

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

« 05 » 04 2013 г.

Регистрационный № 012-0213

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО  
ПРОТИВОГРИППОЗНОГО ИММУНИТЕТА**

инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
эпидемиологии и микробиологии»

**Авторы:** Дашкевич А.М.; к.м.н. Гончаров А.Е.; д.м.н., профессор Титов Л.П.

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) представлена схема комплексной оценки поствакцинального противогриппозного иммунитета, включающая оценку переносимости, иммуногенности и эпидемиологической эффективности вакцинации против гриппа.

## **1 Область применения**

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, клинико-диагностических лабораторий инфекционных больниц и диагностических центров, врачей-специалистов иных организаций здравоохранения, осуществляющих оценку поствакцинального иммунитета.

## **2 Показания к применению**

Комплексная оценка поствакцинального противогриппозного иммунитета: оценка переносимости, иммунологической и эпидемиологической эффективности вакцинации.

## **3 Перечень необходимого оборудования, реагентов и расходных материалов**

### **3.1 Оборудование:**

1. ламинарные боксы II класса защиты с бактерицидной лампой;
2. одноканальные и многоканальные автоматические дозаторы разных объемов;
3. центрифуга;
4. холодильник;
5. морозильник;
6. термостат (с рабочей температурой +37°C);
7. водяная баня;
8. проточный цитофлуориметр;

9. мерные колбы для приготовления растворов;
10. емкости для сброса биологического материала.

### **3.2 Расходные материалы:**

1. наконечники пластиковые на 1–5 мл, 0,01–0,1 мл, 0,1–1,0 мл;
2. одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл, 15 мл;
3. пробирки для цитофлуориметра;
4. вакутайнеры с гепарином;
5. пластиковые микротитровальные 96-луночные планшеты.

### **3.3 Реагенты:**

1. Фосфатно-солевой буфер, pH 7,2-7,4;
2. Набор для постановки РТГА (диагностикумы гриппозные сухие);
3. 0,5% суспензия куриных эритроцитов
4. моноклональные антитела к CD3, CD69, ИНФ- $\gamma$ , CD45R0, CD45RA и изотипические контроли, конъюгированные с флуорохромами;
5. антигены вирусов гриппа из вакцин, не содержащих консерванты либо вирусы гриппа;
6. лизирующий раствор (10 $\times$  раствор, 100 мл): хлорид аммония – 8,29; гидрокарбонат калия – 1,0; тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0,37; воды аналитического качества до 100 мл.;
7. фиксирующий раствор (1 $\times$  раствор, 100 мл): параформальдегид – 4,0; фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2; хлорид калия – 0,2; фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9; хлорид натрия – 8,0; воды аналитического качества до 100 мл.;
8. пермеабилзирующий раствор (1 $\times$  раствор, 100 мл): сапонин – 0,3; фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2; хлорид калия – 0,2; фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9; хлорид натрия – 8,0; воды аналитического качества до 100 мл.;

9. DPBS (1× раствор, 1 л): фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2; хлорид калия – 0,2; фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9; хлорид натрия – 8,0; тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0,2; азид натрия – 1,0; воды аналитического качества до 1 л.

Панель антител подбирают таким образом, чтобы антитела к CD69 и ИНФ-γ были конъюгированы с наиболее яркими из доступных флуорохромов: фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), тандемом фикоэритрина и Cy7 (PE-Cy7). Антитела к CD3, CD45R0, CD45RA молекулам могут быть конъюгированы с любым другим флуорохромом, который позволяет четко идентифицировать популяцию этих клеток, и требует минимальной спектральной компенсации (например, CD3 – APC, CD69 – PE, ИНФ-γ – PE; CD3 – APC, ИНФ-γ – PE, CD45RA – FITC, CD45R0 — PE-Cy7). Изотипическое антитело должно быть того же изотипа, что и антитело к ИНФ-γ и конъюгировано с тем же флуорохромом. Для уточнения списка флуорохромов, пригодных для использования, см. инструкцию по эксплуатации проточного цитофлуориметра.

