

Новые подходы в лабораторной диагностике гриппа

ГУНИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск

Показано, что сочетание метода выделения вируса гриппа на культуре клеток МДСК и иммунологических методов (иммунофлуоресцентного и/или иммунохроматографического) экспресс-метода позволяет сократить срок выявления репродукции вируса гриппа на культуре клеток МДСК с 72 до 24 часов. Отработана схема иммунизации лабораторных животных, позволяющая получать специфические поликлональные противогриппозные иммунные сыворотки.

Ключевые слова: выделение вирусов гриппа, метод иммунофлуоресценции, иммунохроматографический метод, МДСК, иммунные сыворотки.

Для лабораторной диагностики гриппа используются вирусологические, серологические, иммунологические и молекулярно-биологические методы (ПЦР).

Традиционно в амбулаторно-поликлинических условиях для диагностики гриппа используют иммунологические методы, в частности, метод флуоресцирующих антител (МФА). В качестве клинического материала обычно используют назофарингеальные мазки, полученные от больных с симптомами гриппа, так же мазки-отпечатки секционного материала. Антиген вируса гриппа, содержащийся в эпителиальных клетках, обнаруживается с помощью специфических антител, связанных с флуоресцентной меткой при микроскопии препарата. Метод отличается простотой проведения и возможностью получить результат в течение 1-2 часов, однако чувствительность его во многом зависит от качества забора материала [7].

Новым направлением в разработке методов быстрой диагностики является создание экспрессных тестов, основанных на методе иммунохроматографии. Для его проведения используют сорбированные на подложке антитела к вирусному антигену, связанные с ферментом. Во время инкубации вирус взаимодействует с конъюгатом, и эта смесь, продвигаясь по хроматографической мембране, достигает места расположения моноклональных антител, специфичных выявляемому вирусу. В случае положительного результата происходит специфическое связывание с антителом, что приводит к изменению окраски индикатора. [3]. Различные коммерческие иммунохроматографические тест-системы позволяют диагностировать грипп и/или дифференцировать тип вируса. [4]. Проведение этого метода занимает в среднем 10-30 минут. Метод прост, не требует для исполнения специально обученного персонала и может быть использован для диагностики в полевых условиях и у «постели больного».

Серологические методы, такие как реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция нейтрализации (РН), иммуноферментный анализ (ИФА) позволяют определять наличие антител к вирусу гриппа в сыворотке крови больных. Однако они имеют ограниченное применение для диагностики гриппа, т.к. не могут быть использованы для диагностики гриппа на ранних стадиях заболевания. Это связано с тем, что противогриппозные антитела появляются в крови через две недели после инфицирования, а к этому времени больные, как правило, уже выздоравливают и лабораторная верификация инфекционного агента становится мало актуальной для заболевшего [5]. Основное значение серологических методов - это ретроспективная диагностика гриппа, что позволяет косвенно определить спектр циркулирующих в человеческой популяции вирусов гриппа. Так же широко применяют-

ся серологические методы и для оценки поствакцинального иммунного ответа [5].

Методы молекулярной биологии позволяют быстро и с высокой степенью достоверности проводить не только индикацию, но и субтипирование (идентификацию) вирусов гриппа. Совершенствование метода ПЦР диагностики привело к созданию технологии постановки ПЦР в режиме реального времени, что значительно повысило чувствительность метода и сократило время получения результата до нескольких часов, по сравнению с классической ПЦР, для постановки которой требовалось до 48 часов. Метод позволяет определять малые и сверхмалые количества РНК вируса, проводить дифференцировку между типами вируса [3].

Вирусологические методы позволяют выделить вирус гриппа от больного, что делает возможным изучать биологические свойства вируса. Эта информация является важной для сопоставления циркулирующих эпидемических штаммов вируса гриппа и эталонных штаммов, для разработки рекомендаций относительно лечения и химиопрофилактики гриппа, а так же для определения состава противогриппозной вакцины на предстоящий эпидемический сезон. Выделение вирусов гриппа проводится на развивающихся 10-12 дневных куриных эмбрионах или на чувствительной культуре клеток

Несомненно, ценность диагностических тестов определяется их чувствительностью и временем, затрачиваемым на получение результата. Исходя из этого, задачей нашего исследования стало усовершенствование методов выявления вируса гриппа на культуре клеток МДСК с целью уменьшения сроков обнаружения вирусной репродукции.

Материалы и методы

В работе были использованы эпидемические штаммы вирусов гриппа, выделенные на территории Республики Беларусь в 2007-2008гг.

