

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей
и благополучия человека
Г.Г.Онищенко
18 апреля 2006 года
№ 0100/4434-06-34

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА И ДРУГИХ ОРВИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

АННОТАЦИЯ

Иммунофлуоресцентный метод детекции вирусных антигенов является высоко чувствительным тестом быстрой дифференциальной диагностики респираторных вирусных инфекций. Он рекомендуется для обследования больных на ранних (первые 3 дня) стадиях инфекции в целях своевременного назначения специфической противовирусной терапии и проведения соответствующих профилактических мероприятий и широко используется в системе лабораторного надзора за гриппом в России и других странах мира. Результативность метода зависит от качества исследуемых клинических образцов, соблюдения условий их доставки в лабораторию и последующего процессинга, а также от качества используемой иммунореагентики.

Предназначен для вирусологов, микробиологов, эпидемиологов. Его применение позволяет поставить диагноз в течение 1-2 часов после получения клинических материалов с охватом широкого круга наиболее значимых возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (вирусы гриппа А различных субтипов, гриппа В, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирусы, вирусы парагриппа 1-3 типов, коронавирусы и вирусы герпеса). Метод открывает возможности быстрого распознавания природы эпидемических вспышек и регистрации появления в циркуляции новых субтипов вируса гриппа А.

Методические рекомендации подготовлены специалистами ГУ НИИ гриппа РАМН - профессором, д.м.н.А.А.Сомининой, к.м.н.К.К.Милькинт, И.В.Амосовой, В.Г.Майоровой, Т.Р.Царевой, Е.В.Сорокиным.

1. ВВЕДЕНИЕ

Метод иммунофлуоресцентного анализа (МИФ) позволяет идентифицировать антигены вирусов гриппа и других возбудителей ОРВИ в инфицированных клетках непосредственно *in situ* по их характерной локализации, выявляемой в результате взаимодействия вирусных антигенов противовирусными антителами, маркированными флуоресцеинизотиоцианатом.

МИФ является высоко чувствительным и специфичным качественным иммунодиагностическим тестом. К числу преимуществ метода относится его исключительная простота и возможность быстрого (за 1-2 часа) анализа клинических материалов с распознаванием широкого круга возбудителей, включая вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы, аденовирусы, вирусы герпеса.

В последние годы МИФ получил широкое применение в практике здравоохранения (ФГУЗ "Центры гигиены и эпидемиологии" в субъектах Российской Федерации, инфекционные стационары, акушерско-гинекологические и офтальмологические отделения). Применение МИФ позволяет осуществить назначение специфической этиотропной терапии, отменить неэффективное при неосложненных формах ОРВИ использование антибиотиков, предотвратить распространение внутрибольничных инфекций за счет введения соответствующих превентивных мероприятий.

Этот метод наиболее эффективен в острой фазе (первые 3 дня) заболевания, когда внутриклеточное содержание вирусных антигенов бывает наиболее высоким. Его результативность существенно зависит также от соблюдения

методических условий получения клинических материалов, сроков и температурных условий их доставки в лабораторию, качества используемых реагентов, а также компетентности специалистов, ответственных за интерпретацию результатов.

МИФ приобрел особую ценность при изучении заболеваний неизвестной этиологии и сыграл большую роль при идентификации новых агентов вирусной природы.

Использование метода в практике лабораторного надзора за гриппом и ОРВИ на территории России показало, что по результатам МФА можно четко распознавать этиологическую природу заболеваемости на отдельных территориях, что важно при определении начала активной циркуляции вирусов гриппа и природы эпидемии (до того как будут выделены первые вирусы). Метод незаменим в тех случаях, когда изоляция вирусов в практических вирусологических лабораториях не проводится.

