

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ



**ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА
ВИРУСНЫХ КОНЪЮНКТИВИТОВ
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ
АНТИТЕЛ**

Методические рекомендации

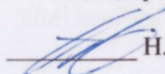
ТАШКЕНТ – 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

«СОГЛАСОВАНО»


Начальник отдела науки и
инновационного развития
д.м.н., профессор


Н.Л. Хабилов

«26» XII 2018 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

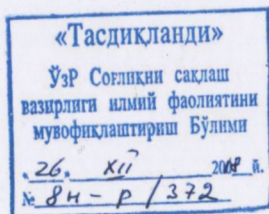
Начальник главного управления
науки и медицинского образования
д.м.н., профессор


У.С. Исмаилов

«26» XII 2018 г.

**ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ
КОНЬЮНКТИВИТОВ МЕТОДОМ
ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ**

Методические рекомендации



ТАШКЕНТ - 2018

Методические рекомендации рассмотрены на заседании Проблемной комиссии (протокол №8 от 12.06.2018 г.) и Ученом Совете при Ташкентской медицинской академии (протокол №3 от 31.10.2018 г)

Составитель:

Имомалиева К.М. – ассистент кафедры офтальмологии ТМА

Рецензенты:

Нарзикулова К.И. – д.м.н., доцент кафедры офтальмологии ТМА

Бузуков Б.Т. – д.м.н., зав. кафедрой офтальмологии ТашПМИ

Инфекционные заболевания, вызываемые вирусами, широко распространены и являются нерешенной медико-социальной проблемой. Аденовирусные и герпетические конъюнктивиты в виде вспышек и спорадических случаев являются актуальным вызовом для практической офтальмологии. При несвоевременной диагностике, а вследствие этого неадекватном лечении заболевание может принимать затяжной характер и переходить в хроническую форму. Экспресс-метод флуоресцирующих антител, обладает довольно высокой специфичностью и достоверностью, позволяет определить этиологию заболевания путем обнаружения свечения вирусного антигена в соскобах с конъюнктивы больных до 80% случаев.

В настоящей методической рекомендации на основании проведенных исследований доказана эффективность метода флуоресцирующих антител в диагностики вирусных поражений органа зрения, заключающаяся в ее способности в кратчайшие сроки установить правильный диагноз и, вследствие этого, сократить продолжительность лечения и улучшить исходы заболевания.

Методические рекомендации предназначены для врачей офтальмологов, студентов, резидентов магистратуры и клинических ординаторов медицинских ВУЗов.

Адрес: 100007, г. Ташкент, Олмазарский район, ул. Фарабий - 2.

Тел.: (+998) 71-214-86-38



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АВК – аденовирусный конъюнктивит
ИГ – иммуноглобулин
ИФА – иммуноферментный анализ
МКА – моноклональные люминесцирующие антитела
МФА – метод флуоресцирующих антител
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РИФ – реакция иммунофлуоресценции
РСХ – родамин сульфохлорид
ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат
ЭКК – эпидемический кератоконъюнктивит



Вирусные заболевания глаз остаются одной из важных причин понижения зрения, слепоты и гибели глаза. Ведущее место среди вирусной патологии органа зрения человека и в общей структуре заболеваемости глаз занимают аденовирусные и герпесвирусные инфекции. В Узбекистане ежегодно регистрируется от 250000 до 300000-500000 случаев офтальмогерпеса, в России и США составляют примерно 500 тысячи случаев, в мире число больных с вирусным поражением органа зрения достигает до 10 млн. в год.

Важным моментом в диагностике вирусных поражений глаз является клиническая картина заболевания. Эффективность надзора за вирусным поражением органа зрения, а также ее терапии зависит от раннего диагностирования инфекции с ее дифференциацией от других заболеваний со сходными симптомами, что определяет важность применения строго специфичных и высоко чувствительных методов дифференциальной лабораторной диагностики.

С целью диагностики вирусной инфекции глаз применяют цитологические, вирусологические, серологические и иммунологические исследования.

Цитологическое изучение соскобов с конъюнктивы у больных вирусными заболеваниями глаз позволяет обнаружить гистологически характерную для данной патологии деструкцию клеток эпителия, вакуоли в ядрах, распад хроматина, образование гранулярных ядер. Для АВК и ЭКК особенно характерен моноклеарный тип отделяемого с преобладанием лимфоцитов и моноцитов. Метод имеет вспомогательное значение для диагностики, поскольку помогает лишь ориентировочно выявлять вирусную природу заболевания.

Культуральный метод диагностики вирусных заболеваний глаз основан на размножении вируса, имеющегося в исследуемом материале, в частности, в соскобе с конъюнктивы или роговицы, слезной жидкости, слизи из носоглотки в культуре клеток, чувствительных к вирусам. Индикацию вируса в клеточных культурах проводят по характеру цитопатического действия. Однако, данный метод трудоемок и требует наличия специализированной лаборатории, а выделение вируса занимает значительный по времени срок от момента взятия материалов до получения результата – от 10 дней до месяца. В связи с этим в практической медицине он используется редко.

Вирусологические, серологические и иммунологические методы диагностики (ИФА, МФА, ПЦР и др.) качественно изменили ситуацию и позволяют обнаружить инфекционный агент практически в любом биологическом материале в самые короткие сроки и оценить качество проводимой терапии. В качестве биологического материала для проведения лабораторных исследований вирусных инфекций могут быть: содержимое герпетических пузырьков, кровь, слизь, слезная жидкость, соскоб со дна эрозий, язвы, инфильтратов роговицы и конъюнктивы глаза.

Современные методы лабораторной диагностики вирусной инфекции можно разделить на две группы: методы, основанные на обнаружении возбудителя и методы выявления антител к возбудителям вирусной инфекции в сыворотке крови. Первая группа методов включает: выделение возбудителя в культурах клеток (вирусологический метод), обнаружение вирусных антигенов (ИФА, МФА), выявление вирусного генома (ПЦР, молекулярная гибридизация). Вторая группа методов объединяет общепринятые методики выявления вирусоспецифических антител в сыворотке крови (реакция биологической нейтрализации, реакция связывания комплемента и т.д.).

