

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

20.12.2011 г.

Регистрационный № 124-1211

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,

ГУ «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,

ГУ «Витебский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Ермолович М.А., канд. мед. наук, Климович Н.В., Матвеев В.А., д-р мед. наук, проф., Самойлович Е.О., д-р. мед. наук, доц.

Минск 2011

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАГЕНТОВ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

Вакутайнеры 5 мл для забора крови из вены.

Скарификаторы, капилляры, резиновая груша, центрифужные пробирки для забора крови из пальца.

Фильтровальная бумага для получения сухой капли крови.

Набор для забора носоглоточных мазков (стерильный зонд-тампон в пробирке).

Оборудование и материалы для проведения ПЦР

Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой.

Термоциклер для проведения ПЦР.

Вортекс-шейкер.

Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф», 12 тыс. об/мин.

Холодильник на 2–8 °С с морозильником.

СВЧ-печь (для плавления агарозы, может быть заменена водяной баней).

Источник постоянного тока для электрофореза.

Камера для горизонтального электрофореза.

Трансиллюминатор с источником УФ-лучей.

Аппарат для фотографирования в ультрафиолетовом свете.

Автоматические пипетки с переменным объемом до 10, 20–200, 100–1000 мкл.

Стерильные одноразовые наконечники с фильтром.

Стерильные пластиковые микропробирки объемом 1,5 и 0,2 мл.

Реагенты для проведения ПЦР

Набор для выделения ДНК из сыворотки крови.

Вода деионизованная, свободная от нуклеаз.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл).

10× буфер для *Taq* полимераза.

MgCl₂, 25 мМ раствор.

Маркер молекулярного веса 1 Кб.

Агароза Sea Kem.

Бромистый этидий 10 мкг/мл.

ТАЕ буфер ×50.

Буфер для загрузки образцов в гель (10 мМ Трис-НСl; 0,04% бромфеноловый синий; 0,04% ксилен цианол; 0,25% оранжевый Ж; 60% глицерин; 60 мМ ЭДТА)

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция предназначена для специалистов органов и учреждений системы Министерства здравоохранения, а также может быть использована лечебно-профилактическими учреждениями независимо от организационно-правовой формы, осуществляющими клинико-лабораторную диагностику и надзор за инфекционными заболеваниями.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Показания к применению:

- Клиническая диагностика парвовирусной В19 инфекции с целью выявления пациентов, подлежащих дальнейшему лабораторному обследованию для подтверждения диагноза.
- Лабораторная верификация диагноза «парвовирусная В19 инфекция».

Противопоказания для применения:

Предлагаемый метод противопоказаний не имеет.

Парвовирусная В19 инфекция — острое инфекционное заболевание преимущественно детского возраста, вызываемое парвовирусом В19 и характеризующееся разнообразными клиническими проявлениями.

Алгоритм клинической диагностики парвовирусной В19 инфекции у разных категорий пациентов

Клинико-лабораторные симптомы, выявление которых у детей требует лабораторного обследования на парвовирусную В19 инфекцию:

1. Мелко-пятнистая и/или пятнисто-папулезная сыпь на туловище, на наружной поверхности конечностей, на лице.
2. «Кружевной» характер сыпи.
3. «Симптом пощечин» (ярко-красная сливная сыпь на щеках).
4. Этапность высыпаний: появление элементов на туловище, конечностях (преимущественно сверху вниз) и исчезновение в той последовательности, в которой сыпь появлялась.
5. Ощущение «жара» в месте высыпаний, зуд.
6. Нормальная температурная реакция или субфебрильная лихорадка.
7. Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей (насморк, гиперемия слизистой оболочки зева, сухой кашель).
8. Нормальное самочувствие или умеренно выраженный интоксикационный синдром (слабость, головная боль, вялость).
9. Слабо выраженный гастроинтестинальный синдром (изменение характера стула, без патологических примесей, тошнота, рвота, боль в животе).
10. Лимфаденопатия (увеличение задне- и переднешейных, затылочных лимфатических узлов). Лимфоузлы не превышают в диаметре 1,5–2 см, слегка чувствительные, эластичные, подвижные.
11. Нормальные показатели в общем анализе крови либо умеренный палочко-ядерный сдвиг лейкоцитарной формулы влево.
12. Повышение С-реактивного протеина в сыворотке крови.