#### 4 Этапы оценки

Комплексная оценка поствакцинального противогриппозного иммунитета состоит из 5 этапов.

**4.1 Первый этап** предусматривает определение популяции (когорты) лиц, среди которых планируется проведение исследований – необходимый объем выборки (в различных возрастных группах).

Расчет объема выборки проводят по формуле:

$$n = \frac{t^2 p(1-p)N}{\Delta^2 N + t^2 p(1-p)}, \text{ где}$$

$t$  – коэффициент, соответствующий выбранному уровню значимости. Если уровень значимости = 0,05 (доверительная вероятность 95%), то значение  $t=1,96$ ; для доверительной вероятности 99% значение коэффициента  $t=2,59$ .

$p$  – доля признака в изучаемой генеральной совокупности. Если доля признака для генеральной совокупности неизвестна, при расчете используют максимальное значение, которое достигается при  $p=0,5$ ; тогда  $0,5(1-05)=0,25$ .

$\Delta$  – величина допустимой ошибки в долях (т.е. приведенная к «1»). Если установить допустимую ошибку равную 3%, то допустимая ошибка в долях будет равна 0,03.

$N$  – объем генеральной совокупности.

Также на данном этапе разрабатывается протокол исследования, в котором отражаются конкретные цели и задачи, описывается методология и дизайн исследования.

**4.2 Второй этап** – осуществляют сбор информации об участниках исследования (пол, возраст, сопутствующая патология, прививочный анамнез в отношении гриппа) – на основании Карты участника исследования (приложение 1), проводят иммунизацию против гриппа.

Сведения о переносимости вакцин получают как в результате наблюдения за участниками исследования, так и путем анкетирования (образец анкеты-опросника – см. приложение 2). Формируется база данных, решается вопрос о создании популяционного регистра. Проводится забор материала для лабораторного исследования.

На протяжении 6-9 месяцев после иммунизации осуществляют медицинское наблюдение за состоянием здоровья участников исследования.

При возникновении у участника исследования симптомов острой респираторной инфекции проводят лабораторное обследование заболевшего с целью подтверждения/исключения заболевания гриппом.

#### **4.2.1. Забор материала, хранение и транспортировка образцов для лабораторного исследования**

**Забор крови для серологического исследования.** Кровь в количестве 0,5-1 мл забирают из вены или из пальца в стерильную центрифужную пробирку с соблюдением всех правил асептики.

**Получение сыворотки крови.** Кровь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до образования сгустка, затем центрифугируют в течение 10 минут при 3000 оборотах. Полученную сыворотку переносят в стерильные микропробирки, на этикетке указывают идентификационный номер. До проведения исследования сыворотка может храниться при температуре -20°C.

**Забор крови для иммунологического исследования.** Кровь в количестве 5 мл забирают из локтевой вены в вакутайнер с гепарином. Закрытый вакутайнер с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

**Забор материала для диагностики гриппа** (назофарингеальный мазок, парные сыворотки крови) и транспортировку образцов проводят в соответствии с требованиями инструкции «Комплексная диагностика гриппа» (№ 121-1210 от 18.01.2011)

**Условия хранения и транспортировки образцов для лабораторного исследования.** Вакутайнеры с кровью доставляют в лабораторию непосредственно в день забора материала. Сыворотка крови до проведения исследования может храниться при температуре -20°C. Транспортировку осуществляют в соответствии с требованиями инструкции «Порядок учета,

хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1-4 групп патогенности» №11-713-2002.

#### **4.3 Третий этап** – лабораторное исследование клинического материала.

Серологические исследования (реакцию торможения гемагглютинации, реакцию микронеutralизации) проводят в соответствии с инструкцией «Комплексная диагностика гриппа» (№ 121-1210 от 18.01.2011).

**Интерпретация результатов РТГА:** титр специфических противогриппозных антител считают равным наибольшему разведению сыворотки, в котором наблюдается полное ингибирование гемагглютинации. Титр антител в РТГА 1:40 и выше свидетельствуют о защищенности индивидуума от соответствующего типа вируса гриппа. Титр 1:20 считается условно-защитным титром.