Наиболее чувствительным (90-98%), специфичным (90-100%) и распространенным методом выявления вирусов является ПЦР, позволяющая выявить единичные последовательности соответствующих нуклеиновых кислот. За изобретение ПЦР, на которой основана современная ДНК-диагностика, американский ученый Керри Мюллис был удостоен Нобелевской премии в 1993 году. Материалом для исследования может служить любой биоматериал. Особое значение ПЦР-диагностика имеет при асимптомном течении болезни, когда заболевание не имеет явной клинической картины, но патологические процессы присутствуют. Метод помогает находить в исследуемом материале ДНК вируса путем ее многократного копирования и накопления, позволяет выявить патоген до развития заболевания – в серонегативной фазе заболевания или при латентной форме инфекции. ПЦР может использоваться для дифференциальной диагностики разновидностей вирусов. Однако, использование ПЦР в широкой клинической практике ограничено из-за дороговизны, обусловленной стоимостью необходимого оборудования, набора реактивов.



Кэри МЮЛЛИС (Kary B. MULLIS)

американский биохимик

Родился 28.12.1944. Нобелевский лауреат 1993 года в области химии, за изобретение полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей синтезировать миллиарды копий участка ДНК всего за несколько часов. Благодаря этому открытию молекулярная генетика сделала огромный рывок вперед. Без этой технологии работа над глобальным проектом «Геном человека» растянулась бы на добрую сотню лет. Точно, надежно, быстро – вот три слова, которыми можно описать ПЦР-диагностику. Все больше и больше специалистов рекомендуют ПЦР вместо обычных анализов. В первую очередь это урологи и гинекологи, выявляющие возбудители ЗППП – хламидиоза, уреаплазмоза, гонореи, герпеса, гарднереллеза, микоплазменной инфекции и так далее. В гематологии ДНК-диагностика выявляет цитомегаловирусы, онковирусы. Ну и, конечно же, не остался в стороне врачи-инфекционисты: ПЦР используется в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллеза, дифтерии, вирусных гепатитов В, С и G.

Метод флуоресцирующих антител (МФА), предложенный Альбертом Кунсом в 1941 г. и обладающий довольно высокой специфичностью и достоверностью, позволяет определить этиологию заболевания путем обнаружения

свечения вирусного антигена в соскобах с конъюнктивы больных до 80% случаев. Метод заключается в том, что материал соскоба с конъюнктивы и роговицы наносят на предметное стекло, фиксируют и добавляют «меченую» красителем сыворотку, содержащую антитела к аденовирусу. В результате реакции образуются комплексы «антиген-антитело», излучающие свечение, которое определяется с помощью люминесцентного микроскопа. Результаты МФА считаются положительными, если в препарате удается обнаружить не менее 10% клеток со специфическим свечением вирусного антигена. Следует, однако, отметить, что данная методика эффективна в первые 7-8 дней заболевания. Кроме того, МФА является экспресс-методом и преимущество его как диагностического метода состоит в том, что с его помощью возможно за два-три часа серологически идентифицировать микроорганизм непосредственно в патологическом материале, без выделения в чистой культуре.



Альберт Хьюэтт Кунс (Albert H. Coons)

американский врач, патолог и иммунолог

Родился 28 июня 1912 года.

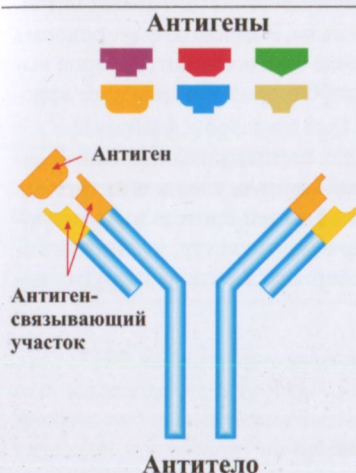
Умер 30 сентября 1978 года.

В 1941 году Альберт Кунс предложил иммуногистохимический метод обнаружения различных веществ. Суть его заключается в использовании специфических сывороток, в которых содержатся маркированные флуоресцирующие антитела против определенного вещества. Когда сыворотку капают на срез ткани, то она реагирует с теми клетками, в которых содержатся искомые вещества – антигены. К 1960-м годам этот метод занял достойное место среди других гистохимических методов. На его основе в течение последующих двух десятилетий были созданы новые чувствительные способы обнаружения гормонов в крови и клетках, открывшие революционные перспективы в биологии и медицине.

Таким образом, целью данной методической рекомендации является внедрение метода флуоресцирующих антител для ранней диагностики вирусных заболеваний глаз.



Метод флуоресцирующих антител относят к серологическим методам, в основе которых лежат реакции иммунитета. Реакции иммунитета – это реакции между антигенами и антителами или между антигенами и сенсibilизированными лимфоцитами, протекающие *in vivo*. Они могут быть воспроизведены *in vitro*. Эти реакции называют серологическими (от лат. Serum – сыворотка) или гуморальными (от лат. Humor – жидкость).



Антиген (англ. *antigen* от **antibody-generator** – «производитель антител») – любое вещество, которое организм рассматривает как чужеродное или потенциально опасное и против которого организм обычно начинает вырабатывать собственные антитела (иммунный ответ). Обычно в качестве антигенов выступают белки, однако простые вещества, даже металлы, также могут становиться антигенами в сочетании с собственными белками организма и их модификациями (гаптены).

С точки зрения биохимии, антиген – это любая молекула, которая специфично связывается с антителом. По отношению к организму антигены могут быть как внешнего, так и внутреннего происхождения. Хотя все антигены могут связываться с антителами, не все они могут вызвать массовую выработку этих антител организмом, то есть иммунный ответ. Антиген, способный вызывать иммунный ответ организма, называют **иммуногеном**.

Антигены, как правило, являются белками или полисахаридами и представляют собой части бактериальных клеток, вирусов и других микроорганизмов.

Антитела (иммуноглобулины, ИГ, Ig) – белковые соединения плазмы крови, образующиеся в ответ на введение в организм человека или теплокровных животных бактерий, вирусов, белковых токсинов и других антигенов. Связываясь активными участками (центрами) с бактериями или вирусами, антитела препятствуют их размножению или нейтрализуют выделяемые ими токсические вещества.