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

2.1. Формула метода

Суть метода заключается в специфической индикации вирусных антигенов непосредственно в клинических материалах от больных ОРВИ с помощью специфических антител, меченных флуорохромом (например, флуоресцеин изотиоцианатом - ФИТЦ). Образующийся при этом комплекс антиген-антитело обнаруживается по характерной ярко-зеленой флуоресценции в сине-фиолетовых лучах люминесцентного микроскопа. Специфичность этого иммунологического метода сочетается с высокой чувствительностью люминесцентного анализа.

Предложены и в медицинской практике применяются несколько вариантов МИФ. При использовании прямого варианта материалы от больных окрашивают непосредственно противовирусными антителами, маркированными ФИТЦ. Этот метод получил наибольшее распространение в России.

Непрямой метод предполагает проведение анализа в две стадии, на первой из которых препараты обрабатывают намеченными противовирусными антителами, после чего сформированные комплексы антиген-антитело выявляют с помощью ФИТЦ-конъюгатов антивидовых антител.

За рубежом МИФ также широко используется для индикации вирусных антигенов в клеточных культурах, инфицированных материалами от больных, однако, при этом время проведения анализа удлиняется на 24-48 часов.

2.2. Показания и противопоказания к применению метода

Широкое использование МИФ в клинко-эпидемиологической практике обусловлено необходимостью решения ряда важных задач здравоохранения, в том числе:

- в клинических условиях - для раннего назначения специфических средств этиотропной противовирусной терапии, прогнозирования тяжести развития заболевания в зависимости от его этиологии, исключения использования антибиотиков при неосложненных формах ОРВИ, а также для рационального размещения больных (по этиологическому принципу) в инфекционных отделениях больниц во избежание перекрестного внутрибольничного инфицирования.

- в эпидемиологической практике МИФ используют для быстрой расшифровки природы эпидемических вспышек в целях проведения соответствующих профилактических и лечебных мероприятий, в том числе в детских коллективах, в воинских подразделениях, а также для надзора за гриппом и ОРВИ в сети базовых вирусологических лабораторий Федерального центра по гриппу и ОРВИ.

- Показаниями к применению метода являются также рост заболеваемости ОРВИ на отдельных территориях, развитие внутрибольничных инфекций, регистрация вспышек гриппа среди птиц с незамедлительным обследованием контактных лиц из групп повышенного риска инфицирования в случае появления у них симптомов ОРВИ по всему спектру респираторных вирусов.

Противопоказания к использованию метода отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материалов не может быть осуществлен по медицинским соображениям (склонность пациента к носовым кровотечениям, искривление носовых перегородок).

2.3. Материально-техническое обеспечение

Для выполнения работ по быстрой диагностике ОРВИ необходимо иметь следующие материалы и оборудование.

Иммунореагенты.

Иммуноглобулины флуоресцирующие диагностические для детекции прямым МИФ антигенов вирусов гриппа типа А (всех субтипов в совокупности), а также для дифференцированного выявления субтипов вируса гриппа А(Н1N1), А(Н3N2), А(Н5N1), вируса гриппа В, для детекции общих для семейства аденовирусов гексонных антигенов, выявления антигенов респираторно-синцитиального вируса и дифференцированного определения антигенов вирусов парагриппа 1, 2 и 3 типов (выпускаются в России ООО "Предприятие по производству диагностических препаратов", Санкт Петербург, за рубежом - фирмой Dako, Дания). Наборы реагентов для непрямой детекции антигенов респираторных вирусов в клеточных культурах, инфицированных материалами от больных, выпускаются в настоящее время только за рубежом (например, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA).

Материалы.

Сухие стерильные тампоны, пробирки, марлевые салфетки, пинцет, обезжиренные предметные и покровные стекла, лейкопластырь, кюветы для предметных стекол, микропипетки, стеклянный сосуд для фиксации мазков, мерные пипетки, фильтровальная бумага, влажная камера для окраски препаратов, сосуд для промывания, а также защитная одежда для персонала (халаты, маски, колпаки, резиновые перчатки, дезрастворы).

Растворы.

