А/Н5 вероятен (12_cont_x)

Да Нет Неизвестно

8d Если Да в 8a или 8b или 8c, лицо является частью группы, отметьте "Применимо" (13_clus)

Применимо Неприменимо

8e Если применимо - группа:

Уже известна укажите групповой идентификатор⁶ в 8f

Только идентифицирована присвойте и укажите групповой идентификатор⁶ в 8f

8f Укажите групповой идентификатор» (13_clus_id) _____

Чем характеризуется эта группа (13_clus_sett)

Домашние (семья)

Расширенная семья

Больница

Иное учреждение для пребывания

Военные бараки

Лагеря отдыха

Иное , опишите _____

Краткое изложение истории контактов

Не сообщается о риске, связанном с контактом с животными и если нет контактов, связанных с работой в лаборатории (14_no_an):

Отметьте «Применимо» в случае Нет в 6.a., 6.b. и во всех 7.a., и во всех 7.b.

Применимо

Неприменимо

История контактов неизвестна или не определена (14_ukn):

Отметьте «Применимо» если «Неизвестно» или незаполнено во всех следующих пунктах:

6.a., и 6.b., и 6.c., and всех 7.a., and всех 7.b., и 8.a., и 8.b., и 8.c.

Применимо Неприменимо

7 лицо, для которого диагноз гриппа А/Н5 вероятен: включает все категории случаев, которые не подтверждены.

8 «Группа» определяется как два или более лица, для которых диагноз гриппа А/Н5 вероятен (включая тех лиц, которые погибли от невыясненного острого респираторного заболевания) с появлением симптомов в течение периода тех же двух недель и которые связаны со специфическими условиями, такими как домашние (семья), расширенная семья, больница, иное учреждение для пребывания, военные бараки или лагеря отдыха.

9 Идентификатор группы: предполагается использовать единый идентификатор первого выявленного случая в группе в качестве идентификатора группы.

9. Результаты лабораторного исследования

Положительный быстрый тест на грипп А

Да Нет Неизвестно

Высокий уровень специфических антител против гриппа А/Н5, выявленный в одном образце сыворотки

Да Нет Неизвестно

Если да, укажите титр _____

Положительная вирусная культура на грипп А/Н5 (15_cultH5)

Да Нет Неизвестно

Положительная Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на грипп А/Н5 (15_pcrH5) Да Нет Неизвестно

Положительный иммунофлюоресцентный тест на антиген к Н5 с использованием Н5 моноклональных антител (15_ifaH5)

Да Нет Неизвестно

4-кратное повышение титра Н5- специфических антител в парных образцах сыворотки (15_seroh5)

Да Нет Неизвестно

Был ли выявлен подтип вируса гриппа А/Н5

Да Нет Неизвестно

Если да, уточните (15_subtype) _____

Были ли образцы посланы на дальнейшее подтверждение в соответствующую лабораторию ВОЗ по диагностике инфекции гриппа А/Н5 ¹⁰ (15_reflab)

Да Нет Неизвестно

Если да, укажите лабораторию:

Национальный Институт Инфекционных Заболеваний, Япония
Центр по Контролю и Предупреждению Заболеваний, США

Да Нет Неизвестно

Да Нет Неизвестно

Национальный Институт Медицинских Исследований, Великобритания Да Нет Неизвестно
 Детская Исследовательская Больница св. Джуда, США Да Нет Неизвестно
 Национальный Центр Гриппа
 Гонконг - Китай Да Нет Неизвестно
 Гонконгский Университет, Больница Королевы Марии, Да Нет Неизвестно
 Гонконг- Китай Да Нет Неизвестно
 Институт Пастера, Франция Да Нет Неизвестно
 Иные Да Нет Неизвестно
 Если да, укажите _____

¹⁰ См. Приложение 6: Соответствующие лаборатории ВОЗ для диагностики гриппа A/H5

10. Профилактика гриппа

Было ли лицо привито против гриппа в течение 6 месяцев до появления симптомов Да Нет Неизвестно
 Если да, в какой стране _____

Принимало ли лицо какие либо из указанных ниже лекарств в течение 7 дней до появления симптомов:

Лекарство	Если Да	Принималось ли лекарство ежедневно в течение этого 7-дневного периода
Озельтамивир фосфат (Тамифлю)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>
Занамивир (Реленца)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>
Амантадин (Симадин, Симметрел)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>
Римантадин (Флюмадин)	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>	Да <input type="checkbox"/> Нет <input type="checkbox"/> Неизвестно <input type="checkbox"/>

11. Заключительные положения (16_disp) Для одноразового заполнения

Выздоровел (Выздоровевшие включают лиц, выписанных из больницы)
 Скончался
 Потерян для наблюдения (включает все еще заразных лиц)
 Дата последнего определения статуса (день/мес./год) (16_d_disp) ____/____/____

ТОЛЬКО для скончавшихся лиц

Если лицо скончалось, дата смерти (день/мес./год) (17_d_dead) ____/____/____

12. Классификация случаев

Первичная классификация случая Дата первичной классификации (день/мес./год) ____/____/____
 Подтвержден
 Вероятный
 Возможный
 В исследовании

Промежуточная классификация случая (18_i_class)

Дата проведения классификации (день/мес./год)
 Подтвержден ____/____/____
 Вероятен ____/____/____
 Возможен ____/____/____
 В исследовании ____/____/____
 Отвергнут ____/____/____

Окончательная классификация случая (19_fin_class)

- Подтвержден
- Вероятный
- Возможный
- В исследовании
- Отвергнут (Отвергнутые случаи должны оставаться в списке данных)

Дата окончательной классификации случая (день/мес./год) (**19_fin_class**) ____/____/____

4. Указания ВОЗ по сбору человеческих образцов для лабораторной диагностики гриппа А/Н5

Общая информация

Результативность диагностики респираторных инфекций зависит от сбора высококачественных образцов, их быстрой доставки в лабораторию и соответствующего хранения до лабораторного тестирования. Вирус лучше всего выявляется в образцах, содержащих инфицированные клетки и секреты. Анализ образцов для прямого выявления вирусных антигенов или нуклеиновых кислот и выделение вируса в культурах клеток должны проводиться в течение первых 3 суток после обнаружения клинических симптомов заболевания.

Виды образцов

Для диагностики вирусной инфекции из верхних дыхательных путей могут быть использованы следующие образцы:

- Мазок из носа
- Мазок из носоглотки
- Аспират из носоглотки
- Смыв из носовой полости
- Мазок из горла

По клиническим показаниям в дополнение к мазкам из верхних отделов дыхательных путей для диагностики вирусных инфекций могут быть использованы инвазивные процедуры получения материалов из нижних отделов респираторного тракта:

- Трахеальный аспират
- Бронхоальвеолярный лаваж
- Биоптат легочной ткани
- Ткань легкого или трахеи, взятая post mortem

Образцы для лабораторной диагностики высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5 должны собираться в следующем порядке:

- Аспират из носоглотки
- Сыворотка в острый период болезни
- Сыворотка в период реконвалесценции

Образцы для прямого выявления вирусных антигенов иммунофлюоресцентным окрашиванием инфицированных клеток должны доставляться на холоду и быть обработаны в течение ближайших 1-2 часов. Образцы для использования в коммерческих тестах у постели больного должны храниться в соответствии с инструкциями изготовителя. Образцы для выделения вируса должны доставляться в холодовом режиме немедленно после забора и инокулированы в культуры чувствительных клеток как можно быстрее. Если образец не может быть обработан в течение 48-72 часов, он должен храниться в замороженном состоянии при температуре от -70°C и ниже.

Образцы из дыхательных путей должны собираться и доставляться в средах для транспортировки вирусов. Ряд сред, которые пригодны для выделения разнообразных вирусов, имеются в продаже.

Процедуры для сбора образцов

Необходимые материалы

- Плевательница
- Полимерный аппликатор (щеточка) с волокнистым покрытием на конце.
- Пластиковые флаконы
- Шпатель для языка
- 15-мл конические пробирки для центрифугирования
- Чашка для сбора образцов или чашка Петри
- Пипетки

Среда для транспортировки вируса

(А) Среда для транспортировки вируса используемая при заборе мазков из носа и горла

1. Добавить 10 г настоя телячьего инфузионного бульона и 2 г фракции V бычьего альбумина в стерильную дистиллированную воду (до 400 мл).
2. Добавить 0.8 мл раствора гентамицина сульфата (50 мг/мл) и 3.2 мл амфотерицина В (250 мг/мл)
3. Стерилизовать фильтрацией

(В) Среда для смыва из носа

1. Стерильный физраствор (0.85% NaCl).

Подготовка к сбору образцов

Клинические образцы должны быть собраны, как описано ниже, и добавлены в среду для транспортировки. В сопроводительный лист должна быть внесена следующая информация: общая информация о пациенте, тип образца, дата сбора, контактная информация о лице, заполнившем лист и т.д.

Во всех случаях, когда образцы забираются от больных, должны соблюдаться стандартные меры предосторожности, а также осуществляться барьерная защита (маски, перчатки, спецодежда и т. д.).

Мазки из носа

Сухая полимерная щеточка вводится глубоко в ноздрю (нижний носовой ход), параллельно нёбу и оставляется там на несколько секунд. Затем она медленно выводится вниз, вращательным движением внутри носа. Образцы из обеих ноздрей получают одной и той же щеточкой. Кончик щеточки помещается в пробирку, содержащую 2-3 мл среды для транспортировки, а палочка-аппликатор отламывается.

Мазки из носоглотки

Гибкая тонкая полимерная щеточка вставляется в ноздрю, вводится на глубину до носоглотки и оставляется в таком положении на несколько секунд. Затем она медленно вынимается вращательным движением. Для второй ноздри должна быть использована вторая щеточка. Кончик щеточки помещается в пробирку, содержащую 2-3 мл среды для транспортировки вируса и стержень щеточки обрезается.

Аспират из носоглотки

Секрет из носоглотки аспирируется катетером, соединенным с емкостью для сбора слизи, подсоединенным к вакуумному насосу. Катетер вводится в ноздрю параллельно нёбу. Применяется вакуум-аспирация и катетер медленно вынимается с помощью вращательного движения. Слизь из другой ноздри собирается этим же катетером таким же образом. После забора слизи из обеих ноздрей катетер промывается 3 мл среды для транспортировки.

Смыв из носа

Пациент сидит в удобном для него положении со слегка запрокинутой головой. Ему советуют держать глотку в закрытом положении путем произнесения буквы «К» пока промывающая жидкость (обычно физиологический раствор) поступает в ноздрю. С помощью пипетки 1-1.5 мл промывающей жидкости инстиллируется в одну ноздрю за один раз. После этого пациент наклоняет голову, что позволяет жидкости вылиться в чашку для образцов или в чашку Петри. Процедура повторяется с чередованием ноздрей, пока не будет использовано в целом 10-15 мл промывающей жидкости. Около 3 мл полученного смыва развести в 2 раза средой для транспортировки.

Мазки из горла

Обе миндалины и задняя стенка глотки энергично протираются тампоном и мазок помещается в среду для транспортировки, как выше описано.

Забор сыворотки для диагностики гриппа

Образец сыворотки периода острой фазы (3-5 мл цельной крови) должен забираться вскоре после появления клинических симптомов (не позднее 7 дня). Сыворотка периода выздоровления должна забираться через 14 дней после появления симптомов. Если пациент находится в терминальном состоянии, второй образец собирается ante mortem.

Хотя единичные образцы сыворотки не могут обеспечить получения заключительных данных в поддержку того или иного индивидуального диагноза, однако, если они взяты более чем через 2 недели от появления клинических симптомов, они могут быть использованы для обнаружения антител к вирусам птичьего гриппа в реакции нейтрализации.

5. Рекомендации ВОЗ по сбору образцов от животных для диагностики гриппа А/Н5

Успех вирусной диагностики в высокой степени зависит от качества образцов и условий, в которых они доставляются в лабораторию и хранятся в ней до обработки. Образцы для выделения респираторных вирусов в клеточных культурах или в куриных эмбрионах, а также для прямого обнаружения вирусных антигенов или нуклеиновых кислот должны забираться в течение первых 3 дней после появления клинических симптомов гриппа. У млекопитающих, включая человека, свиней и лошадей, первичным проявлением гриппа является поражение респираторного тракта, тогда как у птиц грипп может проявляться в виде инфекции как респираторного тракта, так и толстого кишечника.

