

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
НАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА
ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ
ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Методические рекомендации

г. Екатеринбург
1995

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
НАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель Председателя
Госкомсанэпиднадзора РФ

Г.Г.Онищенко

" 28 " ноября 1994г.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА
ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ
ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Екатеринбург, 1995г.

Методические рекомендации составлены на основе многолетнего опыта Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций по разработке и внедрению лекарственного препарата для диагностики заболеваний, вызываемых вирусом простого герпеса. Препарат выпускается с 1989 года и нашел широкое применение в работе вирусологических лабораторий санэпидслужбы и здравоохранения.

В рекомендациях представлены способы взятия материала, правила приготовления и окраски мазков, их просмотр и интерпретация результатов.

Составители: Савушкина В.К., Нefедова О.А., Асташенков С.П.,
Глинских Н.П.

Настоящие методические рекомендации предназначены для специалистов центров госсанэпиднадзора, НИИ и клиник, занимающихся диагностикой герпетической инфекции.



Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций,
1996

ВВЕДЕНИЕ

Герпетическая инфекция занимает большое место в инфекционной патологии человека. Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает кератиты, конъюнктивиты и увеиты, энцефалиты и невриты, стоматиты и гингивиты, экземы и дерматозы, поражения слизистых губ, горла, глотки, пищевода, половых органов, а также изменения внутренних органов. Установлено значение ВПГ во внутриутробной патологии плода и заболеваниях новорожденных, нередко заканчивающихся летальностью. Все более подтверждается этиологическая роль ВИГ при злокачественных новообразованиях человека.

Герпетическая инфекция протекает в острой и хронической формах, являясь, по-видимому, самым распространенным вирусным заболеванием человека, с большим разнообразием как клинических проявлений, так и тяжести течения. Такое многообразие процесса по локализации и клиническим проявлениям, наличие необычных, атипичных и странных форм, длительное носительство вируса создают повсеместно болезнью трудности в диагностике заболевания. В связи с этим значительная роль принадлежит лабораторной диагностике. Однако вирусологические и серологические исследования трудоемки, длительны, носят ретроспективный характер и для большинства практических лабораторий недоступны. Поэтому наиболее подходящим экспресс-методом диагностики герпетической инфекции является метод иммунофлюоресценции (ИФ), позволяющий дать ответ в день взятия пробы, практически через 2-3 часа.

I. Техника взятия материала и приготовления препаратов

Необходимы: стерильные ватные тампоны на палочках, пробирки с 1,5-2 мл забуференного физиологического раствора (рН 7,2-7,4), скальпель, фоллимановская ложка, сбезжиренные предметные стекла, охлажденный химически чистый ацетон.

В связи с разнообразием локализаций поражений техника взятия материала несколько варьирует.

Герпес губ и носа. Материал забирают стерильным ватным тампоном с характерными везикулами и делают отпечаток на предметном стекле. Тампон можно также тщательно промыть и отжать в 2 мл физраствора, который затем отцентрифугировать, а из осадка при-

готовить мазок.

Поражение кожи и видимых слизистых. Материал забирают аналогично вышеописанному.

Острый и хронический стоматиты и гингивиты. Клетки плоского эпителия полости рта снимают 3-4-кратным проведением ватным тампоном с небольшим усилием как с участков поражения, так и с непораженной слизистой. Готовят мазки-отпечатки с тампона, а также после промывки его в физрастворе и центрифугирования – из осадка.

Острый и хронические кератиты и конъюнктивиты. Соскобы с помощью небольшого тупого скальпеля берут с конъюнктивы верхнего и нижнего века и верхней переходной складки при двойном ее вывороте после предварительной инстилляции 0,5%-ного раствора дикапана. Стерилизацию скальпеля осуществляют троекратным погружением его в этиловый спирт и прожиганием на спиртовке. Материал растирают на предметном стекле другим стеклом.

Герпес половых органов. Материал для исследования берется со дна везикул и эрозии с помощью фолькмановской ложки или скальпеля. Мазки готовят путем растирания на предметном стекле.

При сочетании герпеса с ОРЗ материал для исследования забирают стерильным ватным тампоном из нижнего носового хода. При этом вводят тампон легкими вращательными движениями на глубину около 3 см от края носового отверстия, слегка сжимая крылья носа. Можно сделать отпечатки тампоном на предметном стекле или поместить его в пробирку с физраствором, хорошо ополоснуть, отжать, раствор отцентрифугировать, а из осадка приготовить мазки.