Культуру клеток МДСК выращивали на покровных стеклах, инфицировали вирусом гриппа и инкубировали в условиях термостата при 37°C [1]. Каждая серия опытов включала шесть повторов. Контролем качества культуры МДСК служили флакон клеточного контроля без смены среды и флакон клеточного контроля со сменой среды. Инфицирующая доза вирусов гриппа, использованных для исследования, составляла 0,01 – 0,001 IgТЦИД50/ 0,2мл. Через 24 и 48 часов после инфицирования клеточный монослой фиксировали и окрашивали флуоресцирующими антителами к вирусу гриппа типов А и В с последующей микроскопией на флуоресцирующем микроскопе Nicon (Япония). В работе использовали флуоресцирующие антитела к вирусу гриппа А и В производства Института гриппа, С-Петербург, (Россия) в разведении согласно инструкции производителя.

Помимо МФА для обнаружения вируса гриппа в культуральной жидкости использовали иммунохроматографический тест (CerTest Influenza A+B Biotec, Испания), который предназначен для диагностики гриппа А и В в полевых условиях. Исследование проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для получения вирусоспецифических сывороток использовали белых беспородных крыс (самцы, масса 200,0 г), которым вводили внутримышечно трижды с интервалом в две недели по 0,5 мл культуральной жидкости, содержащей эпидемические вирусы гриппа А и В. Инфекционные титры вирусов, использованных для иммунизации, составляли: А/Брест/236/07(Н1N1) 8,2 IgТЦИД50/0,2мл, А/Минск/ 93/07(Н3N2) 8,7 IgТЦИД50/ 0,2мл, В/Солигорск/140/07 7,4 IgТЦИД50/0,2мл. Иммунизацию осуществляли с добавлением к вирусосодержащей культуральной жидкости в качестве адьюванта 15%

эмульсигена, любезно предоставленного Виринской А.С, сотрудником лаборатории эпидемиологии энтеровирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь). Через месяц после третьего введения вируса проводили тотальный забор крови и титровали полученную сыворотку в РТГА.

Результаты и обсуждение

Культура клеток МДСК (культура клеток почки собаки породы коккер-спаниель) является оптимальной клеточной культурой для репродукции вирусов гриппа и рекомендована Всемирной Организацией Здравоохранения для выделения вирусов гриппа [5]. Согласно действующим в Республике Беларусь нормативным документам выделение вирусов гриппа на культуре МДСК оценивается по развитию цитопатического вирусспецифического действия (ЦПД) и наличию гемагглютинирующей активности в культуральной среде через 48-72 часа инкубации. В случае отсутствия ЦПД инфицированная культура наблюдается в течение 7 дней [1, 2]. Окрашивание назофарингеальных мазков, мазков-отпечатков секционного материала специфическими антителами позволяет обнаружить антиген вируса гриппа в инфицированных эпителиальных клетках в короткие сроки. Однако в клиническом материале не всегда содержится достаточное количество инфицированных клеток, что создает трудности при диагностике и снижает ее результативность. Поэтому для улучшения качества диагностики и сокращения сроков выявления репродукции вирусов гриппа мы использовали метод выделения вируса гриппа на культуре клеток МДСК в сочетании с методом флуоресцирующих антител.

Результаты проведенного исследования показали, что выделение вируса гриппа на культуре клеток МДСК с последующим окрашиванием инфицированного монослоя флуоресцирующими антителами позволяет значительно сократить срок индикации репродукции вируса гриппа. Уже через 24 часа после инфицирования культуры при микрокопировании окрашенного флуоресцирующими антителами инфицированного моно-слоя наблюдали накопление вирусного антигена. О присутствии антигена вируса гриппа свидетельствовало наличие специфического диффузного и гранулярного свечения в цитоплазме инфицированных клеток, в то время как при классическом выделении вируса гриппа на культуре МДСК через 24 часа после инфицирования еще отсутствуют традиционные индикаторы ре-продукции вируса (ЦПД и гемагглютинирующая активность культуральной среды). В монослое клеток, окрашенном флуоресцирующими антителами через 48 часов после инфицирования, мы наблюдали более выраженную иммунофлуоресценцию в цитоплазме инфицированных клеток и признаки цитопатического действия вируса, в то время как при использовании стандартного метода выделения вируса гриппа в культуре клеток через 48 часов инкубации определяются начальные признаки ЦПД, которые носят неспецифический характер и могут быть оценены по 4-х крестной системе как $\pm/+$. Окрашивание инфицированного монослоя специфическими антителами позволяет подтвердить специфический характер происходящих морфологических изменений культуры.

Для ускорения диагностики гриппа помимо метода флуоресцирующих антител нами был использован блистерный иммунохроматографический тест (CerTest Influenza A+B Biotec, Испания), который, согласно прилагаемой инструкции, позволял диагностировать грипп А и В в полевых условиях. Согласно инструкции производителя, контролем качества тест-системы является появление зеленой полосы при смачивании хроматографической полоски. В случае присутствия в исследуемом образце вируса гриппа А при хроматографии реакционной смеси появляется красная полоса. При

наличии в исследуемом образце вируса гриппа В появляется синяя полоса.