Антитела являются особым классом гликопротеинов, имеющих на поверхности В-лимфоцитов в виде мембраносвязанных рецепторов и в сыворотке крови. Антитела являются важнейшим фактором специфического гуморального иммунитета. Антитела используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов – например, бактерий и вирусов. Антитела выполняют две функции: *антиген-связывающую* и эффекторную (вызывают тот или иной иммунный ответ, например, запускают классическую схему активации комплемента).

Антитела синтезируются плазматическими клетками, которыми становятся некоторые В-лимфоциты, в ответ на присутствие антигенов. Для каждого антигена формируются соответствующие ему специализировавшиеся плазматические клетки, вырабатывающие специфичные для этого антигена антитела. Антитела распознают антигены, связываясь с определённым эпитопом – характерным фрагментом поверхности или линейной аминокислотной цепи антигена.

Антитела состоят из двух лёгких и двух тяжёлых цепей. У млекопитающих выделяют пять классов антител (иммуноглобулинов) – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся между собой по строению и аминокислотному составу тяжёлых цепей и по выполняемым эффекторным функциям.

МФА представляет собой комплексный метод, сочетающий серологическое и микроскопическое исследования. Осуществляется метод путем постановки реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и учета ее результата.

Впервые МФА предложен Альбертом Кунсом в 1941 г. Сущность данного метода заключается в том, что антитела меченые флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Образующийся иммунный комплекс обнаруживают под воздействием ультрафиолетовых лучей с помощью люминесцентной микроскопии по характерному свечению, благодаря присутствию в нем флуорохрома.

Люминесцирующие сыворотки для диагностики инфекционных болезней представляют собой меченые флуорохромом глобулины (антитела). Антитела, меченые флуорохромом, называют конъюгатом. В качестве флуорохрома наиболее часто используют ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат, которое вызывает зеленое свечение и РСХ – родамина сульфохлорид вызывающее красное свечение.

Флуоресцирующие антитела применяют для индикации микробов в различных объектах, выяснения локализации их и не корпускулярных антигенов при изучении патогенеза инфекций, выявления областей синтеза иммуноглобулинов в организме, определения чистоты микробных культур, уточнения антигенного родства микробов, постановки достоверного диагноза и других целей (рисунки 1-4).

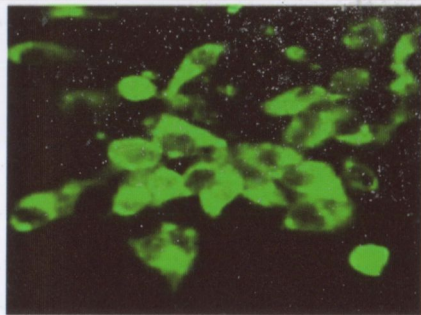
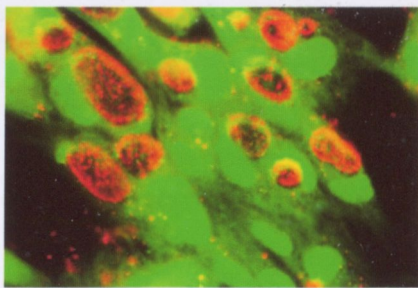


Рисунок 1.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки MARC-145, инфицированные вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV).

Рисунок 2.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки HeLa, инфицированные *Chlamydia trachomatis*. Бактерии *Chlamydia trachomatis* – красный цвет, клетки HeLa – зеленый цвет.



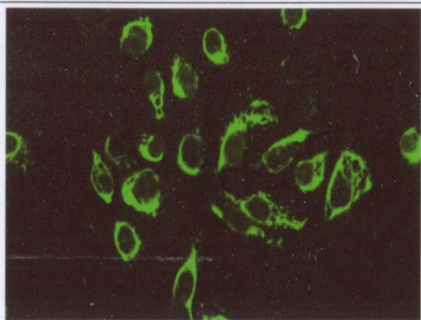
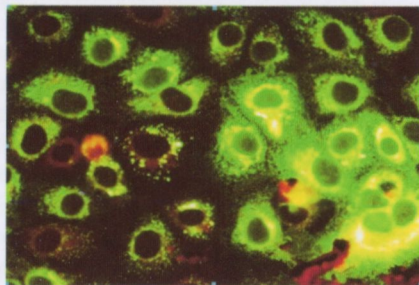


Рисунок 4.
Иммунофлуоресцентный анализ.
Клетки, инфицированные вирусом
японского энцефалита – NS1.

Рисунок 3.

Иммунофлуоресцентный анализ.
Специфические антитела (IgM, IgG)
против вируса Зика в крови инфици-
рованных пациентов.



РИФ является высокоспецифичной и чувствительной, позволяет провести исследование в течение 2-3 часов, идентифицировать микроорганизмы в материале без выделения чистой культуры, т.к. взаимодействие антигена с антителами происходит на предметном стекле, где находится антиген. С помощью РИФ можно выявить биологически активные вещества, содержащиеся в исследуемом материале в минорных количествах. К тому же, при наличии необходимых ингредиентов, постановка реакции не требует стерильной работы, высокой квалификации исполнителя, проста в техническом отношении. При положительной реакции результаты ее исключительно демонстративны, что позволяет документировать их путем фотографирования.

Приготовление и контроль качества люминесцирующих антител из иммунной сыворотки

Принцип получения люминесцирующих сывороток состоит в присоединении флюорохрома к глобулиновой фракции сыворотки путем прочной химической связи. При этом маркированные антитела полностью сохраняют способность специфически соединяться с антигеном. Чаще всего для метки антител используют флюоресцеина изотиоцианат (ФИТЦ).

Эффективность МФА главным образом определяется специфичностью и активностью люминесцирующей сыворотки. Ее качество зависит от активности и специфичности иммунной сыворотки, качества применения флюорохрома и от применяемой метки.

Приготовление и контроль качества люминесцирующих сывороток состоит из нескольких этапов:

- получение агглютинирующей сыворотки от продуцентов, гипериммунизированных специфическим антигеном;
- выделение глобулиновой фракции из иммунной сыворотки;
- освобождение глобулиновой фракции от сульфата аммония;
- люминесцентное мечение иммуноспецифического белка (антител) флюорохромом;
- очистка люминесцирующих антител от несвязанного красителя;
- определение физических свойств сыворотки;
- определение массовой доли белка в сыворотке;
- контроль люминесцирующей сыворотки на активность;
- контроль препарата на специфичность.