Герпетический ангиофалит или менингоэнцефалит. Взятую при пункции спинномозговую жидкость центрифицируют и из осадка готовят мазки на предметных стеклах.

Секционный материал. Кусочки внутренних органов, спинного и головного мозга размorum 1-3 куб.см иссякают по возможности в более короткие сроки. С них делают отпечатки на хорошо обезжиренных предметных стеклах.

Подготовление клеточных тест-препараторов.

Все вышеизложенные материалы можно использовать и для заражения клеточных культур. В этом случае в материал сразу же добавляют смеси антибиотиков: 5000 Ед/мл пенициллина и по 1(10) Ед/мл стрептомицина и макостатина. Наиболее доступной и достаточно чувствительной является клеточная культура фибробластов

эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки ФЭЧ, полученные трипсинацией по общепринятой методике, разводят в 0,5%-ном растворе гидролизата лактальбумина с 10% нативной сыворотки крупного рогатого скота, разводят до 1 млн. клеток в объеме 1 мл и разливают в пробирки с покровными стеклами (10x18 мм). Через 48-72 часа сформированный монослой клеток заражают исходным материалом по 0,1 мл на пробирку, используя в качестве среды поддержания среду I99 (рН 7,6). На каждую пробу материала берут по 4 пробирки.

Оценка результатов проводится по 4-х плюсовой системе.

После наступления дегенеративных изменений в клетках хотя бы на I(+) стекла извлекают, ополаскивают в забуференном растворе (рН 7,4) и подсушивают при комнатной температуре (18-20⁰С).

Срок наблюдения за проявлением цитопатического действия (ШД) - 7 суток.

Все приготовленные препараты - мазки, отпечатки, стекла с клетками - фиксируют в охлажденном химически чистом ацетоне 10-15 минут при комнатной температуре или в рефрижераторе (+4 +6⁰С).

2. Флюоресцирующие иммуноглобулины и проверка их красящих свойств

Для окраски приготовленных препаратов используют флюоресцирующие иммуноглобулины в рабочем разведении. Указанные на этикетке разведение является в определенной мере ориентировочным, поэтому рабочее разведение рекомендуется подбирать опытным путем.

Проверку красящих свойств флюоресцирующих иммуноглобулинов производят на клетках ФЭЧ, зараженных и незараженных вирусом. Клетки ФЭЧ готовят и разливают в пробирки с покровными стеклами, как описано выше в разделе I. По достижении монослоя в описаные пробирки вносят по 0,1 мл вируссодержащей суспензии эпендиомного штамма вируса простого герпеса. После начала дегенерации на одни плюс стекла извлекают, споласкивают в забуференном физрастворе и подсушивают при комнатной температуре. Таким же образом готовят контрольные незараженные клетки ФЭЧ на покровных стеклах. Оба типа препаратов фиксируют в охлажденном химически чистом ацетоне.

Зараженные и незараженные стекла монтируют на предметном стекле при помытии полоски лейкопластиря. Готовят двойчатые разведения флюоресцирующих иммуноглобулинов на забуференном физрастворе с добавлением родамина, меченого альбумином в рабочем разведении, указанном на этикетке. По калле каждого разведения наносят на 2 зараженных и 2 незараженных стекла, выдерживают их во влажной камере (чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне) 30 минут при 30⁰С. Затем промывают в двух смесях забуференного физраствора (рН 7,2-7,4) по 10 минут и споласкивают дистиллированной водой.

Готовые препараты просматривают в люминесцентном микроскопе МЛ-2, МЛ-3, МЛД, ЛКММ с нефлюоресцирующим маслом (объектив МИх70, окуляр х5) или дистиллированной водой (объектив ВИх70, окуляр х5) и фильтрами: ФС-1-2, СЗС-7-2, БС-15-2 и запирающим фильтром - 2.

В контрольных незараженных препаратах наблюдается слабое желтоватое свечение, а в зараженных - в ядре и реже в цитоплазме клеток выявляется желто-зеленое специфическое свечение. Постепенное разведение флюоресцирующих иммуноглобулинов, при окраске которым в клетках наблюдается отчетливая специфическая флюоресценция, ясно отличающаяся от свечения контрольного препарата, считается красящим титром. Для окраски мазков от больных используется рабочее разведение - в два раза концентрированное красящего титра.