Виды образцов

Для диагностики вирусных инфекций используют разнообразные образцы из верхнего респираторного тракта от животных и птиц:

- Мазки из носа
- Мазки из горла
- Трахеальные мазки

В дополнение к мазкам из верхнего респираторного тракта, птичьих образцы на грипп должны включать:

- Мазки из клоаки
- Образцы фекалий

Мазки из клоаки должны быть получены на живых или только что убитых птицах. Образцы фекалий, собранные из клеток или из окружающей среды, являются часто единственно доступными материалами, но они не могут быть с полной уверенностью отнесены к оригинальным (чистым) образцам.

Если найдены мертвые животные, то при исследовании необходимо подозревать наличие высокопатогенного вируса птичьего гриппа и, кроме образцов из респираторного и кишечного тракта, должны быть исследованы образцы внутренних органов, в том числе мозг, селезенка, сердце, легкое, поджелудочная железа, печень и почки.

Образцы для лабораторной диагностики гриппа А(Н5N1) должны собираться в следующем порядке:

От живых животных:

- трахеальные
- горло/нос
- клоакальные
- фекальные (из окружающей среды)
- питьевая вода

От мертвых животных:

- Смыв из легкого
- Образцы тканей (включающие трахею и легкое)
- Фекальные (из окружающей среды) материалы
- Клоакальные материалы
- Питьевая вода

Процедуры сбора образцов

Требуемые материалы:

- 1-3 мл пробирки с завинчивающимися крышками
- Синтетические волоконные щеточки (гупферы)
- Среда для транспортировки вируса
- Инструменты для исследования post mortem

Среды для транспортировки вируса:

(А) *Транспортная среда 199*

Среда для культуры тканей 199, содержащая 0.5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). К 1 литру среды с БСА добавить:

- бензилпенициллин ($2 \cdot 10^6$ МЕ/ л)
- стрептомицин (200 мг/л)
- полимиксин Б ($2 \cdot 10^6$ МЕ/ л)
- гентамицин (250 мг/л)
- нистатин ($0.5 \cdot 10^6$ МЕ/ л)
- офлоксацина гидрохлорид (60 мг/л)
- сульфаметаксозол (0.2 г/л)

Стерилизовать путем фильтрации, разлить по 1-2 мл по пробиркам с завинчивающимися крышками.

Замечание: В связи с возрастанием использования антибиотиков в сельском хозяйстве стало необходимым использовать высокие концентрации антибактериальных и противогрибковых агентов.

(Б) *Глицериновая транспортная среда*

1. Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ)

NaCl	8 г
KCl	0.2 г
Na ₂ HPO ₄	1.15 г
KH ₂ PO ₄	0.2 г
Дистиллированная вода	до литра

2. Приготовление смеси ФСБ-глицерин

После автоклавирования смешать ФСБ со стерильным глицерином в соотношении 1:1 (до 1 литра).

3. Приготовление глицериновой транспортной среды

К одному литру стерильного раствора ФСБ с глицерином добавить:

- бензилпенициллин ($2 \cdot 10^6$ МЕ/л)
- стрептомицин (200 мг/л)
- полимиксин Б ($2 \cdot 10^6$ МЕ/л)
- гентамицин (250 мг/л)
- нистатин ($0.5 \cdot 10^6$ МЕ/л)
- офлоксацина гидрохлорид (60 мг/л)
- сульфаметаксозол (0.2 г/л)

Для выбора соответствующей среды см. раздел «Подготовка к забору образцов», изложенный ниже.

Приготовление емкостей для образцов

В стерильные флаконы (пробирки) с завинчивающейся крышкой внести по 1-2 мл среды для транспортировки. Предпочтительно хранить эти флаконы до использования при -20°C . Однако они могут храниться при 4°C в течение 48-96 часов (оптимально менее 48 часов) или при комнатной температуре в течение короткого периода (1-2 дня).

Подготовка к забору образцов

Флаконы (пробирки) должны быть пронумерованы в соответствии с Листком информации по собранным материалам. В Листке должна быть отражена следующая информация: тип и вид исследуемого животного, вид образца, дата сбора, географическая локализация места забора и т.д.

Среда для культуры клеток (А) широко используется для сбора и транспортировки клинических образцов всех видов. Среда на базе глицерина (В) обеспечивает длительную сохранность образцов, если немедленное охлаждение невозможно. Она пригодна для инокуляции куриных эмбрионов, но не годится для заражения клеточных культур.

Клинические образцы должны собираться, как описано ниже, и вводиться в среду для транспортировки. Все образцы должны храниться на льду или при 4°C .

Необходимо соблюдать стандартные меры предосторожности, а также барьерной защиты во всех случаях, когда образцы забираются у больных или умерших животных.

Мазок из носа. Сухая полимерная щеточка вводится в ноздрю, параллельно нёбу и оставляется там на несколько секунд. Затем она медленно выводится из носа вращательным движением. Образцы из обеих ноздрей собирают одной и той же щеточкой. Кончик щеточки помещается в бутылочку, содержащую 2-3 мл среды для транспортировки, а палочка-апликатор отламывается.

Мазок из горла. По задней стенке глотки производится поскабливание щеточкой, которая помещается в среду для транспортировки так же, как было описано выше.

Мазок из трахеи. Мазок из трахеи берется от живых птиц путем введения полимерной щеточки в трахею и аккуратного поскабливания стенки. Щеточка помещается в среду для транспортировки, как описано выше.

Соскобы из трахеи от умерших животных, включая свиней и забитых лошадей, могут быть осуществлены после извлечения легких и трахеи. Трахею берут руками в перчатках и щеточку заводят на максимальную глубину, энергично поскабливая по стенке. Щеточка помещается в среду для транспортировки, как указано выше.

Соскоб из клоаки. На живых птицах мазок из клоаки производится путем заведения щеточки глубоко в анальное отверстие и энергичного поскабливания стенки. Щеточка должна быть обильно смазана фекальным материалом. Затем щеточка помещается в среду для транспортировки, как указано выше.

Образцы фекалий. Образцы фекалий из клеток от живых птиц на птичьем рынке или от диких птиц должны забираться из только что отложенных влажных фекалий. Щеточка должна быть обильно смазана фекалиями. Щеточка помещается в среду для транспортировки, как указано выше.

Образцы тканей. Образцы тканей должны быть немедленно заморожены без транспортной среды, а позже помещены в среду для транспортировки (перед инокуляцией куриных эмбрионов или культуры тканей).

Забор сыворотки для диагностики и надзора за гриппом. Для целей диагностики образцы сыворотки (3-5 мл цельной крови), острой фазы заболевания должны забираться вскоре после появления клинических симптомов (не позднее 7 дня). Сыворотка периода выздоровления должна забираться через 2-4 недели. В исследованиях по серологическому скринингу, для которого используют забитых животных (свиньи, лошади) или образцы от диких птиц, у которых берут кровь и затем отпускают на волю, используют одиночные образцы сыворотки. Крови дают свернуться, после чего ее центрифугируют при 2500 об./мин. в течение 15 минут для отделения красных кровяных телец от сыворотки. Сыворотку отсасывают пипеткой, а эритроциты выбрасывают. Образцы сыворотки хранят при -20 °С.

6. Указания ВОЗ по хранению и транспортировке образцов от людей и животных для лабораторной диагностики гриппа А/Н5

Хранение образцов

Полученные образцы, разведенные в транспортной среде для выделения вируса, должны храниться при 4°C и быстро доставляться в лабораторию. Если образцы транспортируются в лабораторию в течение 2 дней, они могут храниться при 4°C; в ином случае они должны быть заморожены при температуре -70°C и ниже до того, как они будут доставлены в лабораторию. Необходимо избегать повторного замораживания и оттаивания для предупреждения потерь инфекционности. Сыворотка может храниться при 4°C примерно неделю, но после этого она должна быть заморожена до -20°C.

Образцы должны собираться и транспортироваться в соответствующей транспортной среде на льду или в жидком азоте. Необходимо всегда выполнять стандартные меры предосторожности, а также соблюдать меры барьерной защиты во всех случаях, когда образцы забираются от больных. Образцы вирусов гриппа не должны храниться или перевозиться в сухом льду (твердом диоксиде углерода), если только они не запаяны в стекло или запечатаны, закрыты и запаяны в двойную пластиковую упаковку. Это связано с тем, что углекислый газ способен быстро инактивировать вирусы гриппа, если он проникнет в образец в результате сжатия трубок при замораживании.

Транспортировка образцов

Транспортировка образцов должна проводиться в соответствии с указаниями ВОЗ по безопасной транспортировке инфекционных субстанций и диагностических образцов (ВОЗ, 1997).

Принимающая лаборатория должна быть заранее извещена о доставке образцов.

Транспортировка образцов в пределах государственных границ должна выполняться в соответствии с правилами каждой страны.

Международная воздушная транспортировка образцов от людей, содержащих или подозреваемых на содержание ВПГ Н5, или образцов от инфицированных ВПГ Н5 животных, должна выполняться в соответствии с действующими правилами Международной Ассоциации Воздушного Транспорта (IATA) - "Правила для опасных товаров".

Правила IATA ("Хранение диагностических образцов", 2003г.) позволяют транспортировать образцы, содержащие или с подозрением на содержание ВПГ Н5 как «диагностические образцы», отнесенные к UN 3373, если они транспортируются с диагностическими или исследовательскими целями.

Образцы, транспортируемые для каких-либо иных целей, а также вирусные культуры (как определено в Правилах IATA), приготовленные для целей размножения патогенов, должны быть транспортированы как указано в UN 2814 или UN 2900 соответственно.

Все транспортируемые образцы (UN 3373, UN 2900 или UN 2814) должны быть упакованы в тройную упаковку, содержащую три упаковочных слоя, как указано в Правилах для Опасных Товаров.

Диагностические образцы по UN 3373 должны быть помещены в упаковку высокого качества, которая способна выдерживать удары и нагрузки, обычно имеющие место при транспортировке. Упаковка должна быть сделана и закрыта так, чтобы предупредить возможность любой утечки содержимого, которая может быть вызвана при нормальных

условиях транспортировки вибрацией или изменением температуры, влажности или давления.

Первичные емкости должны быть помещены во вторичную упаковку таким образом, чтобы они при нормальных условиях транспортировки не могли сломаться, разбиться или протечь во вторичную упаковку. Вторичная упаковка должна быть помещена в последнюю внешнюю упаковку с подходящим мягким материалом. Любая протечка содержимого не должна существенно вредить защитным свойствам этого материала или самой внешней упаковки.

Для жидкостей

Первичные емкости должны быть защищены от утечки и должны содержать не более 500 мл. Между первичной емкостью и вторичной упаковкой должен находиться абсорбирующий материал; если несколько первичных емкостей помещаются в одну вторичную упаковку, каждая из них должна быть отдельно завернута или отделена таким образом, чтобы исключить контакт между ними. Абсорбирующего материала должно быть достаточно, чтобы полностью впитать все содержимое первичных емкостей, а вторичная упаковка должна быть защищена от протечек. Первичная емкость или вторичная упаковка должны без протечки выдерживать внутреннее давление, при разнице давления не менее 95 КПа (0.05 бар). Внешняя упаковка должна содержать не более 4 литров.

Для твердых тел

Первичные емкости должны быть защищенными от просыпания и должны содержать не более 500 г. Если несколько хрупких первичных емкостей помещаются в одну вторичную упаковку, каждая из них должна быть отдельно завернута или отделена таким образом, чтобы исключить контакт между ними, а вторичная упаковка должна быть защищена от протечек. Внешняя упаковка должна содержать не более 4 кг.

Для авиатранспортировки полный внешний размер готовой упаковки должен быть не менее 10 см.

Упаковка должна соответствовать определенным имеющимся стандартам.