Флуоресцирующие сыворотки выпускают в ампулах и флаконах в жидком или сухом виде. На ампулы и флаконы наклеивают этикетки с указанием учреждения, изготовившего препарат, наименованием его, номера серии и объема, рабочего разведения и срока годности сыворотки. Хранят сыворотки в сухом темном месте при 2-4°C в течение установленного срока годности препаратов. Флуоресцирующие сыворотки в рабочем разведении можно использовать в течение двух недель при условии хранения их при температуре 2-4°C.

Контроль качества люминесцирующих сывороток

Люминесцирующие сыворотки проверяют на активность, специфичность, определяют содержание белка в них и физические свойства.

Физические свойства определяют визуально. Жидкие сыворотки должны быть прозрачными, желтого или желто-оранжевого цвета с зеленоватым оттенком, не содержать посторонних примесей. Лиофилизированные сыворотки представляют собой пористую массу желто-оранжевого цвета.

При просмотре ампул (флаконов) определяют не только отсутствие механических примесей, плесени, следов оттаивания сухих препаратов, но и плотность закупорки и правильность этикетировки.

Растворимость высушенных препаратов определяют путем добавления во флаконы (ампулы) 1 см³ дистиллированной воды. Сухая масса должна полностью растворяться в течение 2-3 минут.

Важнейшими показателями качества флуоресцирующих сывороток являются их активность и специфичность. Активность определяют установлением красящего титра. Для этого готовят последовательные разведения исследуемого препарата: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 и т.д. на буферном физиологическом растворе с рН 7,4.

Сыворотки проверяют не менее чем на двух гомологичных культурах. Из культур готовят мазки в количестве, соответствующем количеству разведений сыворотки, которые фиксируют этиловым спиртом в течение 15 минут. После высыхания спирта на препарат наносят сыворотку. Затем препараты-мазки увлажняют буферным физиологическим раствором с рН 7,4 и укладывают в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой для предотвращения высыхания сывороток. Препараты в закрытых чашках выдерживают в термостате при 37°C в течение 30 минут, промывают буферным физиологическим раствором с рН 7,4 в течение 20 минут, меняя раствор дважды, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют.

Специфичность люминесцирующих сывороток проверяют люминесцентной микроскопией препаратов, приготовленных из двух гомологичных культур и не менее пяти гетерологичных, обработанных приготовленными сыворотками в рабочем разведении. Бактерии гомологичных культур должны давать ярко выраженное свечение, а бактерии гетерологичных культур люминесцировать не могут.

Приготовление препаратов для реакции иммунофлуоресценции

Для приготовления и исследования препаратов в реакции иммунофлуоресценции необходимо иметь:

- o специфическую флуоресцирующую сыворотку;
- o люминесцентный микроскоп серии «Люам» или МЛ-1, МЛ-2, МЛД;
- o нефлуоресцирующее иммерсионное масло;
- o глицерин с фосфатным буфером рН 8,0 (9 частей глицерина нейтрального + 1 часть фосфатного буфера рН 8,0);
- o физиологический раствор с фосфатным буфером рН 8,0;
- o ацетон, спирт этиловый и метиловый;
- o покровное стекло толщиной не более 0,2 мм;
- o предметные стекла нелюминесцирующие и хорошо обезжиренные.



Рисунок 5.
Специфическая флуоресцирующая сыворотка



Рисунок 6. Люминесцентный микроскоп серии «Люам»

Для РИФ готовят препараты-мазки из чистых или смешанных культур, бактериальной суспензии или же препараты-отпечатки из органов и тканей.

Патологический материал для исследования должен быть свежим. Из органов и тканей можно готовить препараты-отпечатки или препараты-мазки из предварительно полученной суспензии исследуемого материала. Обычно из

паренхиматозных органов готовят суспензию на физиологическом растворе в соотношении 1:5. После осаждения крупных частиц из суспензии приготавливают препараты-мазки.

Препараты с нанесенным материалом подсушивают на воздухе и фиксируют путем нанесения на них ацетона на 5 минут или же метанола на 5-10 минут. Фиксацию можно осуществлять путем проведения препаратов через пламя спиртовки, как при обычной световой микроскопии. Препараты-отпечатки из органов и тканей лучше фиксировать ацетоном, охлажденным до минус 20°C.

Окрашивание подготовленных препаратов можно проводить в зависимости от целей исследования прямым и непрямым способами.

Модификации метода флуоресцирующих антител

МФА имеет два варианта: прямой и непрямой.

Прямой способ. Фиксированный мазок красят люминесцирующей иммунной сывороткой, содержащей антитела против искомого антигена. Чаще всего применяют только для идентификации неизвестного антигена. Недостаток – необходимость иметь в наличии сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

Непрямой способ. Более универсальный, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов. На первом этапе фиксированный мазок обрабатывают немеченной к искомому возбудителю иммунной сывороткой. Если антитела данной сыворотки соответствуют антигену, то они фиксируются на нем. На втором этапе на препарат наносят антивидовую люминесцирующую сыворотку. В результате к образовавшемуся на первом этапе комплексу антиген – антитело присоединяются антитела второй ступени, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе.

Приготовление препаратов.

1. Из испытуемых суспензий микроорганизма готовят мазки на тщательно обезжиренных предметных стеклах, ближе к краю. Для удобства работы можно на одном стекле, предварительно размеченном корундовым карандашом или алмазным стеклорезом, делать 6-8 мазков.

2. Соскоб из конъюнктивальной полости или роговицы наносят на предметное стекло. Мазок должен быть по возможности тонким.



Рисунок 7.
Взятие соскоба из конъюнктивальной полости

Рисунок 8.
Нанесение соскоба на предметное стекло

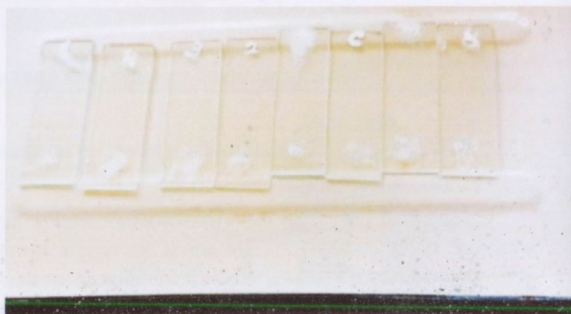
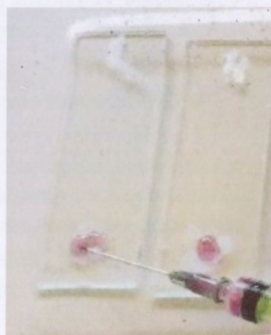


Рисунок 7.
На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей сыворотки

Рисунок 9.
Окрашивание препарата родамином.