Клинико-лабораторные симптомы парвовирусной В19 инфекции у взрослых:

1. Фебрильный характер лихорадки.
2. Мелко-пятнистая и/или пятнисто-папулезная сыпь на туловище, на наружной поверхности конечностей, геморрагический характер высыпаний со скоплением в паховых, подмышечных областях, около локтевых суставов. Геморрагическая сыпь возникает через 1–2 дня после появления макуло-папулезной экзантемы.
3. Симптом «перчаток и носков».
4. Симметричное поражение мелких суставов (артриты) кистей, стоп, возможно одностороннее поражение крупных суставов (коленных, плечевых, локтевых, голеностопных).
5. Артралгии, миалгии.
6. Интоксикационный синдром.
7. Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей.
8. Нормальные показатели в общем анализе крови либо умеренный палочко-ядерный сдвиг лейкоцитарной формулы влево.
9. Повышение уровня С-реактивного протеина в сыворотке крови.
10. Транзиторное увеличение АЛТ в биохимическом анализе крови (<2N), ревматоидного фактора.

Клинико-лабораторные симптомы парвовирусной В19 инфекции у пациентов с сопутствующей гематологической патологией

1. Анемический синдром (преимущественно тяжелой степени).
2. Ретикулоцитопения или полное отсутствие ретикулоцитов в периферической крови.
3. Угнетение эритроидного ростка при исследовании пунктата костного мозга.
4. Лихорадка (фебрильная, субфебрильная).
5. Геморрагический характер сыпи.
6. Катаральный синдром со стороны верхних дыхательных путей.
7. Синдром общей интоксикации.
8. Среди лабораторных сдвигов у пациентов с острой парвовирусной В19 инфекцией на фоне гематологической патологии кроме анемии наиболее типичны: тромбоцитопения, повышение уровня печеночных ферментов и ревматоидного фактора в сыворотке крови, лейко- и нейтропения.

Клинико-лабораторные симптомы парвовирусной В19 инфекции у беременных:

1. Гемолитическая анемия плода.
2. Водянка плода.
3. Приобретенная сердечная недостаточность у плода.
4. Внутритробная гибель плода.

5. Спонтанный аборт или преждевременные роды, особенно после перенесенного острого экзантемного заболевания.

Парвовирусная инфекция может утяжелять течение **ревматических заболеваний**: системной красной волчанки (СКВ), ювенильного идиопатического артрита, васкулитов, ревматоидного артрита и т.д. При парвовирусной инфекции наблюдаются такие сходные с обострением СКВ клинические проявления, как артропатии преимущественно мелких суставов кистей, запястья без признаков деформации, лихорадка, сыпь, гепатит. Дифференциальная диагностика затрудняет наличие при парвовирусной инфекции ряда лабораторных сдвигов, типичных для СКВ: гемолитическая анемия, лейкопения, тромбоцитопения и др.

Парвовирусная В19 инфекция на фоне ревматоидного и ювенильного идиопатического артрита может вызывать обострение суставного синдрома, в некоторых случаях она предшествует манифестации ревматологического заболевания, а также рассматривается как триггер ревматоидного артрита.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ

Основу лабораторной диагностики парвовирусной инфекции составляют: определение в сыворотке крови вирусспецифических IgM антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) и выявление вирусной ДНК в сыворотке крови и других биологических жидкостях и тканях методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Сбор, транспортировка и хранение клинических образцов

Общая информация

Для серологического исследования (выявление IgM и IgG антител) может быть использована кровь, забранная как из вены, так и из пальца, а также образцы крови, высушенной на фильтровальной бумаге. IgM-антитела обнаруживаются в сыворотке крови с момента появления сыпи, поэтому проводить забор крови для серологического исследования можно, начиная с первого дня высыпаний. Выявление IgG может быть использовано для диагностики только в том случае, когда во втором из двух последовательно собранных образцов сыворотки (парные сыворотки) определяются специфические IgG, а в первом образце они отсутствовали, т.е. регистрируется сероконверсия к данной инфекции. Интервал между сбором парных сывороток — 10–12 дней.