Для дальнейшей информации об определениях, требованиях к упаковке, маркам и ярлыкам, сопроводительных документах, замораживателях, пожалуйста обращайтесь к компетентным органам, текущим инструкциям по перевозке IATA, коммерческим поставщикам упаковок или доступным курьерским компаниям.

7. Рекомендованные лабораторные тесты для выявления вируса гриппа А/Н5 в образцах от пациентов с гриппоподобными заболеваниями

Высокопатогенный птичий грипп (ВПГ), вызываемый в популяциях животных, особенно кур, вирусом гриппа А/Н5, продолжает представлять глобальный риск для общественного здравоохранения. Прямое инфицирование человека вирусом гриппа А/Н5 впервые было выявлено в 1997 году в период вспышки в Гонконге от кур. Лабораторная диагностика гриппа А обычно проводится путем прямого выявления вирусных антигенов, изоляции вируса в культуре клеток или выявлении специфической РНК вируса гриппа с помощью обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции.

Данные рекомендации предназначены для лабораторий, получающих запрос на тестирование образцов от пациентов с гриппоподобными заболеваниями в случаях когда имеются клинические или эпидемиологические свидетельства инфекции вирусом гриппа А/Н5 (см. "Определение случая" в указаниях ВОЗ по глобальному надзору за гриппом А/Н5).

Лабораторные методы, приведенные ниже, не содержат всей информации, относящейся к проведению тестов: дополнительные детали могут быть получены из приведенных ссылок либо у Сотрудничающего Центра ВОЗ по гриппу.

Оптимальным образцом для выявления вируса гриппа А/Н5 является аспират из носоглотки, полученный в течение 3 дней после появления симптомов, хотя могут быть использованы и мазки из носоглотки и другие образцы (см. Указания ВОЗ по сбору образцов от людей для лабораторной диагностики гриппа А/Н5).

Все манипуляции с образцами и диагностическое тестирование должны выполняться в соответствии с Указаниями ВОЗ по биозащите при обращении с образцами, подозреваемыми на содержание вируса высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5.

Стратегия первичного лабораторного тестирования каждого образца должна быть направлена на быструю диагностику инфекции, вызванной вирусом гриппа А, и исключение иных обычных респираторных вирусных инфекций. Результаты должны быть доступными в течении 24 часов.

Методы диагностики гриппа

Методы, используемые при диагностике инфекции вирусом гриппа А включают:

1. Быстрое выявление антигенов. Результаты могут быть получены через 15-30 минут.
 - Тесты на грипп "у постели больного". Эти тесты коммерчески доступны (Николксон, Вуд и Замбон, 2003 г.)
 - Иммунофлюоресцентный анализ. Широко используемый чувствительный метод диагностики инфекции, вызванной вирусами гриппа А и В и пятью иными клинически значимыми респираторными вирусами (Леннет и Шмидт, 1979)
 - Иммуноферментный анализ нуклеопротеина вируса гриппа А.
2. Выделение вируса. Результаты могут быть получены через 2-10 дней. Для выявления клинически значимых респираторных вирусов может быть использован как "shell-vial" технология, так и стандартный культуральный метод. Идентификация вируса производится с помощью иммунофлюоресцентного метода или РТГА.
3. Полимеразная цепная реакция. Праймеры, специфические для гена гемагглютинина циркулирующих вирусов гриппа А/Н1, А/Н3 и В все более

широко используются. Результаты могут быть получены в течение 24 часов (Фушье и др., 2000).

Любой образец с положительным результатом на вирус гриппа А должен быть в дальнейшем протестирован с помощью одного из нижеуказанных тестов.

Лаборатории, у которых нет возможности проводить процедуры по специфической идентификации гриппа А/Н5, должны:

1. Передать образцы в Национальный центр по гриппу или иную рекомендованную лабораторию для их дальнейшей идентификации или характеристики (см. рекомендации ВОЗ по хранению и транспортировке образцов от людей и животных для лабораторной диагностики гриппа А/Н5 на сайте: [www.who.int](#), а также соответствующие лаборатории ВОЗ по диагностике гриппа А/Н5 на сайте: [www.who.int](#));
2. Сообщить в соответствующее представительство ВОЗ в стране или в соответствующее региональное представительство ВОЗ о том, что образцы (или выделенные вирусы) были переданы в иные лаборатории для дальнейшей идентификации или характеристики.

Идентификация гриппа А/Н5

Иммунофлюоресцентный анализ

Иммунофлюоресцентный анализ (ИФА) может быть использован для выявления вируса как в клинических образцах, так и в культурах клеток. Клинические образцы, полученные как можно скорее после появления первых симптомов, являются предпочтительными, т.к. число инфицированных клеток уменьшается в ходе болезни. Выполнение ИФА на инокулированных культурах клеток предпочтительно, т.к. позволяет амплифицировать любой имеющийся вирус.

Необходимые материалы и оборудование

- Набор ВОЗ с реактивами на грипп для идентификации вируса гриппа А/Н5 (версия 1997-98, 2003 или 2004 года). Реактивы набора для иммунофлюоресцентного анализа включают:
 - Пул специфических моноклональных антител к гриппу А/Н5
 - Пулы специфических моноклональных антител, специфичных к гриппу А и В
 - Специфические моноклональные антитела к вирусу гриппа подтипов А/Н1 и А/Н3
 - Конъюгат анти-мышинный IgG с FITC
 - Предметные стекла
 - Покровные стекла, 24x60 мм
 - Фиксатор
 - Ацетон
- Люминисцентный микроскоп

Порядок идентификации

Тест должен проводиться в соответствии с инструкциями, включенными в Набор Реагентов ВОЗ для гриппа. Эпителиальные клетки отмываются от загрязнений слизи центрифугированием, фиксируются и метятся специфическими моноклональными антителами. Инфицированные клетки респираторного эпителия в клинических образцах

очень неустойчивы и легко повреждаются; и поэтому они должны храниться в холоде на льду в ходе обработки и не должны центрифугироваться более чем при 500 об/мин. Контрольные образцы с гриппом А/Н3 – и клетки, инфицированные Н1 (а также, когда это возможно, клетки, инфицированные Н5) и неинфицированные клетки должны быть включены для обеспечения соответствующего контроля моноклональных антител и конъюгата и для облегчения интерпретации специфического свечения.

Интерпретация результатов

Специфическое свечение должно быть интенсивным, внутриклеточным, ярко-зеленым. Может наблюдаться ядерное и/или цитоплазматическое свечение. Важно убедиться что клеточная плотность адекватна. Одна или более интактная клетка, демонстрирующая специфическое внутриклеточное свечение, может быть принята как положительный результат.

Вследствие того, что коммерчески доступные моноклональные антитела для субтипирования гриппа А/Н1 показали перекрестное реагирование с гриппом подтипа А/Н5, включая текущие штаммы (2004), должны выполняться подтверждающие тесты с использованием моноклональных антител, поставляемых в Наборе ВОЗ.

Выделение вируса

Выделение вируса - это чувствительная техника с тем преимуществом, что вирус становится доступен как для идентификации, так и для дальнейшей антигенной и генетической характеристики, тестирования на чувствительность к лекарствам и приготовления вакцины. Клетки MDCK являются предпочтительной линией клеток для культивирования вирусов гриппа. Идентификация неизвестного вируса гриппа может выполняться с помощью ИФА с использованием специфических моноклональных антител (см.выше) или, альтернативно, гемагглютинацией (ГА) и антигенным анализом (субтипирование) с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием соответствующей антисыворотки.

В отличие от других штаммов гриппа А, вирус гриппа А/Н5 размножается и на других линиях клеток, таких как Нер-2 и RD. При обработке образцов и культур клеток, подозреваемых на содержание гриппа А/Н5, должны соблюдаться стандартные меры предосторожности по биозащите.

ЗОЛОТОЕ ПРАВИЛО. Клинические образцы от людей, свиней или птиц никогда не должны обрабатываться в одной и той же лаборатории.

Требуемые материалы

- Клетки собачьих почек Madin-Darby (MDCK). ATCC CCL34.
- Набор ВОЗ с реагентами на грипп для идентификации вируса гриппа А/Н5. Реагенты для идентификации вируса А/Н5 в культуре клеток включают:
 - контрольный антиген гриппа А/Н5 (инактивированный вирус)
 - козья сыворотка к А/Крачка/Юж.Африка/61/Н5
 - куриная сыворотка к А/Гусь/Гонг-Конг/437-4/99
- Набор ВОЗ с реагентами на грипп (распространяемый ежегодно)
Соответствующие антигены и антисыворотки А (Н1N) и А (Н3N2)
- Рецептор - разрушающий фермент (РДЕ)
- Эритроциты (куриные, индейки, человеческие О-типа или морской свинки) в растворе Альсевера.

Порядок

1. Стандартные операции с клеточными культурами выполняются для размножения культур клеток, инокуляции образцов и получения инфицированных клеток для ИФА или культуры для тестирования в РГА и РТГА (Леннет и Шмидт, 1979; ВОЗ, 2002). При выполнении операции по размножению вируса должны выполняться стандартные указания по лабораторной биозащите (см. указания ВОЗ по биозащите и обращению с образцами, подозреваемыми на содержание высокопатогенного вируса птичьего гриппа А/Н5).

2. Стандартные РГА и РТГА должны выполняться с включением всех рекомендуемых контрольных проб. Особые детали, относящиеся к соответствующей сыворотке и антителам включены в руководство ВОЗ по диагностике и надзору за гриппом у животных (ВОЗ, 2002).

Интерпретация результатов

Самое большое разведение вируса, вызывающее полную гемагглютинацию, считается конечной точкой титрования. Конечная точка ингибции гемагглютинации (титр) - это конечное разведение антисыворотки, которое полностью ингибирует вирусную гемагглютинацию.

Идентификация продукта выделения выполняется путем сравнения результатов его титрования в сравнении с контрольным антигеном. Выделенный вирус определяется как А/Н5 подтип если специфический титр в РТГА выше в 4 раза и более, при сравнении с титром, полученным с другой антисывороткой.

В сыворотке могут присутствовать неспецифические агглютинины, которые могут давать ложноотрицательные реакции; и наоборот, некоторые выделенные вирусы могут быть высокочувствительными к неспецифическим ингибиторам в сыворотке, давая ложноположительные реакции.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - это современный метод идентификации генома вирусов гриппа. Геном вируса гриппа - это однонитевая РНК, а копия ДНК (кДНК) должна синтезироваться с первой с использованием обратной транскриптазы (ОТ). Процедура для амплификации РНК- генома (ОТ-ПЦР) требует пару олигонуклеотидных праймеров. Эти пары праймеров готовятся на основе известной последовательности гемагглютинина вируса гриппа А/Н5 и нейраминидазы (N). Амплифицируют исключительно РНК одного подтипа. ДНК, полученные с использованием подтип - специфичных праймеров, впоследствии могут быть проанализированы с помощью молекулярно-генетических методов, таких как секвенирование.

Необходимые материалы

- Вирусный Мининабор РНК QIAamp
- Стерильные трубочки для микроцентрифугирования, 0.5 и 1.5 мл
- Образцы праймеров

Праймеры гена гемагглютинина, использованные Вирусологическим Отделом Правительства Гонконга, модифицированные Юена и др., 1998:
H5-1: GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC

H5-2: TAA ATT CTC TAT CCT CCT TTC CAA
Ожидаемый размер продукта: 358bp

Праймеры гена нейраминидазы, использованные Вирусологическим Отделом Правительства Гонконга, модифицированные Райт и др., 1995
N1-1: TTG CTT GGT CGG CAA GTG C
N1-2: CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC
Ожидаемый размер продукта: 615bp

- Положительный контроль (полученный по запросу из Сотрудничающего центра ВОЗ по гриппу)
- 10x ПЦР буфер
- Регулируемые пипетки 10, 20 и 100 μ л
- Свободные наконечники для фильтра
- Микрочентрифуга (регулируемая) до 13000 об/мин
- Миксер
- Термоциклер
- Образец пластины с агарозным гелем. Помещение для электрофореза с энергоснабжением
- УФ - бокс или ручной источник УФ – излучения (302 нм)

Методика

1. Выделить вирусную РНК из клинического образца путем добавления 140 μ л образца в колонку QIAamp
2. Обратная транскрипция
 - А) Процедура выполняется с использованием случайных гексамеров (конечная концентрация 2.5 мл)
 - Б) Добавляется обратная транскриптаза
 - В) Реакция выдерживается при комнатной температуре 10 минут, затем 15 минут при 42⁰С
 - Г) Реакция останавливается путем 5-минутной инкубации при 95⁰С в течение 5 минут и затем охлаждается во льду. (Эта кДНК предназначена для использования в ПЦР).