Препараты с нанесенным материалом подсушивают на воздухе и фиксируют путем нанесения на них ацетона на 5 минут или же метанола на 5-10 минут. Фиксацию можно осуществлять путем проведения препаратов через пламя спиртовки, как при обычной световой микроскопии. Препараты-отпечатки из органов и тканей лучше фиксировать ацетоном, охлажденным до минус 20°C. После фиксации границу исследуемого материала обычно отмечают восковым карандашом на обратной стороне стекла.

Фиксированные препараты до их окрашивания люминесцирующими сыворотками хранят при 0-4°C не более 2 мес. Окрашивание подготовленных препаратов можно проводить в зависимости от целей исследования прямым и непрямым способами.

Прямой способ МФА. При прямом способе происходит непосредственное связывание антигена с соответствующими ему флуоресцирующими антителами. Сухую люминесцирующую сыворотку в ампуле растворяют в указанном на этикетке количестве дистиллированной воды. Разведенную сыворотку хранят в пробирке с резиновой пробкой или в запаянной ампуле при 4°C.

На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей сыворотки, содержащей антитела против предполагаемого антигена. Перед использованием каждой серии люминесцирующей сыворотки следует проверить ее рабочее разведение, указанное на этикетке. Сыворотку для окрашивания препаратов используют в рабочем разведении. Во избежание высыхания препараты помещают в чашку Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при 37-38°C в течение 15-30 минут. После этого сыворотку отмывают, погружая препараты в кювету, наполненную физиологическим раствором с фосфатным буфером рН 7,4 на 20 минут. Раствор в кювете периодически помешивают и меняют через 10 минут. Отмытые препараты ополаскивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе или в термостате. Затем на их поверхность наносят каплю глицерина с буфером рН 8,0 накрывают покровным стеклом, на которое капают каплю нефлуоресцирующего иммерсионного масла или его заменитель, и микроскопируют. Люминесцентный микроскоп рекомендуют устанавливать в хорошо вентилируемой комнате с затемненным окном.

Микроорганизмы, окрашенные люминесцирующей сывороткой, меченой ФИПЦ, имеют ярко-зеленое свечение, локализующееся по периферии клетки с характерной для исследуемого вида морфологией. Такое свечение называется специфическим в отличие от неспецифического, при котором происходит равномерное свечение всего тела клетки. Следует иметь в виду, что в препаратах из органов животных и культуры тканей обычная морфология клеток может быть изменена.



Рисунок 10. Подготовка препарата к исследованию под микроскопом. Накрывают препарат покровным стеклом. На препарат наносится нефлуоресцирующее иммерсионное масло.

Интенсивность свечения оценивают по четырехплюсовой системе:

«++++» – яркая флюоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки (реакция положительная);

«+++» – яркая флюоресценция периферии клетки (реакция положительная);

«++» – недостаточно яркая желтовато-зеленоватая люминесценция, свечение периферии клетки выявляется с трудом (реакция сомнительная);

«+» – люминесценция очень слабая, морфология клетки выявляется с трудом (реакция отрицательная). Когда видны лишь тени клеток, но отсутствует их свечение, такую реакцию обозначают знаком минус (–).

Положительным результатом считают люминесценцию клеток, оцениваемую на «++++» или «+++», при наличии 2-5 специфических клеток в каждом поле зрения.

Прямой способ постановки РИФ используют только для установления вида неизвестного антигена. Недостатком этого способа является необходимость приготовления люминесцирующих сывороток для каждого вида идентифицируемых микроорганизмов.

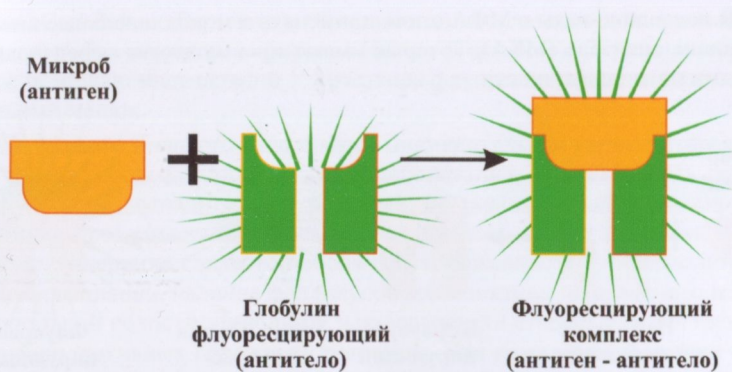


Рисунок 11. Схематическое изображение прямого способа МФА

Непрямой способ МФА. Он считается более универсальным, т.к. с помощью одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов. Сущность непрямого метода заключается в том, что реакция проходит в два этапа: взаимодействие антигена с антителами соответствующей немеченой диагностической сывороткой, а затем присоединение к нефлуоресцирующему комплексу (антиген + антитело) видоспецифического флуоресцирующего глобулина. На фиксированный мазок, содержащий антиген, на 10-20 мин наносят капли различных разведений иммунной немеченой сыворотки против соответствующего микроорганизма в разведениях 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и т. д.

Препараты помещают во влажную камеру для предохранения от высыхания сыворотки. Затем мазки 2 раза промывают 0,15 М раствором NaCl (рН 7,2-7,4) по 10 мин для удаления избытка иммунной сыворотки. Подсушивают на воздухе. Далее на препараты наносят капли люминесцирующей антивидовой сыворотки против глобулинов того вида животного, от которого была получена иммунная сыворотка, в рабочем разведении на 10-20 мин. Мазки промывают и просматривают, как описано выше.

Непрямой вариант МФА имеет преимущество перед прямым: из-за ограниченного набора люминесцирующих антивидовых сывороток (кролика, лошади, барана и т. д.).