Для вирусологического исследования пригодны сыворотка крови, мазки со слизистой оболочки носоглотки, слюна, костный мозг, синовиальная жидкость, ткани синовиальной оболочки, печени, сердца, амниотическая жидкость и т.д. Вирусная ДНК может выявляться в биологических жидкостях и тканях за 5–7 дней до появления сыпи и сохраняться длительное время, до нескольких недель и месяцев.

Информация по биологической безопасности

Клинические образцы потенциально могут содержать широкое разнообразие возбудителей инфекционных заболеваний, поэтому все манипуляции необходимо проводить с соблюдением правил работы с инфицированным материалом и использовать средства индивидуальной защиты.

Сбор, подготовка, транспортировка и хранение клинических образцов

Сыворотка крови

Заберите кровь в объеме 0,5–5 мл (для серологического исследования достаточно 0,5 мл крови, для вирусологического — 2–5 мл крови) из вены в вакутайнер или из пальца в стерильную центрифужную пробирку. После образования сгустка центрифугируйте кровь в течение 15 мин при 3000 об/мин для отделения сыворотки. Перенесите сыворотку в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке должны быть указаны имя или идентификационный номер пациента, дата забора и тип образца.

До исследования сыворотка может храниться и транспортироваться при +2–8 °С в течение 7 дней с момента забора. Более длительное хранение — при –20 °С.

Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания сыворотки крови, т.к. это оказывает разрушающее действие на специфические антитела и вирусные частицы и приводит к искажению результатов исследования.

Сухая капля крови

Для получения образца сухой капли крови используется фильтровальная бумага (например, Whatman № 3 для хроматографии или Schleicher and Schuell № 903). Могут использоваться коммерческие карточки, либо бумага должна быть предварительно размечена вручную или на лазерном принтере. Стандартный формат карточки включает 4–5 кружков диаметром 15 мм и размеченное место для записи данных пациента, идентификационного номера образца и даты его сбора (рис. 1).

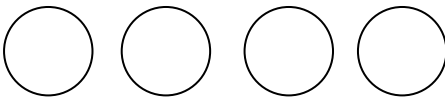
Имя:..... Дата рождения...../...../..... М/Ж
Лабораторный №


Рис. 1. Пример стандартной карточки для сбора образцов сухой капли крови

Процедура забора образца. Обработайте палец (или пятку в случае забора крови у младенца) спиртовым раствором и проколите скарификатором. На каждый кружок предварительно промаркированной карточки капните по 1–2 капли крови (можно взять кровь с помощью капилляра и внести ее на фильтровальную бумагу до заполнения кружка). Если полученного объема крови недостаточно, чтобы заполнить все кружки, для одного исследования следует заполнить кровью один кружок.

Тщательно высушите фильтровальную бумагу с образцами не менее 60 мин при комнатной температуре, используя для этого коммерческие штативы или аналогичные приспособления. Высушивание стабилизирует IgM антитела и снижает риск бактериальной контаминации образца. Не допускается высушивание капель крови путем их нагревания!

Упакуйте каждую карточку с образцом индивидуально в герметично закрывающийся пластиковый пакет. Карточки с тщательно высушенными образцами крови более *не являются* биологически опасными веществами и не попадают под действие международных норм перевозки опасных грузов. Их транспортировку можно осуществлять при температуре окружающей среды. Образцы допустимо хранить при температуре +4 °С в течение 1 мес., более длительное хранение осуществляется при –20 °С.