Иммунологические исследования (определение содержания антигенспецифических Т-лимфоцитов) проводят с использованием проточной цитометрии.

#### **Методика определения антигенспецифических Т-лимфоцитов (АСК):**

##### **1) Активация лимфоцитов периферической крови**

В пробирки на 1,5 мл вносят по 500 мкл крови и добавляют: 1) ФМА (25 нг/мл) и иономицин (1 мкг/мл) в качестве положительного контроля; 2) 100 мкл DPBS в качестве отрицательного контроля; 3) *вирусы гриппа* либо антигены вакцинных вирусов гриппа (по 10 мкг/мл каждого). Доводят содержимое пробирок средой RPMI-1640 до 1 мл и культивируют суспензию 2 часа при температуре 37°C. Через 2 часа в пробирки добавляют монензин (10 мкг/мл) и инкубируют 4 часа при температуре 37°C.

## 2) Пробоподготовка

Для каждой пробы отбирают 8 пробирок для цитофлуориметра. Маркируют пробирки №1–8. В пробирки №1-4 добавляют антитела к CD3 в необходимом количестве (согласно инструкции по применению антител). Затем в пробирки добавляют: №1 – антитело к CD69 и 200 мкл крови, инкубированной с ФМА (контроль активации); №2 – антитела к CD45RA, CD45R0 и 200 мкл крови, инкубированной в присутствии DPBS (отрицательный контроль для оценки спонтанной продукции ИНФ- $\gamma$ , «контрольный образец»); №3 – 200 мкл крови, инкубированной с ФМА (положительный контроль для проверки этапа пробподготовки); №4 – антитела к CD45RA, CD45R0 и 200 мкл крови, инкубированной с пептидами («опытный образец»). Пробирки №5-8 используют для подготовки single stain контроля. В них добавляют: № 5 – антитело к CD3 и 200 мкл крови, инкубированной с ФМА, №6 – антитело к CD45R0 и 200 мкл крови, инкубированной с ФМА, № 7 – антитело к CD45RA и 200 мкл крови, инкубированной с ФМА, № 8 – 200 мкл крови, инкубированной с ФМА.

Тщательно перемешивают пробирки и инкубируют смесь в течение 15 минут при 2–8°C в темноте. Затем эритроциты лизируют в 3 мл лизирующего раствора в течение 15 минут при комнатной температуре в темном месте. Клетки центрифугируют 5 минут при 200 g; супернатант удаляют переворачиванием пробирки. Отмывают клетки в 3 мл DPBS; супернатант удаляют переворачиванием пробирки.

Учитывают результаты экспрессии молекулы CD69 (пробирка №1) на проточном цитофлуориметре. Клетки в пробирках №2–8 фиксируют в течение 10 минут в 500 мкл фиксирующего раствора. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл DPBS; центрифугируют 5 минут при 200 g для осаждения клеток; супернатант удаляют переворачиванием пробирки.



Ресуспендируют клетки в 500 мкл пермеабилизирующего раствора, инкубируют 15 минут, после чего отмывают клетки в 3 мл DPBS.

Для каждой пробы отбирают дополнительно 3 пробирки для цитофлуориметра. Маркируют пробирки №2И, 3И, 4И для постановки изотипического контроля («изотипический контрольный образец»). Разделяют суспензию клеток в пробирках №2–4 на две равные части и переносят их в пробирки №2И, 3И, 4И соответственно.

В пробирки №2–4 и №8 добавляют моноклональное антитело к ИНФ- $\gamma$ , а в пробирки №2И, 3И, 4И – изотипическое антитело и инкубируют 30 минут при 2–8°C. По истечении времени инкубации клетки отмывают от несвязавшихся антител в 2 мл DPBS, ресуспендируют клетки в 300 мкл DPBS и учитывают результаты на проточном цитофлуориметре.