Для подтверждения специфичности результатов РИФ необходимы следующие контроли. При прямом способе проводят окраску гомологичных и гетерологичных в антигенном отношении бактерий люминесцирующей сывороткой. Свечение гомологичных микроорганизмов должно быть хорошо выраженным, а гетерологичные бактерии светиться не должны.

При непрямом варианте РИФ также должно быть свечение гомологичных и отсутствовать свечение гетерологичных бактерий.

В последние годы в МФА стали применять и моноклональные люминесцирующие антитела (МКА), которые имеют преимущества перед поликлональными по специфичности.



Рисунок 12. Схематическое изображение непрямого способа МФА

Результаты практического использования метода флуоресцирующих антител

Под нашим наблюдением находились 40 больных с аденовирусным конъюнктивитом, в возрасте от 18 до 70 лет, средний возраст составил $36,3 \pm 1,0$ лет. Из них – 19 (47,5%) мужчин и 21 (52,5%) женщин.

Диагноз аденовирусный конъюнктивит установлен на основании характерной клинической картины. У обследованных больных изучался анамнез заболевания. В процессе лечения проводился анализ показателей клинических результатов предложенного комплексного лечения больных АК с применением глазных лечебных пленок «ГлазАвир» с индуктором интерферона и больных контрольной группы, в лечении которых использовали традиционную терапию.

Для этого мы учитывали следующие клинические показатели: сроки исчезновения отека кожи век и конъюнктивы, гиперемии, сроки рассасывания субконъюнктивальных кровоизлияний, обратного развития фолликулов, рассасывания инфильтратов роговицы, исчезновения отделяемого конъюнктивы и восстановления остроты зрения, а также количества затраченных на лечение дней.

Острота зрения у пациентов с аденовирусной инфекцией глаза оценивалась по стандартному набору знаков таблиц Сивцева Д.А. с расстояния 5 метров, с помощью набора оптических стекол. Внутриглазное давление оценивалось у пациентов ориентировочно пальпаторно. Биомикроскопия переднего отдела глазного яблока проводили с помощью фотоцелевой лампы FSL 211

фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Офтальмоскопия глазного дна прямым электрическим офтальмоскопом фирмы «Heine» (Германия). Окрашивание роговицы с помощью инстилляций 1% раствора флуоресцеина натрия в конъюнктивальный мешок.

На каждого больного заполнялась индивидуальная карта, которая отражала данные обследования, динамику заболевания, эффективность лечения. Наблюдение за воспалительной реакцией, сопровождающей аденовирусную инфекцию, проводилось по объективным признакам: отек кожи век и конъюнктивы, гиперемия слизистой оболочки, выраженность субконъюнктивальных кровоизлияний, наличие фолликулов конъюнктивы, отделяемого из конъюнктивальной полости. Дополнительно учитывали степень распространенности инфильтративных поражений роговицы. Для комплексной оценки воспалительной реакции, помимо сроков регресса в днях, признаки оценивались в баллах по условной шкале.

Аденовирусная инфекция глаз у всех больных начиналась остро, с типичным течением и обращением к офтальмологу в сроки от 2 дней до 10 дней от начала заболевания.

Основными клиническими проявлениями инфекции были отек кожи век и конъюнктивы, а также гиперемия слизистой оболочки, которые наблюдались у всех больных (100%) и в большинстве случаев были резко выраженными.

Субконъюнктивальные кровоизлияния также наблюдались у 45% больных и чаще были множественными. Фолликулярная реакция конъюнктивы отмечалась в 76,8 % случаев у больных с АК, в 73,8 % случаев – при осложненной форме заболевания и была более выраженной у больных с кератоконъюнктивитами. Кроме того, у всех больных с кератоконъюнктивитами (100%) имели место субэпителиальные инфильтраты роговицы. Отделяемое с гнойным компонентом из конъюнктивальной полости отмечалось у всех 100% больных с осложненной аденовирусной инфекцией глаз.

Забор материала для метода флуоресцирующих антител производился в условиях офтальмологического кабинета при помощи одноразовых расходных материалов. Препарат готовился по вышеуказанной методике.

Для подтверждения вирусной природы конъюнктивита антигены аденовируса определяли прямым методом флуоресцирующих антител в соскобах конъюнктивы, пользуясь коммерческим диагностическим аденовирусным флуоресцирующим иммуноглобулином производственного выпуска НИИ гриппа РАМН, ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов» г. Санкт Петербург, по известной методике.

Мазки просматривали с помощью люминесцентного микроскопа «ЛЮОМАН» с использованием иммерсионного объектива х90. Выявляли округлые, овальные или неправильной формы клетки с флуоресценцией в цитоплазме или ядре клеток, а также в виде внутриклеточных включений, не менее 5-7 клеток с яркостью, четко отличающейся по интенсивности свечения от

фоновой окраски окружающих интактных клеток. Оценку интенсивности иммунофлуоресцентного свечения проводили по четыре крестовой условной шкале яркости (диагностически достоверными считали яркость свечения на +3,+4 креста).

Пораженные клетки аденовирусом, окрашенные люминесцирующей сывороткой, меченной ФИТЦ, имеют ярко-зеленое свечение. При аденовирусной инфекции обнаруживалось специфическое свечение в ядре клеток и в цитоплазме.

По результатам метода флуоресцирующих антител в первые 4 дня болезни у 82,5% больных удалось диагностировать заболевание, на 5-8 день - у 49%, на 9-10 день у 23%, на 11-14 день - только у 15%.

Таким образом, эффективность диагностики при использовании данного метода зависит от длительности заболевания на момент обследования.

Полученные данные можно проиллюстрировать **клиническим примером**.

Больная К-ва., 27 лет. Жалобы на слезотечение, покраснение, чувство инородного тела обоих глаз (рис.3).

Со слов больного, два дня тому назад появились данные жалобы со стороны правого глаза, на следующий день заболел левый глаз. Общими заболеваниями больной не страдает.

При обращении: VIS OD = 0,8 н/к. VIS OS = 1,0.

Правый глаз - отек век, выраженная конъюнктивальная инфекция, на конъюнктиве век и переходных складок мелкие поверхностные фолликулы. Роговица прозрачная, глубжележащие среды прозрачные. Глазное дно - диск зрительного нерва бледно-розовый, границы четкие, сосуды обычного калибра. Отделяемое из конъюнктивальной полости слизистое, скудное.