Мазки со слизистой оболочки носоглотки

Мазок (или образец слюны) может быть получен с использованием коммерческих наборов для сбора образцов в вирусологических исследованиях в соответствии с рекомендациями производителя набора. **Не используйте наборы для сбора образцов в бактериологических исследованиях!** При отсутствии коммерческих наборов используйте стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Для забора образца поместите тампон между щекой и десной и удерживайте до полного намочания, при этом аккуратными движениями потирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Внесите тампон в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды (Приложение А), обломайте палочку и плотно укупорьте пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре +2–8 °С в течение 48 ч после сбора.

Если доставка образца в лабораторию будет произведена в течение 2 ч после сбора, допустимо поместить тампон с образцом в сухую стерильную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. В лаборатории в пробирку необходимо добавить 2 мл вирусной транспортной среды и оставить на 1 час при +2–4 °С для элюирования вируса.

В лаборатории извлеките тампон из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Полученную суспензию хранят при +4 °С не более 48 ч, длительное хранение — при –70 °С. Не допускайте повторного замораживания-оттаивания образца или длительного хранения при –20 °С, так как это оказывает повреждающее действие на вирус.

Лабораторное исследование на парвовирусную инфекцию

Выявление специфических антител к парвовирусу В19 методом ИФА

ИФА тест-системы для диагностики парвовирусной инфекции основаны на принципе твердофазного непрямого ИФА или на принципе связывания IgM антител.

Принцип непрямого ИФА состоит в том, что антитела к парвовирусу В19, содержащиеся в исследуемом образце, комплементарно связываются с антигенами парвовируса, сорбированными на носителе. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляется с помощью антител против иммуноглобулинов человека, конъюгированных с ферментом пероксидазой. Добавленный в реакцию краситель (субстрат) окисляется, приобретая окрашивание, степень которого зависит от количества специфических антител в исследуемом образце и может быть измерена фотометрически. В образцах, не содержащих специфических антител, окрашивания не происходит. Этот вариант ИФА для выявления IgM антител требует удаления из сыворотки крови IgG антител, которые могут взаимодействовать с ревматоидным фактором в случае присутствия его в образце, и давать ложноположительные результаты исследования. С этой целью исследуемая сыворотка крови предварительно соединяется с абсорбентом ревматоидного фактора.

В модификации ИФА, основанной на захвате IgM антител, сорбированные на твердой фазе антитела к IgM человека связываются с присутствующими в сыворотке крови IgM. Далее к образовавшемуся комплексу добавляется антиген парвовируса В19, конъюгированный с пероксидазой. В случае специфического связывания, образовавшийся комплекс выявляется при окислении пероксидазой добавленного в реакцию красителя. Абсорбент ревматоидного фактора не используется.

Тест-системы, основанные на захвате IgM антител, обладают наибольшей чувствительностью и специфичностью в сравнении с методом непрямого ИФА, поэтому для диагностики инфекции их использование считается предпочтительным. Для выявления IgG антител в одинаковой степени пригодны обе разновидности ИФА.

Исследование в ИФА должно проводиться строго в соответствии с инструкцией производителя тест-системы.

Выявление ДНК парвовируса В19 методом ПЦР

Общие указания

- Для проведения ПЦР используйте пластиковые одноразовые пробирки «Эппендорф» объемом 0,5 или 0,2 мл в зависимости от типа амплификатора.
- До начала работы подпишите пробирки в соответствии с исследуемыми и контрольными образцами.

- Обязательно используйте положительный и отрицательный контрольные образцы при каждой постановке реакции.
- Все стадии приготовления реакционных смесей для ПЦР должны проходить на холоде.
- Готовьте реакционные смеси из расчета количества образцов $n+1$ (где n — количество исследуемых проб, включая положительный и отрицательный контроли). После добавления всех реагентов реакционную смесь необходимо хорошо перемешать с помощью вортекса, затем осадить образовавшиеся капли центрифугированием.
- Используйте отдельный одноразовый наконечник для внесения каждого образца.
- Избегайте перекрестной контаминации образцов! Открывайте следующую пробирку с образцом только при условии, что закрыта предыдущая.