3. Приготовьте основную смесь следующим образом:

	Объем на реакцию
10X буфер ПЦР	5 μ л
дополнительно MgCl ₂ (25mM):окончательная концентрация 2.0 mM	1 μ л
dNTP (2.5 mM каждая)	4 μ л
прямой праймер (5 μ M)	5 μ л
обратный праймер (5 μ M)	5 μ л
вода (молекулярный уровень)	25 μ л
Taq полимеразы (5 ед./ μ л)	0.25 μ л

- А. Кратное количество 45 μ л основной смеси в каждую 0.2-миллилитровую ПЦР – пробирку
 - Б. Добавить 5 μ л кДНК в каждую пробирку
- В Условия ПЦР: (ABI 9700):
94⁰С - 3 мин; 40 циклов при 94⁰С - 30 сек, 45⁰С - 30 сек, 72⁰С - 1 мин; 72⁰С - 7 мин.
(Оптимизированные условия ПЦР с использованием Системы Amersham Pharmacia BioTech)

4. Электрофорез продукта ПЦР в агарозном геле.
5. Приготовьте агарозный гель, загрузите продукты ПЦР и маркеры молекулярного веса и действуйте согласно стандартным протоколам. Визуализируйте наличие маркеров и продуктов ПЦР в УФ - свете

Интерпретация результатов

Ожидаемый размер продуктов ПЦР на грипп А/Н5 - 358 bp и 615 bp - на N1. Если тест проводится без положительного контроля, продукты должны быть секвенированы и сравнены с последовательностями в имеющихся базах данных. Отсутствие продуктов ПЦР (т.е. отрицательный результат) не исключает присутствия гриппа А (H5N1). Результаты должны быть интерпретированы в совокупности с доступной клинической и эпидемиологической информацией. Образцы от пациентов с высокой вероятностью гриппа А/Н5 должны быть тестированы с помощью других методов (ИФА, выделение вируса или серология) для исключения гриппа А (H5N1).

Лабораторное подтверждение

Все лабораторные результаты на грипп А/Н5 должны быть подтверждены Сотрудничающим Центром ВОЗ по гриппу или иной соответствующей лабораторией, рекомендованной ВОЗ. Материалы, положительные на вирус гриппа А/Н5 в культуральной жидкости или аллантоиса должны быть переданы в рекомендованные ВОЗ лаборатории (см. Соответствующие лаборатории ВОЗ для диагностики гриппа А/Н5). Подтвержденные результаты должны быть прежде всего посланы в лабораторию, откуда были направлены материалы, положительные на грипп А/Н5, а затем (только с разрешения) результаты могут быть отправлены в Региональные представительства ВОЗ или в штаб-квартиру ВОЗ в Женеве. Результаты должны оставаться конфиденциальными до соответствующего распоряжения национальных властей.

Серологическое выявление гриппа А/Н5

Серологические тесты, доступные для определения специфических антител к гриппу А включают РТГА, иммуноферментный анализ и тест нейтрализации вируса. Для измерения специфических А/Н5 антител к птичьему гриппу также рекомендуется реакция микронейтрализации. Т.к. этот тест обычно требует использования живых вирусов, его использование для выявления специфических А/Н5 антител ограничен лабораториями с возможностями Биозащиты второго уровня.

8. Указания ВОЗ по работе с образцами, предположительно содержащими вирус высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5

Общие рекомендации

Учитывая, что грипп у людей может быть вызван вирусами высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5, нельзя недооценивать риск заражения персонала при работе в лаборатории. Любые попытки снизить вероятность заражения тщетны при несоблюдении мер безопасности.

Ответственность за разработку адекватных мер предосторожности, инструкций и их внедрение и соблюдение обычно лежит на руководителе института или лаборатории. Однако в не меньшей степени безопасность каждого сотрудника лаборатории зависит от него самого и его коллег.

Основой безопасности являются тщательное соблюдение микробиологической технологии. Использование качественного оборудования вкупе с соответствующими порядком и процедурами и позволяет снизить риск при работе с биологически опасными материалами. Ниже изложены основные рекомендации.

- Обычные меры предосторожности должны неукоснительно соблюдаться; при работе с любыми материалами, забранными у больных, должны применяться барьерные средства защиты (халаты, перчатки, защитные очки).
- При работе с образцами должны соблюдаться порядки и процедуры минимум второго уровня биозащиты (Basic containment – Biosafety Level 2 (BSL2), см. : *Руководство ВОЗ по лабораторной биобезопасности, второе пересмотренное издание*).
- Примеры процедур, требующих соблюдения BSL2:
 - исследования крови и плазмы (включая гемограммы и биохимические исследования);
 - манипуляции с нейтрализованными или инактивированными частицами вируса (разрушенный вирус или его фиксированные формы).
- - упаковка образцов, отправляемых в другие лаборатории, для дополнительного исследования; образцы должны содержаться в запечатанных контейнерах.
- Должен соблюдаться порядок работы в лаборатории. На рабочем месте нельзя пить, есть, курить, накладывать макияж и снимать/надевать контактные линзы.
- При обработке образцов и проведении диагностических исследований следует пользоваться средствами персональной барьерной защиты: халатами, перчатками и защитными очками.
- Работать следует аккуратно, избегая разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Все процедуры, сопровождающиеся возможным разбрызгиванием и образованием аэрозолей инфекционного материала (центрифугирование, смешивание, перемешивание, взбалтывание, ультразвуковая дезинтеграция, открытие контейнеров с давлением, отличным от атмосферного) следует проводить в специальных боксах или на аналогичном оборудовании.
- Следует сократить частоту применения шприцев и игл для подкожного введения. Их нельзя применять в качестве отсасывающих инструментов или любым другим образом, отличным от введения или забора материала у лабораторных животных.

Отсасывание ртом строго запрещено!

- Контейнеры для отработанных материалов должны быть размещены в удобных местах в достаточном количестве.
- В конце рабочего дня и после любой утечки потенциально опасного материала следует обработать рабочие поверхности. Обычно использования 5% раствора хлорной извести вполне достаточно для нейтрализации заразного агента. Более подробная информация о дезинфекции и стерилизации содержится в Руководстве ВОЗ по биобезопасности.
- Персоналу следует чаще мыть руки – после работы с материалами, животными, перед уходом с работы и перед едой.
- Средства личной безопасности следует снять до выхода из лаборатории.

Рекомендации ВОЗ по работе с образцами, которые могут содержать вирус высокопатогенного птичьего гриппа А/Н5

Соблюдение в лаборатории основных стандартов BSL2 и порядка работы в режиме BSL3 позволяет безопасно осуществлять следующие манипуляции:

- концентрировать и разводить образцы
- проводить исследования образцов, не приводящие к распространению вирусных частиц in vitro от in vivo
- выделять образцы генома из необработанных образцов
- приготавливать мазки с применением температурной или химической фиксации.

BSL3 порядки регламентируют следующие области:

- Все процедуры с образованием брызг и аэрозолей должны осуществляться в специальных шкафах безопасности.
- Сотрудники лаборатории должны носить спецодежду, включающую: одноразовые перчатки, халаты со сплошным передом, костюмы с рукавами, полностью закрывающими предплечье, колпаки и, что самое важное, бахилы или сменную обувь, защитные очки, хирургические маски или защитный шлем для исключения попадания брызг и аэрозолей при манипуляциях с образцами.
- Центрифугирование образцов следует проводить в запечатанных роторах или специальных закрывающихся пробирках. Эти роторы должны быть доставлены в кабинет биологической безопасности.
- После работы с образцами рабочие поверхности и оборудование должны быть обработаны. При использовании растворов, эффективных против безоболочечных вирусов, следует соблюдать рекомендации изготовителя. Обычно для нейтрализации заразного агента вполне достаточно использования 5% раствора хлорной извести. Более подробная информация о дезинфекции и стерилизации содержится в Руководстве ВОЗ по биобезопасности.
- Образцы, загрязненные биологическими отходами, предположительно или доказано содержащими вирус гриппа А/Н5, должны обрабатываться согласно Руководству ВОЗ по биобезопасности.

Если процедуру невозможно провести в специализированном шкафу, необходимо сочетать применение средств индивидуальной защиты (респираторы, шлемы) и средств безопасного хранения, закрывающиеся роторы и безопасные пробирки.

ВОЗ настаивает на использовании инструкций BSL3, описанных выше (II группа патогенности), для работы в лабораториях, соответствующих BSL2, при работе с вирусами гриппа типа А/Н5.

Лаборатории, не соответствующие упрощенным требованиям режима BSL2, должны направлять образцы для исследования в сертифицированные лаборатории.

Лабораториям, имеющим условия, соответствующие BSL3 (II группа патогенности), где работает подготовленный персонал, разрешается выполнять следующие операции:

- диагностические исследования с определением вируса *in vitro* или *in vivo*
- работы, связанные с репликацией генома А/Н5 вируса гриппа в клеточной культуре и/или хранение таких клеточных культур
- выделение вирусных частиц гриппа вида А/Н5 из культуры
- манипуляции по выращиванию и накоплению вируса гриппа вида А/Н5

9. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ MDCK

Грипп и другие ОРЗ остаются до настоящего времени наиболее распространенными и неуправляемыми инфекциями. В структуре инфекционной заболеваемости их удельный вес достигает 82-88%, а ущерб, наносимый экономике страны, исчисляется десятками млрд.рублей. Особую опасность представляют пандемии гриппа, возникающие с периодичностью в 11-55 лет, которые вызываются возбудителем, полностью изменившим структуру одного или двух белков поверхностной оболочки (гемагглютинин, нейраминидаза), - главных компонентов, ответственных за выработку вируснейтрализующих антител. Отсутствие иммунитета у населения к новому шифт-варианту приводит к поражению всех групп населения, при этом показатели заболеваемости, в структуре которой резко возрастает количество клинически тяжелых форм, осложняющихся пневмониями, возрастают в 4-5, а смертность – в 10 и более раз.

В этой ситуации резко повышается значимость лабораторных исследований по гриппу, обеспечивающих возможность раннего распознавания этиологии пандемии, с последующим проведением всего комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий..

Предлагаемый метод отличается от существующих методов изоляции вирусов гриппа на куриных эмбрионах по системе культивирования, составу сред, используемых для транспортировки материалов и выделения вирусов, а также по анализу результатов. Использование метода изоляции вирусов в клеточной культуре MDCK расширяет возможности выделения вирусов и получения репрезентативных материалов по структуре вирусных популяций, циркулирующих на территории России, а также повышает вероятность быстрого выделения и идентификации нового пандемического вируса.

Показанием к применению метода является рост гриппоподобных заболеваний, регистрация вспышек гриппа, в том числе нетипичной этиологии, а также развитие внутрибольничных вирусных респираторных инфекций.

1. Материально-техническое обеспечение работы.

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

1.1. Состав набора для субкультивирования клеток MDCK.

Клеточная культура MDCK (7 млн.)* - 1 матрас
Модифицированная среда Игла DMEM
или среда Игла MEM с двойным набором аминокислот

(фирма «Биолот» или Предприятие при НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН) ФС 42-94 ВС-88	- 235 мл
Эмбриональная сыворотка КРС, «Sigma», США, кат. № F3018	- 25 мл
Раствор для отторжения клеточной культуры (EDTA), Sigma, США-25 мл	
Пенициллин, ОАО «Красфарма», ГФХ ст. 95	- 500 тыс.ед.
Стрептомицин, ОАО «Биохимик», ГФХ стр. 636	- 0,5 г
Матрас культуральный, «Sarstedt», (Германия), кат. № 7245082	- 1 шт.