Фосфатно-солевой буферный раствор 0,01 моль/л, рН 7,2-7,4(ФСБ), нефлуоресцирующее иммерсионное масло (диметилфталат), дистиллированная вода, ацетон безводный химически чистый, этиловый спирт.

Оборудование.

Люминесцентный микроскоп, ламинарный бокс, рН-метр, весы, лабораторная центрифуга (до 2000 об/мин), термостат (+37°C), холодильник (+4°C) с замораживающей камерой (- 20 °C), автоматическая пипетка с переменным объемом 5-50 мкл, наконечники для автоматических пипеток, пипетки мерные 10,0 мл, 5,0 мл и 1,0 мл.

2.4. Описание метода

Использование МИФ для прямого обнаружения вирусных антигенов в материалах от больных.

Приготовление препаратов для иммунофлуоресцентной микроскопии.

В качестве материала для исследования служат препараты, содержащие цилиндрический эпителий слизистой оболочки носовой полости, в которых в первые три дня заболевания регулярно обнаруживается присутствие вируса, послужившего причиной респираторного заболевания. На более поздних сроках вирус элиминирует из клеток в секреты дыхательных путей, что снижает результативность МИФ диагностики.

Получение клинических материалов.

Важнейшим этапом исследования является получение полноценного материала, в котором содержалось бы достаточно много эпителиальных клеток, которые выстилают глубокие отделы нижних носовых ходов и служат местом репликации вирусов. Эти клетки имеют цилиндрическую, бокаловидную или округлую форму, иногда снабжены

ресничками. Они должны иметь четкую структуру с ядром и окружающей его сравнительно небольшой по размеру цитоплазмой.

Необходимо отметить, что ближайшие ко входу отделы носовой полости выстланы плоским или переходным эпителием полигональной формы с мелким ядром и обширной цитоплазмой. Респираторные вирусы не размножаются в этих клетках. Вот почему при получении мазков необходимо вводить тампоны глубоко в нижние носовые ходы.

Процедуры взятия мазков сводится к следующему. Если материал берется у маленьких детей, во избежание повреждения слизистой при резких движениях ребенка нужна помощь ассистента, который усаживает его к себе на колени, одной рукой прижимает руки ребенка, а другой рукой - голову. Детей старше 7 лет и взрослых больных усаживают в положение с приподнятым носом. При обильном слизистом или слизисто-серозном отделяемом необходимо очистить полость носа сухим ватным тампоном. При обильных гнойных выделениях проводят наиболее тщательную очистку носовых ходов, без чего материал для исследования забирать не следует, поскольку обилие детрита и неспецифически светящихся лейкоцитов не позволит провести ИФ анализ. Сухой тонкий тампон вводят в нижний носовой ход как можно глубже (взрослым и школьникам - на глубину до 3 см, детям более младшего возраста - на 1,5-2 см). Вращательным движением с небольшим прижатием тампона к стенкам носа снимают со слизистой эпителиальные клетки. Процедуру повторяют другим ватным тампоном со вторым носовым ходом.

При конъюнктивитах и кератоконъюнктивитах вирусной природы материалом для исследования служат мазки-соскобы с конъюнктивы, которые обрабатывают так же, как и мазки из носа, и исследуют клетки на присутствие аденовирусных и герпетических антигенов.

Транспортировка и хранение клинических материалов

Тампоны со снятыми клетками немедленно погружают в пробирку с 2 мл 0.01 М ФСБ. Клинические материалы как можно быстрее (не более чем за 2 часа) доставляют в лабораторию в охлажденном состоянии (замораживание должно быть исключено).

Хранить пробирки с материалом более 2 ч не рекомендуется, так как при этом происходит разрушение эпителиальных клеток и выход вируса в среду, что снижает результативность анализа. При необходимости приостановку работы можно сделать только после приготовления фиксированных мазков. Всю работу с инфекционным материалом проводят в ламинарном боксе с соблюдением соответствующих правил биобезопасности.