Вначале учитывают контрольный образец (пробирки №2И и №2), затем настраивают компенсацию, используя single stain контроли (пробирки №5–8), далее – образец клеток, активированных ФМА (пробирки №3И и №3), затем – опытный образец (пробирки №4И и №4). На цитограмме CD3/SSC выделяют регион CD3+ лимфоцитов. Создают цитограммы флуоресценции для анализа ИНФ- $\gamma$  в координатах ИНФ- $\gamma$ / CD45RA, CD45R0/ИНФ- $\gamma$  и, анализируя пробирку с изотипическим контрольным образцом (пробирка с литерой «И»), отмечают уровень фоновой флуоресценции. Затем анализируя пробирку с клетками, инкубированными с антителами к ИНФ- $\gamma$ , CD45RA, CD45R0 регистрируют относительное число клеток, содержащих ИНФ- $\gamma$ , а также клетки с коэкспрессией CD45R0/ИНФ- $\gamma$ , CD45RA/ИНФ- $\gamma$ .

Алгоритм проведения этапов пробоподготовки также представлен на рисунке 1.

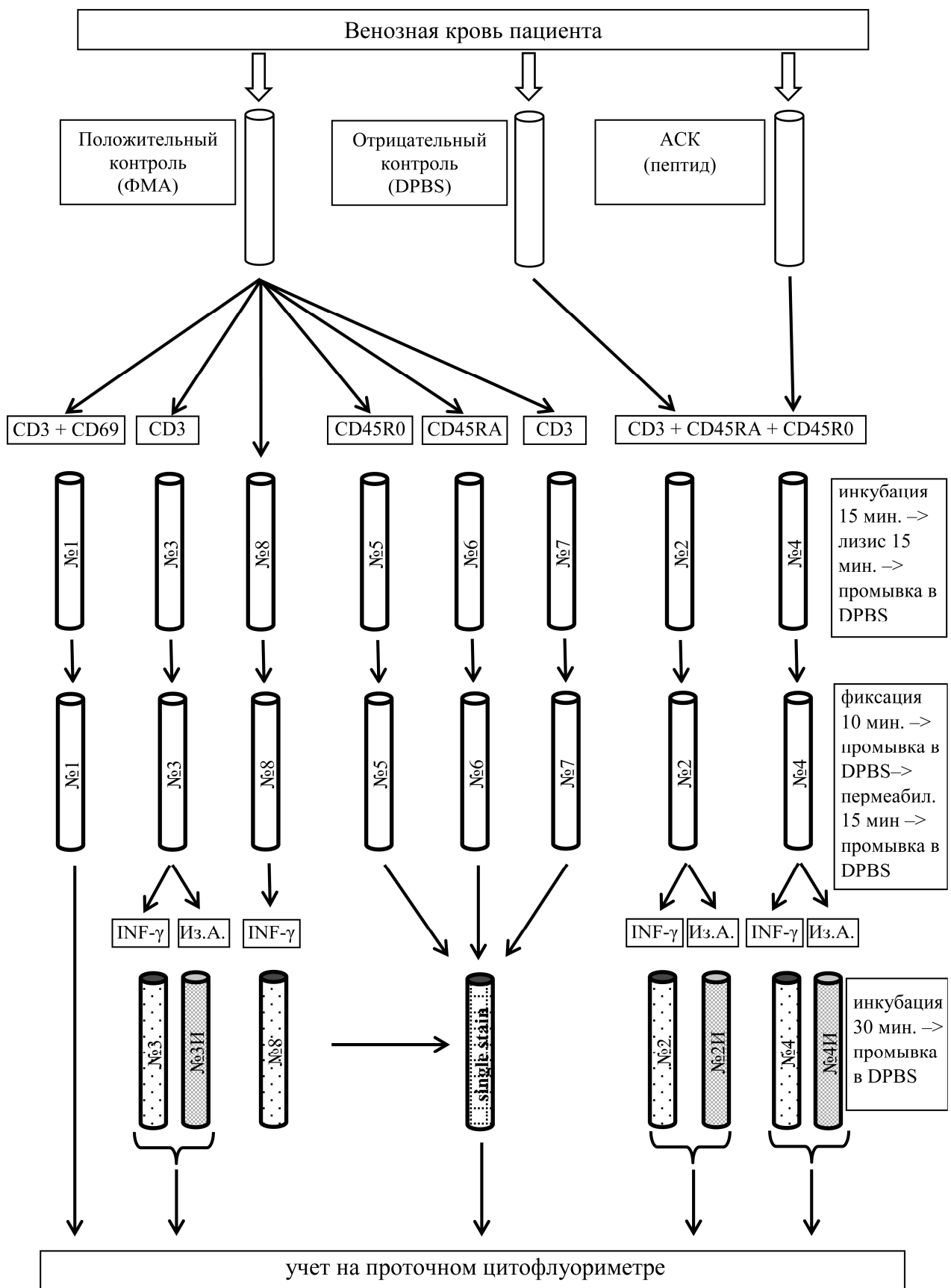


Рисунок 1 – Алгоритм проведения этапов пробоподготовки

### **3) Анализ полученных данных**

Вначале анализируют относительное число активированных ФМА клеток (контроль активации). Экспрессия молекулы CD69 на активированных ФМА и иономицином CD3+ Т-лимфоцитах должна составлять более 80%. В случае, если экспрессия молекулы составляет менее 80%, эксперимент повторяют с этапа 2).

Анализируют число Т-клеток, продуцирующих ИНФ- $\gamma$  при сокультивировании с ФМА (положительный контроль). Число ИНФ- $\gamma$ + Т-лимфоцитов должно составлять более 5%. Если данный показатель оказывается ниже 5%, эксперимент рекомендуется повторить с этапа 2).

Для расчета АСК, от числа Т-лимфоцитов, продуцирующих ИНФ- $\gamma$  под действием вирусов гриппа (опытный образец), вычитают число Т-лимфоцитов, спонтанно продуцирующих ИНФ- $\gamma$  (контрольный образец). Таким образом, расчет числа АСК проводят по следующей формуле:

$АСК = (N_{\#4} - N_{\#4И}) - (N_{\#2} - N_{\#2И})$ , где  $N_{\#x}$  – число CD3+ИНФ- $\gamma$ + клеток в пробирке  $N_{\#x}$ .

С целью анализа динамики иммунного ответа регистрируют число АСК до вакцинации и через  $28 \pm 7$  дней после иммунизации.