Примечание: Набор может храниться при 4°C в течение 6 месяцев (за исключением клеточной культуры МДСК, которая подлежит непрерывному субкультивированию, но не более 10 пассажей, после чего ее чувствительность понижается, что определяет необходимость ее повторного восстановления из криобанка). Культура получена из CDC (Atlanta, USA), хранится в криобанке НИИ гриппа.

1.2. Состав набора для изоляции вирусов гриппа (рассчитан на проведение 100 анализов):

А. Транспортная среда (для доставки клинических материалов)

Пептонный бульон (2,5% раствор), ТУ 10Р375-69	- 200 мл
Альбумин бычий, V фракция (7,5% раствор), «Sigma», (США), кат. № А8412	- 13,4 мл
Амфотерицин В, АКО «Синтез», г. Курган, кат № 64/228/461	- 1 амп.
Гентамицин «Хиноин», Венгрия, кат № АТС: JOIGB03	- 1 амп.

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

Среда Игла в модификации Дальбекко (DMEM) или среда Игла MEM с двойным набором аминокислот*	- 425 мл
Эмбриональная сыворотка КРС, «Sigma», США *	- 25 мл
Бычий альбумин, фракция V, 7,5% раствор*	- <u>5 мл</u>
Трипсин ТРСК, «Sigma», США, кат. № Т8642 (разведен и лиофилизирован по 200 мкг/амп.)	- 2 амп.
Раствор для отторжения клеточной культуры: трипсин-EDTA (0,05% трипсин + 0,53ММ EDTA) **	- 10 мл
HEPES – буфер, 1М раствор, pH 7,2, «Sigma» (США)	- 5 мл
Пенициллин* 1 млн. ед.	- 1 фл.
Стрептомицин* 1 г	- 1 фл.
Стерильная дистиллированная вода (для растворения трипсина ТРСК), ГОСТ 6709-72	- 5 мл.
Глицерин АО «Каустик» ГОСТ 6259-75 кв «Z»	- 2 мл.

В. Клеточная культура МДСК* (в монослое, 7 млн. клеток)	- 1 матрас
Среда Игла с сывороткой для транспортирования клеток*	- 50 мл
Матрас культуральный*	- 1 шт.

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

*- как указано выше

1.3.Материалы для постановки реакции гемагглютинации и торможения гемагглютинации

Планшеты для иммунологических реакций, “Медполимер”, ТУ 64-2-278-79

Дозатор 8-канальный

Эритроцитарная взвесь человека 0 (1) группы крови

Физиологический раствор

Фосфатно-солевой буфер

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72

Сыворотка диагностическая гриппозная ФС 42-397ВС-91

1.4.Оборудование

Холодильник бытовой (4±1)°С

Рефрижератор (-30±2)°С

Центрифуга лабораторная (до 3000 – 6000 об/мин)

Термостат (37±1)°С с подачей CO₂

Микроскоп биологический (МБИ-3) или инвертированный (ЛОМО, Россия)

или Leitz, K. Zeiss, Германия)

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Подготовка сред и растворов (в зависимости от количества исследуемых клинических материалов среды готовят в требуемых объемах непосредственно перед употреблением)

2.1. Подготовка ростовой среды DMEM (для субкультивирования клеток).

Готовят концентрированный (x 1000 кратный) раствор антибиотиков. Во флакон с пенициллином (1 млн. ед) добавляют 10 мл среды DMEM (без сыворотки), после растворения содержимое флакона переносят во флакон со стрептомицином (1 г), смесь пипетируют до полного растворения, фасуют по 0,5 мл и хранят при температуре не выше -20°C.

К 235 мл среды DMEM добавляют 25 мл фетальной сыворотки (10%), и 0,25 мл концентрированного раствора смеси пенициллина и стрептомицина (до конечной концентрации 100 ед/мкг в мл).

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

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

2.3. Подготовка среды для транспортирования клинических материалов (на обследование 100 больных)

К 200 мл 2,5% пептонного бульона добавляют 13,4 мл 7,5% раствора бычьего альбумина, антибиотики гентамицин (20 мг) и амфотерицин В (10 тыс.ед.) до конечной

концентрации 100 мкг/мл и 50 ед/мл соответственно. После перемешивания среду стерильно разливают по 2 мл по пробиркам и хранят до использования при 4°C.

2.4. Культивирование клеток

Клеточная культура MDCK сохраняет высокую чувствительность на протяжении 10 пассажей от момента ее получения, поэтому наборы целесообразно заказывать незадолго до начала эпидсезона (октябрь-ноябрь месяцы).). В случае объявленной угрозы пандемии наборы необходимо получить незамедлительно.

2.5. Субкультивирование клеточной культуры MDCK

Субкультивирование клеток проводят в матрасах общей емкостью 50 мл через каждые 4-5 дней во избежание "старения" культуры, в результате чего ее чувствительность к вирусу может понизиться. Культуральную среду из матраса с монослоем клеток полностью удаляют. На монослой наносят 1 мл раствора EDTA-трипсин. Легким покачиванием обмывают клеточный монослой указанным раствором в течение 1 мин., после чего внесенный раствор пастеровской пипеткой полностью удаляют. Процедуру повторяют один раз. После этого в матрас вносят 0,5 мл раствора EDTA-трипсин, так, чтобы он полностью покрыл монослой и помещают в термостат (36-37°C) на 10-15 мин до полного разрыхления и сползания монослоя. Периодически (через каждые 5 мин) матрас извлекают и постукиванием рукой определяют степень отторжения монослоя.

После сползания клеток для приостановки дальнейшего действия EDTA-трипсина в матрас вносят 0,5 мл фетальной сыворотки, а затем – 1 мл среды DMEM. Суспензию клеток мягко пипетируют тонко оттянутой пипеткой до получения гомогенной суспензии. К полученной взвеси добавляют 8 мл среды DMEM и 0,5 мл фетальной сыворотки. Суспензию перемешивают, производят подсчет клеток. При хорошем состоянии культуры с 1 матраса снимают около 7 млн. клеток. Полученную суспензию делят на 2 части по 5 мл, одну из которых используют для последующего субкультивирования, добавляя 15 мл ростовой среды DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки.. В зависимости от предполагаемых сроков работы и поступления клинических материалов полученную суспензию клеток MDCK готовят в следующих концентрациях: 100 тыс.клеток в мл- для формирования монослоя в течение 72 часов, 150-200 тыс. клеток в 1 мл –через 48 часов и 300-400 тыс. клеток в 1 мл – через 24 часа.

2.6. Выращивание клеток MDCK для изоляции вирусов

К 5 мл полученной суспензии клеток добавляют 15 мл среды DMEM без сыворотки, суспензию перемешивают пипетированием и засевают по 1 мл по флаконам. Монослой должен сформироваться не позднее, чем в течение первых двух суток и использоваться сразу для заражения, поскольку по мере дальнейшей инкубации чувствительность культуры к вирусам гриппа понижается.

Таким образом, посев культуры по флаконам должен проводиться за 1-2 суток до планируемого получения клинических материалов от больных.

2.7. Получение и доставка клинических материалов (см. также разделы 4 -6)

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

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

Практически важно, чтобы используемые тампоны не содержали вирулицидных веществ. С этой целью используют синтетические волоконные щеточки, выпускаемые зарубежными фирмами, или готовят ватные тампоны самостоятельно. Вату заблаговременно кипятят с нейтральным (детским) мылом, затем тщательно промывают проточной горячей и холодной водой, после чего кипятят в 3-х сменах дистиллированной воды и высушивают на фильтровальной бумаге. Деревянные палочки кипятят в 2-3 сменах дистиллированной воды (для удаления экстрактов древесины, обладающих антивирусной активностью) и высушивают. Подготовленные тампоны стерилизуют в сухожаровом шкафу.

Мазки из носа и зева. Материалы из носа от больных собирают стерильным тампоном, который вводят поочередно в обе ноздри на глубину 2-3 см, дают пропитаться секретом в течение 3 мин., после чего вращательными движениями тампон извлекают и погружают в пробирку с 2 мл транспортной среды, отламывая (обрезая) нестерильный конец палочки. Материалы из зева собирают аналогичным образом, плотно прижимая тампоны к пораженным гиперемизированным участкам миндалин и задних фарингеальных отделов. Тампон из зева помещают в одну пробирку вместе с тампоном из носа..

Пробирки незамедлительно доставляют в холодовом режиме (+4°C) в лабораторию, где тампоны с вирусным материалом после интенсивного встряхивания в течение 1 мин. отжимают в среду, которую используют для заражения клеточной культуры MDCK.

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

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

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

Хранение материалов от больных. Оптимальным для выделения вирусов является незамедлительное заражение клеточной культуры, поскольку при хранении материалов инфекционная активность вирусов понижается. При отсутствии выросшей культуры на момент поступления материалов они могут храниться в лаборатории до заражения при +4°C не более 2 дней.

Для более длительного хранения они должны быть заморожены при температуре не выше -70°C. Следует избегать повторного замораживания – оттаивания для сохранения инфекционности вируса.

2.8 Выделение вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK

2.8.1. Первичное заражение. Флаконы с монослоем клеток с MDCK дважды по 1 мл отмывают средой СВ (DMEM без сыворотки с ТРСК-трипсином в концентрации 2 мкг/мл). После этого свежую порцию среды СВ вносят во флаконы по 0,9 мл в каждый.

Материалы от больных вносят по 0,1 мл в 2 флакона с культурой клеток, в контрольные культуры добавляют 0,1 мл среды СВ.

Инфицированные культуры центрифугируют при 1000 об/мин при комнатной температуре в течение 45 мин, что способствует ускорению процессов адсорбции и проникновения вируса.

После этого флаконы инкубируют при 37°C, желательнее в термостате с подачей 5% CO₂, ежедневно контролируя состояние монослоя.

При отсутствии выраженного ЦПД пробы выдерживают при + 37°C вплоть до 7-9 суток. Периодически через каждые 2-3 дня, начиная с 48 часов после заражения, размножение вирусов гриппа контролируют в реакции гемагглютинации. С этой целью из каждого флакона отбирают по 50 мкл культуральной жидкости (КЖ), 2 гомологичные пробы (от одного пациента) объединяют, после чего титруют на фосфатно-солевом буфере, pH 7,2-7,4, начиная с цельной, неразведенной КЖ, до разведения 1:32 (в объеме 50 мкл). К полученным разведениям КЖ добавляют по 100 мкл трижды отмытой физиологическим раствором 0,75% взвеси эритроцитов человека 0(1) группы крови (наиболее чувствительная система регистрации гемагглютининов). При отрицательном результате необходимо разрушить клетки замораживанием-оттаиванием, подготовить объединенные пулы культуральной жидкости (из 2х флаконов от каждого пациента) и провести последующий пассаж заражением 2х флаконов с монослоем клеток MDCK, с последующей регистрацией репродукции по ЦПД и в РГА.

2.8.2. Накопление вируса. Вирусосодержащую культуральную жидкость из одного из флаконов с развившимся ЦПД используют для заражения матраса (емкостью 50 мл) с выросшим монослоем клеток MDCK для дальнейшего накопления вируса. Во второй флакон добавляют 5 мкл стабилизатора (глицерин- до конечной концентрации 0,5% и хранят при температуре не выше – 25-40°C, но лучше всего при - 70°C.

Перед заражением монослоя клеток MDCK, выросшего на культуральном матрасе, проводят процедуры, описанные выше (удаление ростовой среды, отмывание средой СВ). В отмытый матрас с монослоем клеток вносят 1 мл вирусосодержащего материала в неразведенном виде. После инкубации при 37°C в течение 30-40 минут в матрас вносят 10 мл среды СВ. Матрас помещают в термостат. Ежедневно оценивают развитие ЦПД, через каждые 3 суток определяют присутствие гемагглютининов. При появлении выраженного ЦПД и (или) обнаружении гемагглютининов культуральную среду собирают и используют для последующего типирования возбудителя в РГА в присутствии специфических диагностических гриппозных сывороток.