Приготовление мазков

Для получения клеточной суспензии пробирку с тампонами интенсивно встряхивают, после чего тампоны наполовину извлекают, отжимают пинцетом о стенку пробирки и удаляют. Отработанные тампоны погружают в дезинфицирующий раствор. Полученную клеточную суспензию центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин (не более 500 g - во избежание травматизации клеток), после чего надосадочную жидкость удаляют. Осадок клеток ресуспендируют пипеткой в 0,2 мл ФСБ. Из суспензии клеток на обезжиренных спиртом предметных стеклах готовят мазки. Число мазков (обычно 10-12) должно соответствовать количеству тестируемых антигенов. На каждое стекло наносят капли (по 20 мкл) полученной суспензии, располагая их в два ряда в шахматном порядке. Капли не должны растекаться или сливаться, для чего используют предметные стекла с углублениями. При их отсутствии на стекле с помощью тонко заточенного победитового сверла или шлифовального приспособления предварительно делают ограничительные кольца диаметром 6-7 мм.

Стекла с мазками быстро высушивают (желательно - в ламинарном боксе) и сразу погружают на 10 мин в химически чистый, безводный, заранее охлажденный при 4°C, ацетон - для фиксации. Стекла с фиксированными мазками извлекают пинцетом из ацетона, маркируют, после чего подвергают окрашиванию флуоресцирующими антивирусными иммуноглобулинами.

Фиксированные препараты могут храниться до окрашивания в холодильнике при 4°C достаточно продолжительное время (до 3-4 месяцев).

Исследование клеточных культур, инфицированных материалами от больных

Флуоресцирующие антитела могут быть применены также для детекции вирусных антигенов в клеточных культурах, инфицированных материалами от больных, при одновременном использовании контрольных, не зараженных культур

той же партии. В этом случае все процедуры по взятию клинических материалов и заражению клеточных культур выполняют, как описано в Методических рекомендациях "Выделение вирусов гриппа человека и птиц в клеточных культурах и куриных эмбрионах", Санкт-Петербург, 2006. После соответствующей инкубации (48 час.) или появлении признаков ЦПД (более 25% монослоя) клетки из инфицированных и контрольных флаконов снимают с поверхности пенициллиновых флаконов (ПФ) смесью трипсина с версеном и из полученной суспензии готовят мазки для исследования.

Более детально эти процедуры сводятся к следующему:

- Среду из каждого ПФ с подлежащими исследованию клетками, инфицированными материалами от больных, отсасывают пипеткой, переносят в отдельные пробирки, маркируют каждую из них, после чего вируссодержащую среду замораживают и хранят при температуре от -20°C до -70°C до завершения всех исследований.

- Клеточный монослой инфицированных и контрольных клеточных культур трижды ополаскивают по 1-2 мл ФСБ.

- В каждый ПФ добавляют по 100 мкл смеси растворов 0,05% трипсина и 0,53 мМ версена (ЭДТА·4Na).

- Осторожно постукивают по ПФ до отторжения клеток.

- После сползания монослоя в каждый ПФ добавляют по 1 мл ФСБ. Центрифугируют клеточные суспензии при 500 g в течение 10 мин в конических пробирках.

- Осадок ресуспендируют в 0,2 мл ФСБ.

- Клеточную суспензию наносят на обработанные ацетоном стекла (из расчета по 20 мкл каждой в 10 очерченных кружков). На отдельном стекле аналогичным образом готовят препараты из контрольных (не инфицированных) клеток. Мазки высушивают в ламинарном боксе.

- Препараты фиксируют в охлажденном ацетоне в течение 10 мин. Дают им высохнуть. Полученные слайды могут храниться в течение нескольких месяцев при температуре - 20° С.