Прирост числа АСК рассчитывают по формуле: прирост АСК =  $АСК \text{ после вакцинации} - АСК \text{ до вакцинации} / АСК \text{ до вакцинации} \times 100\%$

Прирост числа АСК от 0 до 20% расценивают как слабый, 30–50% – умеренный,  $> 50\%$  – значительный.

У молодых лиц выявляют клетки памяти с фенотипом CD45RA, а у пожилых лиц – CD45R0 (Lisa A. Wagar, Beth Gentleman, Hanspeter Pircher et al., 2011).

### **4) Перечень возможных ошибок при выполнении метода оценки АСК и пути их устранения**

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие активации клеток	Неправильные условия хранения веществ	Правильно готовить и хранить растворы
	Неподходящий антикоагулянт	Использовать только гепарин (цитрат натрия, ЭДТА не используют)
	Неподходящие условия культивирования	Тщательно соблюдать режим инкубации
Слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций	Низкая концентрация антител	Подобрать достаточную концентрацию
	Клетки не отмыты после этапа пермеабиллизации	Тщательно отмывать клетки в DPBS
	Непригодные растворы	Правильно готовить растворы, соблюдать условия хранения.
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму
	«Тусклые» флуорохромы	Использовать более яркие флуорохромы (PE, APC, PE-Cy7)
	Плохое смешивание антител с пробой	Тщательно смешивать антитела с клетками
Высокая фоновая флуоресценция	Отсутствие отмывки клеток после этапа фиксации	Тщательно отмывать клетки в DPBS
	Отсутствие отмывки антител	
	Чрезмерно длительная фиксация и пермеабиллизация	Следить за временем инкубации
	Наличие свободных флуорохромов в растворах антител	Использовать другие антитела
	Чрезмерная концентрация изотипического антитела	Подобрать концентрацию антитела
Чрезмерные потери клеток	Недостаточное время центрифугирования	Следить за временем центрифугирования
	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Следовать пунктам инструкции
	Адгезия клеток	Работать с охлажденными растворами
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Правильно готовить и хранить раствор
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на вортексе