Нами был использован данный метод для индикации вируса гриппа в культуральной среде. В результате проведенного исследования было установлено, что данный экспресс-метод так же позволял диагностировать грипп на ранних сроках репродукции вируса в культуре клеток, когда отсутствовала гемагглютинирующая активность в культуральной жидкости и наблюдались нечеткие признаки развития ЦПД в монослое ($\pm/+$).

В ряде случаев при типировании выделенных из клинических образцов изолятов вирусов гриппа в культуральной жидкости инфицированных культур МДСК в РТГА одновременно были выявлены антигены вирусов гриппа типа А и В в одной пробе. Такие случаи подтверждались результатами исследования этих же образцов с помощью блистерного теста. Так в результате хроматографии культуральной жидкости спорных образцов были выявлены две полосы, что так же свидетельствовало о присутствии в клиническом образце одновременно двух типов вирусов гриппа (рисунок).



Рисунок. Индикация вируса гриппа А и В с помощью иммунохроматографического экспресс-метода

Данные результаты были также подтверждены в дальнейшем при изучении этих изолятов с помощью ПЦР в диагностический центр ВОЗ в Атланте (США).

Как было описано выше, иммунохроматографический метод является достаточно чувствительным и позволяет определить антиген вируса гриппа в культуральной жидкости уже на ранних сроках после инфицирования культуры клеток МДСК. Однако данная тест-система не зарегистрирована в Республике Беларусь и, соответственно, не может быть использована для диагностики гриппа. Подобные же отечественные аналоги отсутствуют. Исходя из этого, нами отработана схема иммунизации лабораторных животных (крыс) для получения вирусоспецифических сывороток, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки отечественных иммунохроматографических тест-систем.

Трехкратная иммунизация лабораторных животных (крыс) вирусосодержащей культуральной жидкостью, содержащей 15% адьюванта (эмульсиген) позволила получить поликлональные иммунные сыворотки. Специфичность иммунных сывороток отражена в таблице.

Таблица. Специфичность поликлональных противогриппозных сывороток

Штамм	Инфекцио-нный титр вируса (lgТЦИД50/ 0,2мл)	Титры сыворотки в РТГА		
		А/Брест/236/07 (H1N1)	А/Минск/93/07 (H3N2)	В/Солигорск/140/07
				негативная

А/Брест/236/07 (H1N1)	8,2	1:160	<10	<10	<10
А/Минск/93/07 (H3N2)	8,7	<10	1:160	<10	<10
В/Солигорск/ 140/07	7,4	<10	<10	1:160	<10

Как видно из приведенных в таблице данных, использованная схема иммунизации позволила получить иммунные поликлональные сыворотки к актуальным штаммам эпидемического сезона 2007 года А/Брест/236/07(H1N1), В/Солигорск/140/ 07 и А/Минск/93/07(H1N1). Титры сывороток в РТГА с гомологичным вирусом составили 1:160. Перекрестное реагирование полученных сывороток не отмечено.

Выводы

1. Сочетание метода выделения вируса гриппа в культуре клеток МДСК с последующим окрашиванием инфицированного монослоя флуоресцирующими иммуноглобулинами, а так же выявление вирусного антигена в культуральной жидкости методом иммунохроматографии позволяет сократить время индикации репродукции вируса гриппа до 24 часов, в то время как стандартная процедура выделения вируса гриппа на культуре МДСК позволяет диагностировать грипп не ранее чем через 72 часа.

2. Отработана схема иммунизации лабораторных животных для получения специфических противогриппозных поликлональных иммунных сывороток, которые могут быть использованы в дальнейшем для создания отечественных иммунохроматографических диагностических тест-систем

Литература

1. Инструкция «Организация профилактических и противоэпидемических мероприятий при возникновении птичьего гриппа» / Постановление главного государственного санитарного врача РБ №30 от 10.03.2006 г.

2. Инструкция по лабораторным методам диагностики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций / Постановление МЗ РБ №48 от 01.11.2000 г.

3. Allwinn, R., Preiser, W, Rabenau, H. et al. Laboratory diagnosis of influenza-virology or serology / Med Microbiol Immunol. 2002. Vol. 191. P. 157–160.

4. Cazacu, A.C., Demmler, G.J., Neuman, M.A. et all Comparison of a new lateral-flow chromatographic membrane immunoassay to viral culture for rapid detection and differentiation of influenza A and B viruses in respiratory specimens / J. of Clin. Microbiology. 2004. Vol. 42. № 8. P. 3661–3664.

5. Gert van Zyl Laboratory Findings / Influenza Report 2006. Chapter 7. P. 150–159.

6. WHO Recommended laboratory tests to identify influenza A/H5 virus in specimens from patients with an influenza-like illness. Geneva :WHO, 2005.

7. Zambon, M. / Laboratory diagnosis of influenza // Textbook of influenza / K.G. Nicholson, R.G. Webster, A.J. Hay. 1998. Ch. 22. P. 291–313.