Примечание: В целях соблюдения правил безопасности всю работу с инфекционным материалом проводят в масках и резиновых перчатках в стерильных настольных боксах, оснащенных ультрафиолетом. Отработанную посуду и материалы

обеззараживают автоклавированием, рабочие поверхности и полы обрабатывают 2% раствором лизоформина, по окончании и перед началом работы проводят 1,5-2 часовое облучение бокса ультрафиолетом.

2.9. Направление выделенных вирусов.

Все выделенные вирусы гриппа и нетипируемые гемагглютинирующие агенты для последующего изучения их антигенной принадлежности необходимо немедленно пересылать авиатранспортом в холодовом режиме в Федеральный центр по гриппу и другим ОРЗ при НИИ гриппа РАМН (197376 Санкт-Петербург, ул.проф.Попова 15/17) , известив получателя об отправке по одному из телефонов (812)234-62-11, 234-62-63, 234-62-00, 346-12-70 или по e-mail nicsomin@lek.ru.

Базовые лаборатории Центра экологии и эпидемиологии гриппа НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН должны направлять выделенные штаммы по адресу: г. Москва, 123098, ул. Гамалеи, 16, известив при этом получателя по тел.: (095) 190-30-46 или по факсу: (095) 190-28-67, лаборатория гриппа.

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

Эффективность использования метода.

Предлагаемый метод выделения циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа в клеточной культуре MDCK выгодно отличается от метода выделения вирусов гриппа на куриных эмбрионах большей эффективностью, а результаты изоляции в обеих системах носят взаимодополняющий характер.

В течение ряда эпидемий в НИИ гриппа проводились работы о сравнительной оценке двух способов выделения вирусов гриппа: в куриных эмбрионах и на клеточной культуре MDCK.

Так, в эпидсезон 1997-1998 г. частота выделения вирусов гриппа в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK составила 2,2 и 13% соответственно, а в сезон 1998-1999 – 6,2 и 7,7% соответственно. При этом результаты изоляции вирусов в обеих системах совпадали лишь в 0,5-3,4% случаев (от числа обследованных больных), что свидетельствует о различиях в тропизме к клеточным рецепторам у циркулирующих вирусов и целесообразности использования обеих систем культивирования. При этом вирусы, выделенные в куриных эмбрионах, могут быть использованы для

конструирования гриппозных вакцин, а в клеточной культуре MDCK – для производства диагностических препаратов. Использование обеих систем культивирования повышает частоту изоляции вирусов гриппа, что особенно важно для экстренной идентификации возбудителя в случае появления нового пандемического вируса.

Необходимо подчеркнуть, что повышение частоты выделения достигается только при полном соблюдении всех этапов работ, изложенных выше, использовании указанных в рекомендации реагентов и специальной сублинии клеток MDCK, которые могут быть поставлены в составе наборов для изоляции вирусов гриппа и субкультивирования клеток (комплекуются на базе НИИ гриппа РАМН).

10. Клиническая и эпидемиологическая характеристика гриппа А (H5N1) во Вьетнаме (предварительные данные).

Нижеприведенная информация была подготовлена вьетнамскими клиницистами, эпидемиологами и учеными из лабораторий, участвующих в изучении клинических особенностей гриппа А(H5N1)и методов его лечения. ВОЗ выражает благодарность этим авторам за разрешение незамедлительной публикации их данных.

Начиная с декабря 2003 года, вспышка птичьего гриппа H5N1 охватила многие страны Юго-Восточной Азии, поражая стада домашней птицы. При этом были зарегистрированы случаи инфицирования людей вирусом H5N1, лабораторно подтвержденные во Вьетнаме и Таиланде. Ниже представлены таблицы, в которых суммированы клинические и эпидемиологические признаки десяти первых подтвержденных случаев гриппозной инфекции H5N1 во Вьетнаме.

Пока информация об этих случаях оценивается работниками здравоохранения, ни одна из представленных особенностей не может считаться окончательно определенной, как и полный спектр информации по человеческой инфекции H5N1, находящийся пока в стадии изучения.

Во всех десяти случаях диагноз гриппа А H5N1 был подтвержден выделением вируса в культуре клеток или ОТ-ПЦР с специфическими праймерами для H5 и N1. Восемь из десяти пациентов имели в анамнезе прямой контакт с птицей, и не было доказательств передачи инфекции от человека к человеку.

Лихорадка с температурой выше 38, одышка и кашель были основными первичными клиническими проявлениями. У всех пациентов регистрировалась выраженная лимфопения и определенные отклонения при рентгенологическом исследовании грудной клетки, которые носили неспецифический характер и включали диффузные, мультифокальные или отдельные инфильтраты. В нескольких случаях на рентгенограммах обнаруживалось сегментарное или долевое уплотнение. При аускультации часто выслушивались хрипы. Никто из пациентов не жаловался на боль в горле, конъюнктивит, сыпь или насморк. Водянистая диарея или жидкий стул регистрировались примерно в половине случаев. Восемь из десяти первых пациентов погибли, один выздоровел, один оставался на дату публикации в критическом состоянии.

На основании эпидемиологических данных о шести случаях среднее время между инфицированием и появлением клинических проявлений заболевания составило 3 дня (в пределах 2-4 дней). Смертность была высокой. Смерть наступала в среднем через 10 дней после начала проявления заболевания. Однако эти результаты носят предварительный характер ввиду ограниченного числа наблюдений.

Таблица 1: Эпидемиологические данные о пациентах

Случай	Провинция	Профессия	Эпидемиологическая информация
VN1	НСМС	Школьница	Девушка купила утенка и ухаживала за ним дома в течение 5 дней. Утки была диарея, позже она умерла и девушка похоронила ее. День спустя она ее перезахоронила. И девушка, и её брат трогали утку. Также двумя днями ранее она съела почти неприготовленные яйца (вьетнамский деликатес). Её соседи держали 40 цыплят и голубей, сообщений о заболевании среди них не было. Через 3 дня после покупки утки у нее появилась лихорадка. Других домашних птиц в доме не было. Никто больше из домашних и родственников не заболел.
VN2	НСМС	Учащийся	Мальчик часто посещал петушиные бои и держал петухов и других птиц перед боями. Среди птиц и 20 людей, имевших отношение к петушиным боям, о заболеваниях не сообщается. Мальчик ходил в школу через птичий рынок в 50 м от своего дома
VN3	Soc Trang	Учащийся	Обширные контакты включающие контакт и с 10 мертвыми и умирающими цыплятами на своем участке. Пациент с отцом приготовили блюда из мертвых цыплят за 3 дня до проявления своей болезни. Больше никто из домашних и родственников не заболел. Других домашних птиц в доме не было.
VN4	Lam Dong	Фермер	Прямой контакт с 50 цыплятами дома (который исполнял также функции ресторана), включая мертвых. Пациент готовил цыплят с отцом. Больше никто из домашних и родственников не заболел. Других домашних птиц в доме не было.
VN5	Lam Dong	Фермер	Прямой контакт с цыплятами на своем участке за 4 дня до проявления болезни. Приготовил несколько мертвых цыплят в качестве пищи. Никто больше в семье не заболел.
VN6	Lam Dong	Фермер	Прямой контакт с больными утками и цыплятами на своем участке. Большое число больной птицы в районе. Других заболевших в семье нет.
VN7	Ha Nam	Учащийся	Родители - сельские фермеры, не державшие птицу, но имело место большое количество неожиданных смертей цыплят по соседству в предшествовавшие 2 недели. Мать умерла от гриппа H5N1 9 января. Отец и молодой родственник здоровы. Выездов за пределы Вьетнама не было. В учреждения здравоохранения до проявления заболевания не обращались.
VN8	Nam Dinh	Учащийся	Нет информации о контакте с больной птицей. Семилетняя сестра погибла от острого респираторного заболевания 29 декабря. Оба родителя и два других близких родственника здоровы.
VN9	Bac Ninh	Учащийся	Родители - сельские фермеры, державшие цыплят. Цыпленок умерли неожиданно за 5 дней до заболевания. Оба родителя и старший брат здоровы.
VN10	Ha Tay	Школьница	Родители - сельские фермеры, держали цыплят. Цыпленок умерли за 2 недели до появления клиники у пациента. Соседские цыплята умирали в течение недели до появления симптомов заболевания. Оба родителя и семь других ближайших родственников здоровы.

Таблица 2: Клиническая характеристика пациентов при поступлении

№ пациента	VN1	VN2	VN3	VN4	VN5	VN6	VN7	VN8	VN9	VN10
Число дней между контактом с птицей и проявлением болезни	3	2	3	4	3	3	-	-	-	-
День болезни	8	6	5	6	5	7	3	7	7	5
Пол	Ж	М	Ж	М	М	М	Ж	М	М	Ж
Возраст (годы)	8	13	16	18	24	23	12	5	10	8
Кашель	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Одышка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мокрота	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Диарея	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Сыпь	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Миалгия	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Конъюнктивит	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лихорадка	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Температура	38.5	39.6	40	40	39.5	38.7	39.5	38.8	39	38.5
АД	104/64	110/70	110/60	100/60	110/60	120/80	90/60	112/54	105/80	80/40
Частота дыхания (мин ⁻¹)	40	40	40	60	50	28	65	70	64	60
Хрипы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Затрудненное дыхание	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Иные признаки	-	-	-	-	-	-	Печень +2 см	-	-	Кровотечение из десен

Таблица 3: Лабораторные данные при поступлении пациентов

№ пациента	VN1	VN2	VN3	VN4	VN5	VN6	VN7	VN8	VN9	VN10
Самая высокая температура в первые 24 часа	38.3	39.2	39	39.5	39	38.7	39.5	38.8	39	38.5
Лейкоциты (*10 ⁹ /литр)	1.2	2.7	3.0	1.7	1.9	3.9	2.1	3.4	2.8	1.9
Гемоглобин (г/дл)	11.3	13.4	11.9	14.5	15.8	17.6	13.4	12.6	12.4	12.3
Лимфоциты (*10 ⁹ /литр)	0.26	0.89	0.48	0.51	1.0	0.7	1.1	0.71	0.86	0.25
CD4/8	0.71	-	0.62	0.75	0.59	1.08	-	-	-	-
Тромбоциты (*10 ⁹ /литр)	151	81	70	69	62	102	45	174	135	162
АЛТ (ед/л)	354	254	47	-	-	89	53.7	-	-	265
АСТ (ед/л)	320	1058	20	-	-	110	278	-	-	1217
Креатинин (ммоль/л)	34	14.1	71	89	43	121	50	64	-	27.4
Глюкоза (моль/л)	-	-	19.0	13.5	11.7	4.92	-	-	-	-
Сатурация на 40%-м кислороде	95	85	67	81	80	90	50	70	86	50
ПЦР H5N1 (дни болезни)	12	6	5	6	5	7	5	7	9	6
Вирус в культуре	Ожидается	Ожидается	Ожидается	Ожидается	Ожидается	Ожидается	+	+		
Антигены вируса гриппа	+	-	-	+	-	-				
Культура крови	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Исход (дни болезни до смерти)	выжил	Умер 9	Умер 14	Умер 9	Умер 6	В критич. сост.	Умер 6	Умер 17	Умер 14	Умер 7

Нормальные значения

Гемоглобин 13-18 г/дл
 Лейкоциты 4-11 *10⁹/л
 Лимфоциты 1.5-4 *10⁹/л
 Уровень CD4/8 1.4-2.0
 Тромбоциты 150-400 *10⁹/л
 Аланинаминотрансфераза (АЛТ) менее 37 ед/л
 Аспаратаминотрансфераза (АСТ) менее 40 ед/л
 Креатинин 82-106 ммоль/л
 Глюкоза 3.9-6.4 ммоль/л

11. Птичий грипп А (H5) в сельских районах Азии: соображения по пищевой безопасности

В некоторых районах Азии основная часть семей содержит малочисленные стада свободнопасающейся домашней птицы, и до 80% этой птицы находится в небольших деревенских поселениях. Это делает необходимым контроль за вспышками высокопатогенного птичьего гриппа А (H5) (ВПГ) среди домашней птицы и требует особого внимания к вопросу об обращении с домашней птицей в странах, где в настоящее время регистрируются вспышки данного заболевания.

