ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
НАДЗОРА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Методические рекомендации

г.Екатеринбург
1995

gost.e-ecolog.ru

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 люминесцирующего 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., Нефедова О.А., Астапенков 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, гортани, глотки, пищевода, половых органов, а также изменения внутренних органов. Установлено значение ВПГ во внутриутробной патологии плода и заболеваниях новорожденных, нередко заканчивавшихся летально. Все более подтверждается этиологическая роль ВПГ 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 стертых форм, длительное носительство вируса создают повсеместно большие 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 проби, 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 (pH 7,2-7,4), скальпель, фолькмановская ложка, обезжиренные предметные стекла, охлажденный химически чистый ацетон.

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

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

готовить мазок.

Поражения кожи и видимых слизистых. Материал забирают аналогично вышеописанному.

Острые и хронические 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.

Острые и хронические кератиты и конъюнктивиты. Соскоби с помощью небольшого тупого скальпеля берут с конъюнктивы верхнего и нижнего век и верхней переходной складки при двойном ее выворота после предварительной инстилляции 0,5%-ного раствора дикаина. 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 энцефалит или менингоэнцефалит. Взятую при пункции спинномозговую жидкость центрифугируют и из осадка готовят мазки на предметных стеклах.

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

Приготовление клеточных тест-препаратов.

Все вышеперечисленные материалы можно использовать и для заражения клеточных культур. В этом случае в материал сразу же добавляют смесь антибиотиков: 5000 Ед/мл пенициллина и по 1000 Ед/мл стрептомицина и микостатина. Наиболее доступной и достаточно чувствительной является клеточная культура фибробластов

эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки ФЭЧ, полученные трипсинизацией 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 (10х18 мм). Через 48-72 часа сформированный монослой клеток заражают исходным материалом по 0,1 мл на пробирку, используя в качестве среды поддержания среду 199 (pH 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 1(+) стекла извлекают, ополаскивают в забуференном растворе (pH 7,4) и подсушивают при комнатной температуре (18-20°С).

Срок наблюдения за проявлением цитопатического действия (ЦПД) - 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 +6°С).

## 2. Флюоресцирующие иммуноглобулины и проверка их красящих свойств

Для окраски приготовленных препаратов используют флюоресцирующие иммуноглобулины в рабочем разведении. Указанное 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 1. По достижении монослоя в опытные пробирки вносят по 0,1 мл вируссодержащей суспензии эталонного штамма вируса простого герпеса. После начала дегенерации на один 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 помощи полоски лейкопластыря. Готовят двукратные разведения флюоресцирующих иммуноглобулинов на забуференном физрастворе с добавлением родамина, меченого альбумином в рабочем разведении, указанном на этикетке. По капле каждого разведения наносят на 2 зараженных и 2 незараженных стекла, выдерживают их во влажной камере (чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумажкой на дне) 30 минут при 30°С. Затем промывают в двух сменах 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, ЛЮМАМ с нефлюоресцирующим маслом (объектив МИх90, 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. Последнее 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 концентрированнее 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 37°С, промывают в двух сменах охлажденного до +4°С 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 2,7 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 однозамещенного ($KH_2PO_4$) - 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, ЛЮМАМ в падающем свете с фильтрами ФС-I-2, СЗС-7-2, БС-I5-2 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 сохраненной 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 иммуноглобулинами 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 Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (620030, г.Екатеринбург, ул.Летняя,23).

1. Методические рекомендации: "Иммунофлюоресцентная диагностика заболеваний, вызываемых вирусом простого герпеса".
2. Заместителем Председателя ГК СЭН РФ Онищенко Г.Г. 28.11.94г.
(кем и когда утвержден)
3. _____
(кем и когда получен)
4. Количество центров госсанэпиднадзора и лечебно-профилактических учреждений, которые внедрили метод диагностики, предложенный данным документом _____
_____
5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка специалистов, 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
ЛР № 020672
7 декабря 1992 г.

ПОДПИСАНО К ПЕЧАТИ 29.08.95 г. ФОРМАТ 60 x 84 1/16
ОБЪЕМ 0,5 ПЕЧ.Л. ТИРАЖ 300 экз. ЗАКАЗ 812

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

gost.e-ecolog.ru