**4.4 Четвертый этап** предусматривает использование методов статистической обработки полученной информации. В первую очередь, дают

демографическую оценку изучаемой популяции, проводят анализ состояния здоровья и прививочного анамнеза участников исследования. На основании данных анкетирования оценивают реактогенность применяемых вакцинных препаратов.

Для оценки иммунологической эффективности вакцин используют следующие критерии:

- серопротекция (процент лиц с защитными титрами специфических антител (1:40 и выше);
- сероконверсия (число диагностических приростов титров антител (в 4 и более раза) по сравнению с фоновой сывороткой);
- кратность нарастания среднегеометрических титров антител.

**Определение среднегеометрических титров антител (СГТ).** Титр антител в РТГА менее 1:10 принимают равным 1:5. Для определения СГТ титры антител переводят в логарифмы с основанием 2, суммируют и делят на число сывороток с антителами. Значения логарифмов с основанием 2 представлены в таблице.

Титр антител	Значение $\log_2$
1:5	2,321928
1:10	3,321928
1:20	4,321928
1:40	5,321928
1:80	6,321928
1:160	7,321928
1:320	8,321928
1:640	9,321928
1:1280	10,321928

Образец расчета СГТ: из 20 исследованных сывороток 3 имели титр 1:5; 2 – титр 1:20; 8 - титр 1:40; 6 - титр 1:80 и 1 - титр 1:160. Переведя

абсолютные значения титров в логарифмы с основанием 2, получим следующую величину средней геометрической титра антител:

$$\frac{3 \times 2,321928 + 2 \times 4,321928 + 8 \times 5,321928 + 6 \times 6,321928 + 1 \times 7,321928}{20} = \frac{103,4386}{20} = 5,17$$

### **Оценка эпидемиологической эффективности вакцинации.**

Для оценки эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики используют коэффициент эпидемиологической эффективности (коэффициент защищенности) и индекс эффективности, которые рассчитывают по следующим формулам:

Коэффициент эпидемиологической эффективности (Е) – показывает, на сколько процентов заболеваемость привитых ниже заболеваемости непривитых:

$$E = 100(b-a / b (\%)),$$

Индекс эпидемиологической эффективности (К) – величина, показывающая, во сколько раз заболеваемость привитых ниже заболеваемости непривитых:

$$K = b/a, \text{ где}$$

a - заболеваемость среди лиц, иммунизированных против гриппа;

b - заболеваемость среди лиц, не иммунизированных против гриппа.

**4.5 Пятый этап** – формирование заключения о реактогенности, иммунологической и эпидемиологической эффективности применяемых противогриппозных вакцин, состоянии популяционного противогриппозного иммунитета.

Схема комплексной оценки представлена также на рисунке 2.

**1 этап (подготовительный)**

- выбор изучаемой популяции;
- разработка протокола исследования,

**2 этап**

- получение информации об участниках исследования;
  - формирование базы данных;
  - создание популяционного регистра;
- взятие материала для лабораторного исследования;
- наблюдение за состоянием здоровья участников исследования (при возникновении симптомов ОРИ – организация лабораторного обследования)

**3 этап**

- проведение лабораторного исследования материала:
  - серологические исследования,
  - иммунологические исследования,
  - молекулярно-биологические исследования

**4 этап**

- статистическая обработка данных и их оценка;
- демографическая характеристика изучаемой популяции;
- анализ состояния здоровья изучаемой популяции;
- анализ прививочного анамнеза изучаемой популяции;
- оценка безопасности применяемых микробиологических препаратов