У животных ВПГ чаще всего распространяется в результате прямого контакта с дикими птицами, особенно водоплавающими, переносящих бессимптомную форму заболевания, а также контактов с инфицированной домашней птицей и птицепродуктами. Существуют и непрямые пути заражения, а именно через загрязненную пищу, воду, навоз и помет. Насекомые, грызуны, кошки и собаки также могут быть переносчиками инфекции.

Преыдушие вспышки ВПГ, особенно в Гонконге в 1997 г. и в Нидерландах в 2003 г., происходили в регионах, характеризующихся условиями промышленного производства домашней птицы, что обеспечило возможность быстрого и эффективного применения рекомендованных ВОЗ мер по контролю за животными (включая немедленный забой инфицированных птиц, запрет на их передвижение, компенсации пострадавшим фермерам и мелким владельцам домашней птицы).

В то время как контрольные меры могли быть быстро осуществлены в условиях промышленного производства домашней птицы, в затронутых странах Азии текущие вспышки регистрируются в районах, где домашняя птица и люди находятся в одной и той же окружающей среде. Домашняя птица имеется почти во всех деревнях и продается на рынках в живом виде, так что цепь «от фермы до тарелки» может быть очень короткой. В этих условиях заболевание может быстро распространиться среди множества мелких стад. Практика домашнего забоя означает, что в инфицированных районах возникает непосредственный контакт человека с вирусом. В такой ситуации применение рекомендованных мер контроля за вспышками в животных популяциях будет чрезвычайно затруднено.

Текущие указания по аспектам пищевой безопасности (при наличии заболеваний среди домашней птицы) действительны для районов, где проводятся эффективные меры по контролю за животными, и гарантируется, что инфицированные животные или яйца не попадут в реализацию. В сельских условиях до того, как применяемые контрольные меры станут эффективными, потребуются дополнительные указания.

Изучение предыдущих вспышек показало, что тесный контакт с живой инфицированной птицей был основным механизмом передачи инфекции людям. Практика продажи живой домашней птицы непосредственно потребителям должна быть прекращена в районах, в которых регистрируются вспышки птичьего гриппа.

Должны быть разработаны соответствующие информационные сообщения, содержащие сведения для сельского населения о необходимости ограничения и остановки передвижения животных, наряду с необходимыми мерами в случае обнаружения хозяевами больной или умершей птицы в своем небольшом стаде. Следует подчеркнуть важность проведения гигиенических мер в целях предупреждения распространения заболеваний при использовании транспорта, а также через оборудование, обувь и одежду.

Ожидается, что практика домашнего забоя полностью прекращена не будет, и, следовательно, должны быть даны рекомендации по возможно более безопасному забою. Больные птицы или птицы из стад, в которых больны одна или более птиц, никогда не должны использоваться для употребления в пищу, а их яйца не должны продаваться. Забой должен осуществляться специально назначенным лицом, одетым в защитную одежду. Там, где это невозможно, строгая гигиена должна обеспечиваться лицом, осуществляющим забой. Забой должен предпочтительно осуществляться в определенном месте, удаленном от кухни; дети и животные должны держаться вдали. Важно использовать горячую воду для ошпаривания. После ошпаривания, не менее важна очистка и дезинфекция территории, включая безопасное удаление перьев и остатков туш.

Пока заболевание широко распространено среди животных, имеется риск потребления человеком инфицированных животных и, таким образом, повышается риск контакта для любого лица, задействованного в этих мероприятиях.

По рекомендациям ВОЗ, тепловая обработка замороженной домашней птицы или приготовленных из нее продуктов должна производиться таким образом, чтобы внутри готовящихся продуктов температура составляла не менее 70°C, что обеспечивает безопасность их потребления. Это же относится и к яйцам. Яйца от инфицированных птиц могут содержать вирус как на скорлупе, так и под ней и должны быть приготовлены для употребления в пищу соответствующим образом.

* Под домашними птицами понимают цыплят, уток, гусей, индеек, цесарок, выращиваемых для получения мяса, яиц или перьев.

12. Рекомендации людям, проживающим в районах, где зарегистрированы заболевания, вызванные высокопатогенным вирусом птичьего гриппа (ВПГ)

Рекомендации по контактам с курами, утками или иной домашней птицей в районах с ВПГ

- Людям следует насколько возможно избегать контакта с курами, утками или иной домашней птицей. Дети не должны контактировать с домашней или иной птицей;
- Не приносить с собой цыплят, кур (в живом или мертвом виде), уток или другую домашнюю птицу при посещении друзей или семьи, даже если вы думаете, что ваши птицы здоровы;
- Избегать контакта с фермами по выращиванию цыплят, утят или любыми другими фермами, где животные болели, были забиты или предположительно имели птичий грипп;
- Если вы контактируете со средой, где были больные/умершие цыплята, утята или другая домашняя птица, хорошо вымойте руки и контролируйте температуру тела в течение 7 дней. Если у вас поднимается высокая температура (выше 37.5°C), – проконсультируйтесь с вашим врачом на предмет необходимости лечения;
- Если у вас был контакт с любыми мертвыми птицами, умершими от птичьего гриппа или с пометом от этих птиц, проконсультируйтесь с вашим врачом на предмет необходимости профилактики или лечения.

Выращивание домашней птицы в регионе, затронутом ВПГ

- Если у вас дома есть цыплята, утки или другая домашняя птица, важно знать, что и когда делать, в случае если они были забиты или умерли. Вы должны знать, как избавиться от них и обеззаразить ваш двор или загон и т.д.;
- Когда бы вы ни контактировали с домашней птицей, сараем/загоном или чем-либо, загрязненным фекалиями, позаботьтесь, чтобы вы были защищены маской, защитными очками, халатом, резиновыми сапогами и перчатками;
- Если у вас нет этих принадлежностей, постарайтесь их импровизировать; например, закрыть рот и нос одеждой, надеть полиэтиленовые пакеты на руки и обувь, стирающийся комбинезон (халат) и т.д.;
- Одевайте эту одежду для забоя птицы, транспортировки тушек, уборки территории (см. ниже советы по уборке территории). Позаботьтесь, чтобы дети не были вовлечены;
- После уборки территории снимите всю защитную одежду и вымойте руки, постирайте одежду и, если возможно, помойтесь сами. Лучший вариант – это душ.
- Если возможно, постирайте одежду в горячей или теплой мыльной воде. Вывесите на солнце на просушку;
- Уничтожьте перчатки, полиэтиленовые пакеты и другие ненужные материалы
- Вычистите все принадлежности многоразового использования, такие как резиновые сапоги и защитные очки;
- Всегда мойте руки после контакта с этими принадлежностями.

Советы по очистке двора/загона для цыплят

- После забоя птицы помещение должно быть вычищено;
- Оденьте всё защитное снаряжение, описанное выше, до начала чистки;

- Соберите все разбросанные по двору фекалии в кучу для последующего захоронения. Они должны быть захоронены на глубине не менее 1 метра;
- Постарайтесь перемещать помет, не поднимая много пыли – сухая пыль может попасть вам в лицо, глаза, рот;
- Уберите тщательно весь помет из загона/сарая и захороните его, как описано выше;
- Хорошо вымойте все помещения с порошком и водой;
- Уничтожьте все отработанные принадлежности, использованные для защиты, такие как перчатки, полиэтиленовые пакеты, маски и т.д. Поместите вещи для повторного использования в сосуд с водой и стиральным порошком;
- Хорошо вымойте руки с мылом;
- Примите душ/помойтесь с мылом, вымойте волосы;
- Соблюдая меры предосторожности для исключения своего повторного загрязнения, выстирайте одежду, использованную при забое/чистке, в горячей воде с порошком;
- Высушите одежду на солнце;
- Каждая принадлежность, которая будет использована повторно, такая как резиновые перчатки или сапоги, должна быть тщательно вымыта с мылом/порошком. Для уверенности, что принадлежности чистые – помойте их дважды;
- Всегда мойте руки после контакта с загрязненными принадлежностями.

Советы по обращению с загрязненной обувью

- После хождения по загрязненным территориям, таким как птицефермы, дворы с цыплятами или рынки, вы должны как можно тщательнее почистить свою обувь;
- Соблюдайте осторожность, чтобы при чистке обуви ничего не отлетело вам в лицо. Надевайте полиэтиленовые пакеты на руки и защитите глаза и рот во время чистки грязной обуви;
- Оставляйте грязные сапоги и ботинки вне дома пока они не будут тщательно вычищены.

Рекомендации в связи с посещением друзей или родственников в учреждениях здравоохранения

- Избегайте контакта с пациентами с ВПГ, особенно, когда они заразны;
- Если вы посещаете пациента с ВПГ – следуйте советам персонала больницы по ношению защитной одежды, маски, перчаток и т.д.;
- Вам потребуется надеть специальную защитную одежду при прямом контакте с пациентом или его обстановкой;
- Личное защитное снаряжение, которое вам нужно будет надеть, включает маску, халат, перчатки и защитные очки;
- Вам нужен будет совет медперсонала, как правильно носить защитную одежду, особенно, как правильно надеть маску на лицо;
- Когда вы покидаете палату пациента с ВПГ, вы должны снять эти принадлежности и очень хорошо вымыть руки с мылом в течение минимум 90 секунд.

Рекомендации по респираторным заболеваниям

- Каждый больной с гриппоподобным заболеванием должен соблюдать предосторожности в отношении выделений из носа и рта;

- Дети наиболее склонны трогать лицо, глаза и рот немытыми руками (т.е. когда им холодно, после игр). Объясняйте детям важность мытья рук после кашля, чихания и игр;
- Закрывайте нос и рот во время кашля и чихания – используйте платочки и выкидывайте их сразу после использования. Научите этому детей
- Всегда мойте руки после любого контакта с выделениями из дыхательных путей, так как они могут привести к распространению заболевания;
- Соблюдайте предосторожности в отношении выделений при кашле и чихании при наличии окружающих, особенно маленьких детей. Самое лучшее – это избегать контакта с лицами повышенного риска возникновения заболевания (маленькие дети или лица с другими заболеваниями) до исчезновения гриппоподобных симптомов;
- Посетите врача в случае серьезного заболевания;
- Избегайте контакта с выделениями других людей с гриппоподобными заболеваниями;
- Просите людей, особенно детей, закрывать нос и рот при кашле или чихании и пользоваться платком (когда это возможно).

13. Контроль за птичьим гриппом А (H5N1): вопросы общественного здоровья

Текущие вспышки высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 у домашних птиц в Азиатских регионах имели внезапные серьезные последствия для сельскохозяйственного сектора¹. О случаях заболеваний среди людей с высокой смертностью было сообщено из двух стран, Вьетнама и Таиланда, где были зарегистрированы многочисленные вспышки среди домашней птицы.

Можно ожидать, что случаи заболевания у людей будут зафиксированы также и в других странах, где быстро распространяются вспышки среди домашней птицы.

Число случаев заболеваний среди людей, выявленное в настоящее время, невелико в сравнении с большим количеством инфицированных птиц, заболеваемость среди которых распространилась по географически обширной территории. Это дает основание полагать, что штамм вируса А/Н5 относительно редко заражает человека.

К настоящему времени ни одного случая передачи заболевания от человека к человеку не зарегистрировано, однако продолжающееся выявление случаев инфекции у птиц может создать возможности для возникновения нового подтипа вируса гриппа, способного легко распространяться среди людей, дав начало пандемии гриппа. Если это, исторически достаточно редкое, событие произойдет (за предыдущий век случилось 3 пандемии), возникнут серьезные последствия для здоровья людей во всем мире.

По этой причине, заботы общественного здравоохранения в отношении настоящей ситуации с H5N1 должны быть приоритетными и сосредоточены на оценке не только крупных экономических потерь вследствие заболеваний и гибели животных, но и возможных и еще непредсказуемых последствий для людей.

Известно, что ряд других болезней животных могут передаваться человеку. Анализ таких заболеваний, известных как «зоонозы», показал, что строгий контроль за здоровьем животных, вызванный необходимостью защиты здоровья человека, помог восстановить доверие потребителей².