Левый глаз - схожая, менее выраженная клиническая симптоматика.

Офтальмологический диагноз: Аденовирусный конъюнктивит обоих глаз.



до лечения



после лечения

Рисунок 14. Фотография правого глаза больной К-ва. до и после лечения
Взят соскоб с конъюнктивы для исследования методом флуоресцирующих антител.

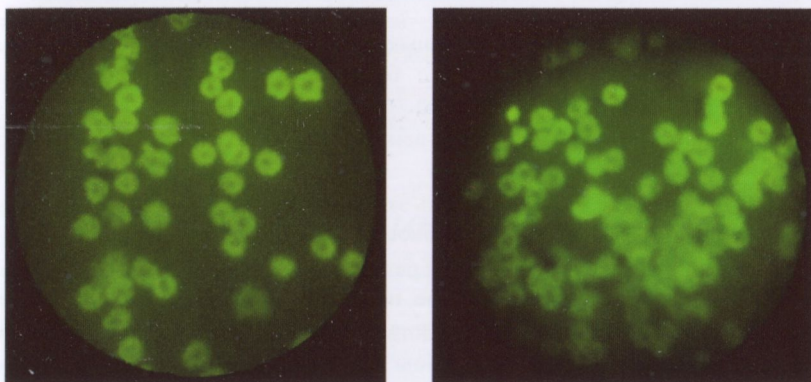


Рисунок 15. Препарат соскоба с конъюнктивы больного с диагнозом острый аденовирусный конъюнктивит. Выявление антигена аденовируса с помощью МФА. Специфическое свечение ядер и цитоплазмы эпителиальных клеток.

Увел.х: Ок.8. Об.90.

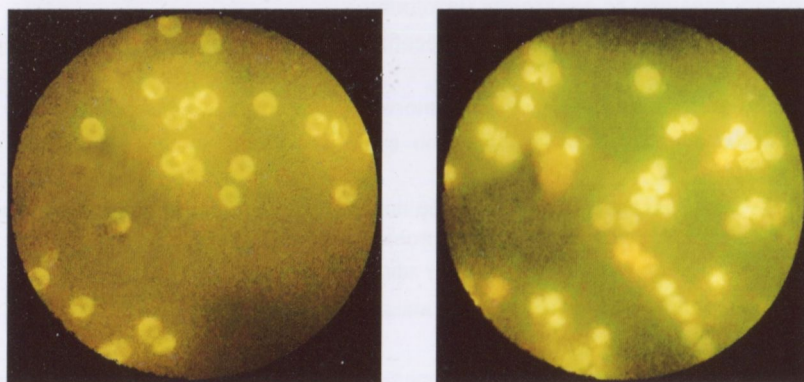


Рисунок 16. Препарат соскоба с конъюнктивы больного с диагнозом острый аденовирусный конъюнктивит. Выявление антигена аденовируса с помощью МФА (окраска родамином). Специфическое свечение ядер и цитоплазмы эпителиальных клеток.

Увел.х: Ок.8. Об.90.



ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНОЙ И ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

Исходя из результатов собственных исследований у 33 (82,5%) больных методом флуоресцирующих антител был диагностирован аденовирусный конъюнктивит в первые 4 дня болезни.

Социальная значимость предлагаемого метода заключается в снижении инвалидизации.

Данный метод позволит повысить экономический эффект путем сокращения сроков временной нетрудоспособности.

Внедрение данной методической рекомендации позволит своевременно и экстренно диагностировать вирусное поражение глаз, тем самым снизить сроки временной нетрудоспособности, а также предотвратит грозные осложнения заболевания.

Расчет экономического эффекта от сокращения сроков временной нетрудоспособности производился по формуле Искандарова Т.И. (2005):

$$Эвр = (D_1 - D_2) \cdot (Г + E) \times H - 0,15 \cdot K$$

где, D_1 – среднее число дней нетрудоспособности одного больного по данному заболеванию до внедрения методики;

D_2 – среднее число дней трудоспособности по данному заболеванию после внедрения;

$Г$ – среднедневная выработка одного работающего, сум/день;

E – средний размер пособия по временной утраты трудоспособности сум/день;

H – масштаб внедрения (число больных в год, на которых ожидается распространить или уже распространен новый метод лечения);

$0,15$ – нормальный коэффициент эффективности;

K – предполагаемые затраты на внедрения данного метода.

По ретроспективным данным среднее число дней нетрудоспособности одного больного по данному заболеванию до внедрения методики составляло 18 дней (D_1), среднее число дней трудоспособности по данному заболеванию после внедрения метода составило 12 дней (D_2).

Среднедневная выработка одного работающего вычислена из минимальной заработной платы (184.300 сум) и составила 7.679 сум/день ($Г$).

Средний размер пособия по временной утраты трудоспособности. При страховом стаже от 5 до 8 лет максимальный размер среднего дневного заработка для расчета пособия составляет: $7.679 \cdot 80\% / 100\% = 6.143$ сум / день (*E*).

Масштаб внедрения – число больных в год, на которых ожидается распространить новый метод диагностики – 200 больных (*H*).

0,15 – нормальный коэффициент эффективности;

K – предполагаемые затраты на внедрения данного метода – стоимость метода флуоресцирующих антител с соскоба конъюнктивы 50 000 сум.

$$\begin{aligned} \text{Э вр} &= (D1-D2) \cdot (Г + E) \cdot H - 0,15 \cdot K = \\ &= (14-7) \cdot (7.679 + 6.143) \cdot 200 - 0,15 \cdot 50\ 000 = \\ &= 7 \cdot 13.822 \cdot 200 - 7\ 500 = 19\ 343\ 300 \text{ сум} \end{aligned}$$