**5 этап**

Подготовка заключения по проведенным исследованиям

Рисунок 2 – Схема комплексной оценки поствакцинального противогриппозного

## Карта участника исследования

ФИО \_\_\_\_\_

Дата рождения \_\_\_\_\_ Возраст \_\_\_\_\_ Пол \_\_\_\_\_

Контактный телефон \_\_\_\_\_

Домашний адрес \_\_\_\_\_

Поликлиника по месту жительства \_\_\_\_\_

Место работы \_\_\_\_\_

Сопутствующие заболевания:

- Острая и хроническая патология сердечно-сосудистой системы
- Острая и хроническая патология дыхательной системы
- Острая и хроническая патология пищеварительной системы
- Острая и хроническая патология эндокринной системы
- Острая и хроническая патология мочеполовой системы
- Острая и хроническая патология нервной системы
- Иммунодефицитные состояния, в т.ч. ВИЧ-инфицированные
- Другая острая и хроническая патология

Вакцинация против гриппа в предэпидемический период 20\_\_/20\_\_ г.:

 нет  да Название вакцины \_\_\_\_\_ Дата вакцинации \_\_\_\_\_

Оценка переносимости вакцины (в течение 5 дней после прививки):

- местные и общие реакции не отмечались;
- местные реакции:  болезненность в месте прививки; длительность \_\_\_\_ дней
  - покраснение в месте прививки; длительность \_\_\_\_ дней
  - припухлость в месте прививки; длительность \_\_\_\_ дней
- общие реакции:
  - повышение температуры тела до 37,5°C; длительность \_\_\_\_ дней
  - повышение температуры тела до 38,5°C; длительность \_\_\_\_ дней
  - повышение температуры тела выше 38,6°C; длительность \_\_\_\_ дней
  - общее недомогание; длительность \_\_\_\_ дней
  - катаральные явления; длительность \_\_\_\_ дней
  - головная боль; длительность \_\_\_\_ дней



Даты забора крови для лабораторного исследования: \_\_\_\_\_

Прием средств неспецифической профилактики (в период с октября \_\_\_\_ г. по март \_\_\_\_ г.):  *нет*  *да*

Сведения о респираторной заболеваемости (в течение 9 мес. после вакцинации) *указать даты болезни по листкам нетрудоспособности:*

ОРВИ \_\_\_\_\_

грипп \_\_\_\_\_

бронхит \_\_\_\_\_

пневмония \_\_\_\_\_

Прочее (тонзиллит, фарингит и т.д.) \_\_\_\_\_

Результаты лабораторного исследования: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Медицинский работник, заполнивший карту \_\_\_\_\_

Анкета-опросник  
по вакцинации против гриппа

1.

Возраст _____	Пол М      Ж	№ Вашей поликлиники _____	Тел. для связи (по желанию) _____	Дата заполнения анкеты ____/____/20__
------------------	-----------------	---------------------------------	---	---

2. Прививались ли Вы против гриппа в 20\_\_\_\_ году?

нет  да

3. Отмечались ли у Вас в течение 5 дней после вакцинации следующие симптомы:

болезненность в месте прививки, длительность \_\_\_\_ дней

покраснение в месте прививки, длительность \_\_\_\_ дней

припухлость в месте прививки, длительность \_\_\_\_ дней

повышение температуры тела до \_\_\_\_ °С (*указать*), длительность \_\_\_\_ дней

головная боль, длительность \_\_\_\_ дней

общее недомогание, длительность \_\_\_\_ дней

насморк, длительность \_\_\_\_ дней

кашель, длительность \_\_\_\_ дней

боли в суставах и мышцах, длительность \_\_\_\_ дней

другое (*указать*) \_\_\_\_\_

4. Применяли ли Вы лекарственные препараты в связи с нежелательными явлениями после прививки?

нет  да

5. Сколько лет подряд Вы прививаетесь против гриппа?

сделал(а) прививку впервые

2 года

3 года

4 года

5 и более лет

не помню