Последний опыт также показал, что меры по контролю за зоонозными заболеваниями, которые способствовали бы сдерживанию их дальнейшего распространения и снижению экономических потерь, должны быть тесно координированы с предупреждением долгосрочного риска для здоровья человека. В настоящей ситуации меры, принятые по элиминации заболевания у домашней птицы, также уменьшат содержание вируса в окружающей среде и снизят возможности контакта с человеком и его инфицирования. Эти мероприятия должны выполняться в срочном порядке, отдавая все приоритеты охране человеческого здоровья. Предыдущие вспышки высокопатогенного птичьего гриппа, связанные с инфицированием людей, случились в регионах с развитой птичьей индустрией и хорошо развитыми инфраструктурами здравоохранения и сельского хозяйства, таких как Гонконг и Нидерланды. Несмотря на это, элиминация инфекции у птиц была сложной, трудной и дорогостоящей. Обе вспышки контролировались посредством немедленного забоя инфицированных стад, карантина и дезинфекции ферм, жесткой биозащиты, ограничением передвижения животных, соответствующего возмещения ущерба и вознаграждения фермеров.

Сложившаяся ситуация в странах Юго-Восточной Азии гораздо более сложна. Контроль вспышек высокопатогенного птичьего гриппа особенно затруднен в районах, где птицы свободно перемещаются. В ряде вовлеченных стран до 80% всего поголовья птиц содержится в небольших фермерских хозяйствах такого типа.

Учитывая эти особенности, становится очевидной потенциальная возможность закрепления вируса H5N1 в популяции птиц в этих местностях и его распространения в другие регионы мира. Это прозвучало в одном из заключений, сделанных по итогам совещания FAO/OIE/ВОЗ по контролю за птичьим гриппом (Рим, 3-4 февраля 2004г.).

По существу не разработано плана эффективного контроля за животными и, соответственно, снижения риска инфицирования людей. Существующая ситуация не может быть ликвидирована ранее применяемыми методами.

Специфические меры должны быть разработаны для каждой страны в зависимости от особенностей эпидемиологической ситуации и возможностей государства, при тесном взаимодействии секторов здравоохранения и сельского хозяйства. Руководство сельского хозяйства сталкивается с требованием немедленной элиминации птичьего резервуара H5N1. Власти всех затронутых государств должны работать вместе и координировано.

Совершенно необходима прозрачность в сообщениях о заболеваниях среди животных и человека. Эксперты выразили согласие в вопросе необходимости немедленного забоя инфицированного поголовья и бывших в контакте птиц, что является первой линией защиты как при охране человеческого здоровья, так и уменьшении последующих потерь для сельскохозяйственного сектора. Другие меры, такие как вакцинация здоровых хозяйств, могут играть вспомогательную роль в некоторых случаях, однако они должны проводиться в комплексе с мерами по предупреждению дальнейшего распространения инфекции. ВОЗ неоднократно подчеркивала необходимость проверки того, что забой проводится должным образом, чтобы исключить появление новых случаев инфицирования людей, а также того, чтобы вакцинация птиц не вела к снижению бдительности или отмене других необходимых противозидемических мероприятий.

ВОЗ делает акцент на трех стратегических задачах: предотвратить пандемию гриппа, контролировать вспышки среди людей и предотвращать дальнейшее распространение вируса, а также проводить необходимые меры для повышения уровня готовности и быстрого реагирования, включая незамедлительную разработку вакцин для людей против гриппа H5N1. ВОЗ выпустила серию технических указаний с целью сведения к минимуму риска появления новых случаев инфицирования людей и координации международного взаимодействия.

ПРИМЕЧАНИЯ:

¹. *ОIE относит высокопатогенный птичий грипп к заболеваниям «списка А». Список А включает трансмиссивные заболевания, «для которых имеется потенциальный риск серьезного и быстрого распространения, независимо от национальных границ, которые имеют серьезные социально – экономические последствия и важное значение в международной торговле животными и животными продуктами».*

² *Примером является распространение коровьей губчатой энцефалопатии, или «коровьего бешенства» среди рогатого скота, что привело к появлению редкого фатального заболевания у людей.*

14. Использование сезонной гриппозной вакцины среди людей при риске инфекции H5N1

ВОЗ рекомендует целевую доставку сезонной вакцины против гриппа в группах с высоким риском контакта с вирусом птичьего гриппа H5N1, циркулирующим в настоящее время в Азии. Целевая иммунопрофилактика с помощью сезонной вакцины против гриппа рекомендуется в странах, где зарегистрированы вспышки ВПГ H5N1 у домашней птицы, как одно из возможных средств снижения вероятности одновременного инфицирования людей вирусами птичьего и человеческого гриппа. Сниженная возможность двойного заражения снижает вероятность реассортации и возникновения нового вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Группы, которым рекомендована иммунизация

1. Все лица, предположительно контактировавшие с домашней птицей или птицефермами, подозреваемыми на заражение птичьим гриппом (H5N1), особенно (а) забойщики, занятые уничтожением птицы и (б) люди, живущие или работающие на птицефермах, где сообщалось о вирусе H5N1 или подозревается его наличие, или в местах забоя.
2. Работники здравоохранения, вовлеченные в ежедневный уход за больными с предполагаемыми или подтвержденными случаями гриппа H5N1.
3. Должен быть создан достаточный запас вакцины для работников здравоохранения в учреждениях скорой помощи, в районах, где имеются подтвержденные случаи гриппа H5N1 у птиц.

Соображения

- Пандемические штаммы 1957 и 1968 года изоляции были реассортантами человеческого и птичьего подтипов вируса гриппа А.
- Генетическая реассортация вирусов человеческого и птичьего гриппа может произойти у людей, коинфицированных текущими подтипами H1 и H3 вируса гриппа А и вирусом птичьего гриппа, полученного от домашней птицы.
- Вакцинация текущей межпандемической вакциной не защитит людей от инфицирования птичьим гриппом H5N1, но снизит риск коинфицирования людей и генетической реассортации вирусов человеческого и птичьего происхождения.
- Защитные уровни антител обычно выявляются через две недели после иммунизации вакциной против гриппа. Независимо от задержки в выработке антител люди могут выиграть от вакцинации, даже если контакт произошел в течение этих двух недель.
- Эпидемический человеческий грипп встречается в тропических и субтропических регионах в течение всего года.

Массовая вакцинация всех жителей в пораженных районах не рекомендуется с учетом существующих эпидемиологических данных.

На сегодня нет специальных требований по вакцинации против гриппа для людей, отправляющихся в международные путешествия с учетом текущих вспышек гриппа у домашней птицы. Рекомендации по международным путешествиям и здоровью (включая предупреждение гриппа) доступны в публикации ВОЗ «Международные путешествия и здоровье».

15. Рекомендации ВОЗ по защите лиц, участвующих в массовом забое животных, потенциально инфицированных высоко патогенным вирусом гриппа птиц (ВПГ).

Птичий грипп является высококонтагиозной для кур инфекцией, вызывающей быстро распространяющиеся среди них эпидемии. Тесный контакт с инфицированной птицей, ее фекалиями или пылью, загрязненной ими, может приводить к инфицированию людей. Для предотвращения таких случаев рекомендуются следующие меры предосторожности:

1. Работники, занятые убоем или транспортировкой птицы, должны быть обеспечены соответствующими защитными средствами:

- Защитной одеждой, покрывающей все тело, плюс непроницаемый фартук или хирургическим халатом с длинными рукавами с манжетами и непроницаемым фартуком.
- Высокопрочными рабочими резиновыми перчатками, которые могут быть дезинфицированы.
- Респираторными масками предпочтительно типа N95. Стандартные плотно подогнанные хирургические маски могут быть использованы в отсутствие респиратора N95.
- Защитными очками.
- Резиновыми или полиуретановыми сапогами, которые могут быть дезинфицированы или защитные покрытия для обуви, которые могут быть выброшены.

2. Все лица, бывшие в тесном контакте с инфицированными животными, должны часто мыть руки с мылом. Убойщики и транспортировщики должны дезинфицировать руки после проведения рабочих операций.

3. Очистка окружающей среды должна выполняться в местах забоя с использованием указанных выше защитных средств.

4. Все лица, бывшие в контакте с инфицированной птицей или работавшие на фермах, находящихся под подозрением, должны быть под непрерывным врачебным наблюдением.

- Рекомендуется, чтобы озельтамивир (тамифлю) был всегда доступен для лечения респираторных инфекций, подозреваемых на грипп H5N1, среди убойщиков и рабочих ферм, привлекаемых к массовому забою (75 мг в капсуле, 2 раза в день в течение 5 дней).
- Они должны быть также как можно раньше вакцинированы обычными гриппозными вакцинами, рекомендованными ВОЗ, во избежание одновременного инфицирования вирусами гриппа человека и птичьего гриппа и сведения к минимуму вероятности реассортации генов.
- Дополнительно должен проводиться мониторинг здоровья убойщиков и других людей, вовлеченных в этот процесс, а также членов их семей.

5. Рекомендуется серологическое наблюдение за контактировавшими работниками и ветеринарами.

6. В тесной связи со специализированными лабораториями от умерших животных должны быть взяты посмертные образцы крови, содержимое кишечника, ротоглоточные мазки, трахея, легкие, тонкий кишечник, селезенка, почки, мозг, печень и сердце для исследования новых вирусных изолятов.

16. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В странах Юго-Восточной Азии распространился высоко патогенный для кур вирус гриппа А (H5N1). Вирус оказался способным инфицировать людей при контакте с больными птицами. Хотя число зарегистрированных случаев инфицирования людей пока невелико, заболевания протекали тяжело и более, чем в 60% случаев закончились летальными исходами. До сих пор не зарегистрировано случаев прямой передачи возбудителя от человека к человеку, но вирус достаточно быстро мутирует.

Учитывая, что на пораженных территориях одновременно могут регистрироваться заболевания, вызванные человеческими эпидемическими вирусами, возможность их реассортации с причьим вирусом в случае коинфекции не исключена, что может привести к возникновению нового возбудителя пандемии.

Это определяет необходимость быстрой ликвидации инфицированного поголовья кур и уток в странах Юго-Восточной Азии. Вакцинация кур в условиях эпидемии оказалась не эффективной из-за чрезвычайно быстрого распространения вируса и выраженного изменения антигенных свойств возбудителя. Выделенные штаммы оказались резистентными к ремантадину. Персонал птицеводческих хозяйств и особенно людей, занятых уничтожением инфицированного поголовья птиц, должен быть защищен средствами индивидуальной защиты. Единственным средством экстренной специфической химиопрофилактики оказался ингибитор вирусной нейраминидазы - озельтамивир (тамифлю), однако вероятность появления резистентных к нему штаммов при широком применении препарата также не может быть исключена. Кроме того, это весьма дорогостоящий препарат. Необходимо изучить чувствительность вирусов к другим разработанным в России противовирусным препаратам (арбидол, дейтифорин).

Хотя в России случаев заболевания кур патогенными вирусами H5N1 или H7N7 до середины 2004 года не зарегистрировано, необходимо усилить ветеринарный надзор за этими инфекциями, особенно на Дальнем Востоке и в Сибири, куда вирус может быть занесен стаями диких птиц, мигрирующих из стран Юго-Восточной Азии. Кроме того, нужно контролировать ситуацию и среди людей, для чего необходимо разработать соответствующие диагностические препараты и методы.

В России должен быть создан резервный запас вакцинных и диагностических штаммов из вирусов – потенциальных возбудителей пандемий, включая H5N1 и H7N7, которые могли бы быть быстро запущены в производство в случае начала пандемии.

Необходимо также создать на базе специализированного института НИИ гриппа РАМН лабораторию, специально оснащенную для безопасной работы с вирусами I – II групп патогенности, основными задачами которой явилось бы выделение вирусов H5N1 на территории России, подготовка вакцинных штаммов с использованием современных научных подходов (генной инженерии и реверс-генетики), проверка чувствительности патогенных вирусов к химиопрепаратам, а также создание новых диагностических тест-систем.