3. Техника окраски препаратов, предназначенных для выявления и идентификации ВПГ

Фиксированные препараты помещают во влажную камеру, на них наносят по 1-2 капли флюоресцирующих иммуноглобулинов в рабочем разведении, выдерживают 30 минут при 37⁰С, промывают в двух смесях охлажденного до +4⁰С забуференного физраствора^{x)} (рН 7,2-7,4) по 10 минут и споласкивают дистиллированной водой.

^{x)}Методика приготовления забуференного физраствора (рН 7,2-7,4):
А. В 3,7 л дистиллированной воды растворить натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na_2HPO_4) - 4,58г, натрия хлористого ($NaCl$) - 22,95г.

Б. В 0,3л дистиллированной воды растворить калия фосфорнокислого однос замещенного (KH_2PO_4) - 0,41г, натрия хлористого ($NaCl$) - 2,55г.

В. К раствору А добавить раствор Б порциями, перемешивая и контролируя рН до получения 7,2-7,4.

Изложенный режим окраски обеспечивает оптимальные условия для проникновения флюоресцирующих иммуноглобулинов в клетку, соединения их с антигеном и удаления непрореагировавших флюоресцирующих антител.

4. Микроскопия препаратов и оценка результатов

Окрашенные препараты просматривают в люминесцентном микроскопе типа: МЛ-2, МЛ-3, МЛД, ЛСМАМ в падающем свете с фильтрами ФС-1-2, СЗС-7-2, БС-15-2 и запирающим - 2. При просмотре пользуются нефлюоресцирующим маслом (объектив МИх9С, окуляр х5) или дистиллированной водой (объектив ВИх70, окуляр х5).

Просматривая препараты, обращают внимание на количество и строение клеток, наличие слизи, лейкоцитов, клеточного детрита. Во избежание ошибочных результатов учитывают лишь клетки с сохранившейся структурой (четко различимыми ядром и цитоплазмой) и ясно видимой желтовато-зеленой специфической флюоресценцией в ядрах, реже - в цитоплазме клеток. Положительный результат регистрируется, если в препарате содержится не менее трех клеток с флюоресцирующими включениями. Свечение слизи, лейкоцитов и клеточного детрита не имеет диагностического значения.

В повседневной диагностической работе в качестве контрольных используют препараты, приготовленные из материала того же больного, но окрашенные флюоресцирующими иммуноглобулиниами к другим вирусам. При этом необходимо помнить о возможности обнаружения смешанных форм вирусной инфекции. ИФ-диагностика наиболее эффективна при обследовании больных в острой стадии и в более ранние сроки. В стадии выздоровления обнаружить вирусный антиген, как правило, не удается.

Отрывной лист учета эффективности использования
методических рекомендаций

Направить в отделение планирования и внедрения Екатеринбург-
ского НИИ вирусных инфекций (620030, г.Екатеринбург, ул.Летняя,23).

1. Методические рекомендации: "Иммунофлюоресцентная диагностика
заболеваний, вызываемых вирусом простого герпеса".

2. Заместителем Председателя ГК СЭИ РФ Ошищенко Г.Г. 28.11.94г.
(кем и когда утвержден)

3. _____
(кем и когда получен)

4. Количество центров госсанэпиднадзора и лечебно-профилактиче-
ских учреждений, которые внедрили метод диагностики, предло-
женный данным документом _____

5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка спе-
циалистов, сообщения и пр.) и результаты применения метода
(количество наблюдений за I год и эффективность)

6. Замечания и пожелания _____

Подпись _____
(должность, Ф.И.О. лица, заполнившего карту)

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА
ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ
ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Методические рекомендации

Лицензия на издательскую
деятельность
№ 020672
7 декабря 1992 г.

ПОДПИСАНО К ПЕЧАТИ 29.08.95 г. ФОРМАТ 60 x 84 I/I6
ОБЪЕМ 0,5 ПЕЧ.Л. ТИГАЗ 300 экз. ЗАКАЗ 812

Цех № 4 АО "Полиграфист", 620219 Екатеринбург, ул. Туровская, 20