Приготовление рабочих растворов флуоресцирующих иммуноглобулинов

Сухой флуоресцирующий иммуноглобулин (конъюгат) растворяют в дистиллированной воде в соответствии с указанным на этикетке объемом, при необходимости (наличие посторонних примесей) центрифугируют 15 минут при 2000 об/мин для удаления осадка. Растворенный конъюгат можно хранить в течение 20 дней при 4°C. При необходимости более длительного хранения конъюгат фасуют по 0,1 мл и хранят в замороженном состоянии при температуре не выше -20°C. Повторное замораживание-оттаивание не рекомендуется. Непосредственно перед употреблением конъюгат разводят ФСБ для получения указанного на этикетке рабочего разведения. Конъюгат в рабочем разведении хранят не более 7 дней.

Окраска препаратов флуоресцирующими иммуноглобулинами

Фиксированные препараты помещают во влажную камеру (специальную или чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне). На каждый мазок (в заранее определенном порядке) наносят по 1 капле (25-50 мкл) флуоресцирующего иммуноглобулина в рабочем разведении. Препараты помещают во влажную камеру в строго горизонтальном положении и инкубируют в течение 30 мин при 37°C или 40 мин при комнатной температуре (в темном месте). Следят за тем, чтобы не происходило подсыхания препарата, поскольку это ведет к развитию неспецифических реакций. По завершении периода инкубации препараты быстро ополаскивают дистиллированной водой и сразу погружают в ФСБ на 10 минут для промывания при периодическом покачивании емкости. Раствор ФСБ заменяют дважды, после чего препараты ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

Учет и интерпретация результатов

Анализ препаратов проводят с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-2 (или иного типа) с использованием иммерсионного объектива (x 90), сине-фиолетовых светофильтров возбуждения (СФ-1-2, СЗС-7-2) и запирающего

светофильтра N 2. При этом следует пользоваться только специальным нефлуоресцирующим иммерсионным маслом или его заменителями (диметилфталат).

При люминесцентной микроскопии в мазках выявляются эпителиальные клетки различной морфологии, а также могут присутствовать лейкоциты, клеточный детрит, слизь. Диагностически значимым является обнаружение вирусных антигенов только в клетках цилиндрического эпителия (удлиненные или округлые клетки с относительно крупным базально расположенным ядром) проявляющееся в виде четкой диффузной или гранулярной флуоресценции, локализованной в ядрах или цитоплазме клеток. Свечение в клетках, полученных непосредственно от больных, чаще определяется в цитоплазме, хотя при гриппе и аденовирусной инфекции можно видеть специфическую флуоресценцию и в ядрах клеток. Диагностически доказательным является обнаружение в мазке не менее 3 клеток цилиндрического эпителия с отчетливо видимой зеленой специфической флуоресценцией.

При люминесцентной микроскопии препаратов клеточных культур, зараженных вирусом, наблюдаемая картина может варьировать в зависимости от заражающей дозы, типа вируса и сроков его репродукции. При гриппозной и аденовирусной инфекции антигены могут быть обнаружены в цитоплазме и в ядрах клеток. В этом случае наблюдается локальное свечение в ядерных структурах или флуоресцирует вся клетка, если антиген располагается одновременно в ядре и цитоплазме. При парагриппозной и респираторно-синцитиальной вирусной инфекции антигены обнаруживаются только в цитоплазме клеток. Препараты неинфицированных клеточных культур не должны окрашиваться флуоресцирующими антителами. В них может наблюдаться лишь еле заметная аутофлуоресценция.

3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

В ряду других иммунодиагностических тестов, предназначенных для ранней дифференциальной диагностики ОРВИ, метод иммунофлуоресценции обладает рядом преимуществ, таких как кратковременность анализа (1-2 часа), невысокая стоимость, простота исполнения, возможность проведения дифференциальной диагностики на всю группу наиболее значимых возбудителей респираторных инфекций. Высокая чувствительность и специфичность метода, в наибольшей мере реализуемая при использовании препаратов на основе моноклональных антител, определяют важность практического применения метода в здравоохранении. Метод хорошо зарекомендовал себя в надзоре за гриппом, широко используется в инфекционных стационарах и в глазных клиниках, а также в научных исследованиях, связанных с изучением патогенеза заболеваний.

Текст документа сверен по:
рассылка