Выделение ДНК из клинического материала

ДНК из клинического образца выделяется стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Детекция ДНК парвовируса В19 в клинических образцах с помощью ПЦР

Для выявления ДНК парвовируса В19 применяется «гнездовой» вариант ПЦР, включающий два раунда амплификации. Размер полученного фрагмента составляет 1168 н.о. (NS1/VP1и область генома парвовируса В19).

Для проведения первого раунда амплификации используются праймеры 5' САСТАТGAAAАСТGGGCAA 3' (e1855 f) и 5'-GGGAАСТТССGGCAAАСТТССТТG-3' (В19-R1). Состав реакционной смеси представлен в табл. 1. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Пробирки с реакционной смесью помещают в программируемый термоциклер, где проводится амплификация по заданной программе (табл. 2).

Таблица 1

Состав реакционной смеси для проведения первого раунда ПЦР

	Реагент	Количество на 1 пробу
1.	10X ПЦР-буфер	3 мкл
2.	Прямой праймер e1855 f, 20 пмоль	1 мкл
3.	Обратный праймер В19-R1, 20 пмоль	1 мкл
4.	Смесь дНТФ, 10 мМ	0,5 мкл
5.	MgCl ₂ 25 ммоль	2 мкл
6.	ДНК-полимераза 5 Ед/мкл	1 мкл
7.	Деионизованная вода	Мкл
8.	ДНК	5 мкл

Таблица 2

Режим амплификации для первого раунда ПЦР

	Температура	Время
1.	94 °С	5 мин
2.	94 °С	30 с
3.	55 °С	30 с
4.	72 °С	1 мин 30 с
Провести 40 циклов для стадий 2–4		
5.	72 °С	5 мин

При проведении второго раунда амплификации в качестве матрицы используется 1 мкл ДНК, синтезированной в первом раунде. Для второго раунда используются праймеры 5'-AAACTGGGCAATAAАСТАСАС-3' (e1863f) и 5'-GТАGТСТТТТАСТАСТТGТGСТТG-3' (B19-R2). Состав реакционной смеси для проведения второго раунда амплификации представлен в табл. 3. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

Пробирки с реакционной смесью помещаются в программируемый термоциклер; амплификация проводится по заданной программе (табл. 4).

Таблица 3

Состав реакционной смеси для второго раунда ПЦР

	Реагент	Количество на 1 пробу
1.	10X ПЦР-буфер	3 мкл
2.	Прямой праймер e1863f, 20 пмоль	1 мкл
3.	Обратный праймер B19-R2, 20 пмоль	1 мкл
4.	Смесь дНТФ, 10 мМ	0,5 мкл
5.	MgCl ₂ 25 ммоль	2 мкл
6.	ДНК-полимераза 5 Ед/мкл	1 мкл
7.	Деионизованная вода	Мкл
8.	ДНК-продукт 1 раунда	1 мкл

Таблица 4

Режим амплификации для второго раунда ПЦР

	Температура	Время
1.	94 °С	5 мин
2.	94 °С	30 с
3.	58 °С	30 с
4.	72 °С	1 мин 30 с
Провести 40 циклов для стадий 2–4		
5.	72 °С	5 мин

Анализ продуктов амплификации

Контроль наличия продуктов амплификации проводится методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 110 мА в течение 3 0мин. Учет флюоресценции бромистого этидия, связанного с ДНК-фрагментами, проводится в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Результаты интерпретируют путем сравнения наличия и размеров продуктов ПЦР в исследуемых пробах и образцах положительного контроля, а также соответствия размера синтезируемого фрагмента маркеру молекулярной массы (рис. 2). Наличие в положительном контроле полосы, соответствующей фрагменту 1168 н.о. и ее отсутствие в отрицательном контроле свидетельствуют о правильно проведенной реакции.