Таким образом, предлагаемый метод помогает осуществить раннюю диагностику вирусных поражений глаз. Ранняя диагностика вирусных поражений глаз предотвратит возможные осложнения в виде кератитов и язв роговицы, тем самым позволит снизить количество слепых и слабовидящих после перенесенного вирусных поражений глаз.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алланазарова З. Х. Этиология и патологическая анатомия острых пневмоний у детей раннего возраста // Дисс... канд. мед. наук. – Ташкент. – 2008. – 113с.
2. Бахритдинова Ф.А., Нарзикулова К.И. Клиническая оценка эффективности комплексной терапии аденовирусных поражений глаз. Санкт-Петербург 2008. – С. 25-26.
3. Володин Н. Н., Дегтярев Д.Н., Ковтун И.Ю. Перспективы использования метода ПЦР для ранней диагностики герпетических инфекций у новорожденных детей // Материалы III съезда Рос. ассоциации специалистов перинатальной медицины. – М., 2000. – С.122 – 123.
4. Гинцбург А. Л., Романова А.Л. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний // Клинич. лаб. диагностика. – 1998. – № 2. – С. 35 – 39.
5. Дрожжина Г.И. Конъюнктивиты (клиника, диагностика, лечение) / Г.И. Дрожжина // Офтальмол. журнал. – 2010. – № 1. – С.31 – 37.
6. Зверев В. В., Борисенко А. С., Никонова А. А. и др. Разработка ПЦР-тест-системы для выявления аденовирусной инфекции у человека // Вопросы вирусологии. – 2005. – № 6. – С. 44-47.
7. Камиллов Х.М., Гулямова М.Д., Касымова М.С. Сравнительная оценка информативности иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в диагностике эндогенных увеитов. Медико-социальная реабилитация инвалидов: Тез. докладов Респ. научно-практ. семинар. – Т., 2003. – С.141.
8. Каспарова Е. А. Осложненные формы аденовирусных кератоконъюнктивитов: классификация, лечение и хирургия осложнений // Глаз. – 2001. – № 5. – С. 30-34.
9. Клещева Е. А. Острые и хронические формы аденовирусной инфекции глаз // Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2012. – 25 с.
10. Кочергин С. А., Чернакова Г. М., Туркина К.И. и др. Клинические, диагностические и терапевтические аспекты хронической аденовирусной инфекции глаз // РМЖ. – 2013. – № 1. – С. 26–28.
11. Кричевская Г.И., Яни Е.В., Вахова Е.С. Быстрые иммунохроматографические методы в диагностике аденовирусных заболеваний глаз // Материалы III Рос. общенационального офтальмологического форума. – М., 2010. – С. 38 – 42.
12. Носик Н.Н., Стаханов В.М. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Лаб. диагностика. – 2000. – № 2. – С. 1 – 11.
13. Сорокина С.А., Биркун Е.Ю. Диагностика инфекционных заболеваний глаза методом полимеразной цепной реакции // Тези науч.-практ. конф. з

міжнарод. участю «Хірургічне лікування та реабілітація хворих з офтальмологічною патологією». – К., 2004. – С. 214 – 215.

14. Майчук Д. Ю. Вирусные конъюнктивиты и кератоконъюнктивиты / В кн.: Синдром красного глаза. – Москва, 2010. – С. 31-38.

15. Майчук Ю. Ф. Вирусные заболевания глаз. – М.: Медицина, 1981. – 272 с.

16. Майчук Ю.Ф., Зайцева О.В. Аденодетектор для экспресс-диагностики аденовирусного конъюнктивита // Новое в офтальмологии. – 2009. – № 3. – С.65 – 68.

17. Майчук Ю.Ф. Офтальмоферон в лечении аллергических, инфекционно-аллергических, токсико-аллергических конъюнктивитов и болезни сухого глаза // Рос. офтальмол. журнал. – 2011.– № 3. – С.78 – 84.

18. Матюхина Е.Н., Бабушкин А.Э., Рахматова И.И. Лабораторная диагностика аденовирусной инфекции глаз (обзор литературы) // Точка зрения. Восток - Запад. – 2015.– № 2. – С.52 – 54.

19. Мурадова, Е. О. Микробиология / Е. О. Мурадова, К. В. Ткаченко. - Москва: Эксмо, 2009. – 336 с.

20. Яни Е.В. Комплексная терапия аденовирусных офтальмоинфекций и вторичного сухого глаза // Автореф. дисс... канд. мед.наук. –М.,2010.–23 с.

21. Aoki K1, Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan // Int. Ophthalmol. Clin. – 2002. – № 1. P. 49-54.

22. Asena L, Şingar Özdemir E, Burcu A, Ercan E, Çolak M, Altınörs DD. Comparison of clinical outcome with different treatment regimens in acute adenoviral keratoconjunctivitis // Eye. – 2017. – № 5. P. 781-787.

23. Elnifro E.M., Cooper R. J., Klapper P. E., et al. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2000. – V. 41. – № 7. – P.1818-1822.

24. Kaneko H, Aoki K, Ohno S, Ishiko H, Fujimoto T, Kikuchi M, Harada S, Gonzalez G, Koyanagi KO, Watanabe H, Suzutani T. Complete genome analysis of a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan // J. Clin. Microbiol. – 2011. – № 2. P. 484-490.

25. Kuo I.C., Espinosa C, Forman M, Valsamakis A. A Polymerase Chain Reaction-Based Algorithm to Detect and Prevent Transmission of Adenoviral Conjunctivitis in Hospital Employees // Am. J. Ophthalmol. – 2016. № 163. P. 484-490.

26. Pleyer U., Birnbaum F. Adenoviral keratoconjunctivitis // Ophthalmologie. – 2015. № 5. P. 459-469.

27. Jhanji V., Chan T.C., Li E.Y., Agarwal K., Vajpayee R.B. Adenoviral keratoconjunctivitis // Surv. Ophthalmol. – 2015. № 5. P. 435-443.



Список сокращений.....

Введение

Метод флуоресцирующих антител.....

 Приготовление и контроль качества люминесцирующих антител из иммунной сыворотки

 Контроль качества люминесцирующих сывороток.....

 Приготовление препаратов для реакции иммунофлуоресценции

 Модификации метода флуоресцирующих антител

 Результаты практического использования метода флуоресцирующих антител.....

Оценка социальной и экономической эффективности метода диагностики и лечения.....

Список литературы.....

Босишга рухсат этилди: 21.01.2019.
Бичими: 60x84 1/8. «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 4. Адади: 200. Буюртма: №04

100060, Тошкент, Я. Фуломов кўчаси, 74.

«TOP IMAGE MEDIA»
босмаҳонасида чоп этилди.