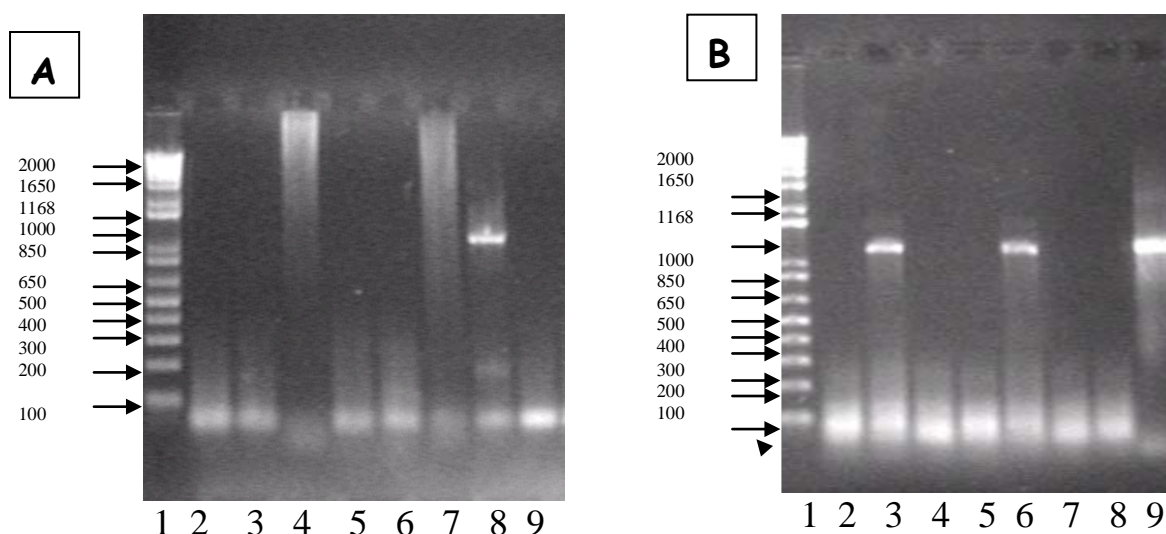


Рис. 2. Электрофореграмма первого (А) и второго (В) раунда амплификации ДНК парвовируса В19. 1 — ДНК-маркер молекулярной массы, 2–7 — исследуемые образцы, 8–9 — контрольные образцы (А: 8 — положительный контроль, 9 — отрицательный контроль; В: 8 — отрицательный контроль, 9 — положительный контроль).

Возможные осложнения при проведении ПЦР и их причины

Осложнения	Возможные причины и их устранение
Все реакции отрицательны, включая положительный контроль	Пропущен компонент реакции; использован неподходящий режим амплификации; непригоден реагент (реагенты)
Нет ампликона в положительном контроле, но реакция положительна с исследуемыми пробами	ДНК контрольного образца деградировала или не была добавлена
Ампликон в пробе отрицательного контроля	Вода или реагенты контаминированы амплифицированной ДНК

Приготовление вирусной транспортной среды

Состав:

- основной раствор Хенкса рН 7,4 с ХЕПЕС буфером (10X);
- бычий сывороточный альбумин;
- раствор антибиотиков;
- 0,4%-й раствор фенолового красного.

Растворите 2,0 г бычьего сывороточного альбумина в 100 мл дистиллированной воды. Добавьте к 80 мл дистиллированной воды 10 мл основного раствора Хенкса, затем 10 мл приготовленного 0,2%-го раствора бычьего сывороточного альбумина и 0,2 мл раствора фенолового красного. Стерилизуйте фильтрованием. Добавьте 1 мл раствора антибиотиков.

Раствор антибиотиков: растворите 10^6 ЕД пенициллина и 1,0 г стрептомицина в 100 мл стерильного фосфатного буферного раствора. Разлейте во флаконы по 5 мл и храните при -20°C . Добавление 1 мл этого раствора к 100 мл питательной среды позволяет получить рабочий раствор с окончательной концентрацией 100 ЕД пенициллина и 100 мкг стрептомицина в 1 мл раствора.

В качестве транспортной среды можно использовать стерильный фосфатно-солевой буфер с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2% сыворотки эмбрионов коров или любую питательную среду для культур клеток.