

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Р. А. Часнойть

10.08.2009 г.

Регистрационный № 008-0209

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРСИСТЕНЦИИ
ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ В БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ
ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕПАТИТАХ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Витебский государственный медицинский университет»

УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое
бюро»

УЗ «Витебская областная клиническая инфекционная больница»

АВТОРЫ:

Голубцов В.В., ассистент кафедры патологической анатомии

Крылов Ю.В., начальник Витебского областного клинического
патологоанатомического бюро, д.м.н., профессор

Семенов В.М., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней

Стычевская Е.В., врач Витебской областной клинической
инфекционной больницы

Витебск, 2008

Проблема смешанных вирусных инфекций все больше привлекает к себе внимание исследователей. Уже установлена возможность возникновения смешанных вирусных инфекций и выявлена роль ВПГ I типа в течении таких острых вирусных респираторных заболеваний как грипп, парагрипп и аденовирусная инфекция. Показана возможность экспериментального моделирования герпетической пневмонии и изучены морфологические и эпидемиологические особенности поражения легких вирусом простого герпеса. Также был проведен мониторинг инфицированности ДНК-вирусами семейства Herpesviridae, в частности вирусами простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловирусами (ЦМВ) и их роль у больных туберкулезом легких, хроническим бронхитом и пневмониями, установлена частота развития активных и латентных форм вирусной инфекции. В тоже время роль герпес-вирусов в течении хронических диффузных поражений печени в т.ч. при вирусных гепатитах остается практически не изученной.

В связи с вышеизложенным целью настоящей инструкции явилась разработка оптимального алгоритма диагностики персистенции герпетической инфекции в биоптатах печени при хронических гепатитах.

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ,
МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ,
ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И
ИНСТРУМЕНТАРИЯ:**

Для проведения иммуногистохимического метода (ИГХМ) «in vitro».

1. Батарея емкостей для депарафинизации и регидратации (стаканы с притертой крышкой объемом 150-200мл) 10шт;

2. Стеклянные стаканы 100-150мл. 5 шт. В них производится промывка срезов на различных этапах ИГХ;
3. Пластиковый планшет с крышкой для выполнения ИГХ – окрашивания размерами 25×20×30см. 1 шт. (можно использовать фотованночки);
4. Пробирки пластиковые с крышками или стеклянные флаконы с закручивающимися пробками объемом 1-2мл 50 шт. (для хранения разведенных антител и ДАБ хромогена);
5. Пробирки обычные 5-10мл для разведения антител;
6. Стеклянные емкости с закручивающейся крышкой объемом 1-2 литра 2шт. (для хранения разведенных буферных растворов);
7. Стеклянные контейнеры из термостойкого стекла и вертикальными ячейками для предметных стекол 3 шт. (для проведения демаскировки в водяной бане или микроволновке) если нет, то можно использовать обыкновенные стеклянные термостойкие стаканы предварительно надев на верхнюю часть стекол резинки, чтобы стекла не слипались);
8. Водяная баня с регулируемой температурой 80-100 С (можно использовать обыкновенную кастрюлю или стерилизатор для шприцов и самому контролировать температуру);
9. Гидрофобный карандаш для ИГХ;
10. Лабораторный Ph-метр;
11. Термостат 58-60 С;
12. Автоматические пипеточные дозаторы с набором наконечников: малого объема 0,5 – 10мкл 1 шт. среднего объема 1-50, 20-200 по 1 шт. большого объема до 1000 мкл, до 5000 мкл 1 шт. и набор наконечников к ним;

13. Холодильник с морозильным отсеком.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Биоптаты печени с установленным (или подозрением) диагнозом хронического гепатита при наличии морфологических маркеров герпетической инфекции с целью определения типа вируса, а также стадии процесса персистенции (активная, латентная), что имеет большое значение для последующего назначения медикаментозной терапии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Поскольку исследование выполняется «in vitro» и ни один из компонентов диагностических наборов в организм пациентов не вводится противопоказаний к проведению исследования нет.

При взятии материала (биоптаты печени) следует руководствоваться общими противопоказаниями к пункционной биопсии печени.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И УРОВЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ

Данная инструкция предназначена для применения в патологоанатомических отделениях при исследовании биоптатов печени с целью оптимизации диагностики персистенции герпетической инфекции, а также необходима к использованию врачами-инфекционистами и врачами-гастроэнтерологами с целью правильной интерпретации полученных морфо-лабораторных данных и более эффективному использованию в последующем медикаментозных препаратов.

ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ПЕРСИСТЕНЦИИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ В ПЕЧЕНИ

1. Гистологический. Заключается в выявлении внутриядерных герпетических включений I (крупные гиперхромные ядра) и/или II (появление вакуолей с мелкими базофильными или эозинофильными включениями) типов. Причем преобладание включений I типа характерно для острого течения болезни (активная фаза персистенции), преобладание включений II типа характерно для хронического течения болезни (латентная фаза персистенции). Наличие одновременно внутриядерных герпетических включений обоих типов свидетельствует об острой фазе процесса на фоне признаков хронического течения. Результативность гистологического метода достаточно высока и достигает 96-99%. Данный метод диагностики является ведущим, поэтому при отрицательных лабораторных методах диагностики (МФА, иммуногистохимический) диагноз устанавливается на основании обнаружения морфологических признаков герпетической инфекции, а положительные лабораторные методы диагностики без морфологических признаков инфекционного процесса не являются диагностическими.

2. Иммуногистохимический метод (ИГХ). Метод морфологической диагностики, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопа результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированной ткани.

Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген-антитело, является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате

(окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов). Метод является высокоспецифичным и высокочувствительным, что оправдывает его высокую стоимость. Кроме того, данный метод позволяет не только идентифицировать тип инфекционного агента, но и определить фазу процесса, что имеет существенную роль для определения тактики лечения, а также позволяет определить характер патологического процесса в плохо сохранившихся биоптатах или биоптатах с недостаточным объемом материала.

Таким образом, в отличии от других методов диагностики герпетической инфекции для получения точного, информативного результата наиболее подходящим является иммуногистохимический метод, практически лишённый недостатков, за исключением высокой стоимости. Метод ПЦР-исследования, хоть и является относительно недорогим и высокоспецифичным, но сопрягается с рядом трудностей в заборе, хранении и приготовлении материала, что не может быть использовано для скринингового исследования. Самый дешёвым методом исследования является МФА, однако специфичность и чувствительность его далеко уступает двум предыдущим.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоптаты печени фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течении до 12 часов при температуре 37°C. Окрашивание препаратов производилось стрептавидин – биотиновым методом с поликлональными антителами к ВПГ-1 и ВПГ-2 с использованием визуализирующей системы LSAB 2 System Peroxidase (DAKO, USA). В качестве хромогена использовался диаминобензидин . Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по наличию

специфического продукта - желтовато-коричневого окрашивания ядра, цитоплазмы и цитоплазматической мембраны: 0- нет специфической окраски, (+ -) 1-2 клетки позитивно окрашены, (+) – 1-10% позитивно окрашенных клеток, (++) – 10-50% позитивно окрашенных клеток, (+++) – более 50% клеток позитивно окрашены.

Протокол непрямого иммунопероксидазного метода

1. Приготовить парафиновые срезы, провести депарафинирование и обезвоживание по стандартной методике. Из воды стекла со срезами поместить в ТБС.*
2. Заблокировать эндогенную пероксидазную активность, поместив срезы на 20 мин в стакан с 1% раствором перекиси водорода.
3. Промыть в ТБС.
4. Удалить лишнюю жидкость вокруг срезов и раскапать на срезы 20% неиммунную сыворотку животного –донора (мышинные) вторичных антител. Инкубировать во влажной камере 20-30мин.
5. Стряхнуть сыворотку и раскапать на срезы первичные (кроличьи) антитела в рабочем разведении. Инкубировать во влажной камере 30-60мин.
6. Промыть в трех сменах ТБС.
7. Удалить лишнюю жидкость вокруг срезов и раскапать вторичные (мышинные) антитела (конъюгированные с пероксидазой хрена антитела против Ig животного (кролика) – донора первичных антител). Инкубировать 20-30 мин во влажной камере.
8. Промыть в трех сменах ТБС.
9. Раскапать на срезы раствор амино-этилкорбазола с перекисью водорода. Инкубировать 5-15 мин.
10. Промыть водой, докрасить ядра гематоксилином и заключить в глицерин-желатину.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

- Если антиген плохо выявляется на парафиновых срезах, то после регидратации необходимо провести демаскировку антигенов либо по протоколу NIAR, либо с протеолитическими ферментами. Затем следовать протоколу окраски с пункта 2.
- Если вы работаете с моноклональными первичными антителами и хотите интенсифицировать иммуногистохимическое окрашивание, то в п. 7 вы можете использовать кроличьи антитела против Ig мыши, конъюгированные с пероксидазой, а после промывки в ТБС (п. 8) раскапать третичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (свиные или козы), против Ig кролика. Инкубировать 20-30 мин во влажной камере, а затем пп. 8,9 и 10 базисного протокола.

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПЕРСИСТЕНЦИИ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ В БИОПТАТАХ ПЕЧЕНИ

Алгоритм диагностики персистенции герпетической инфекции в биоптатах печени включает несколько этапов. На первом этапе – гистологическом устанавливается факт наличия или отсутствия внутриядерных герпетических включений I и / или II типов. На втором этапе – только при наличии морфологических маркеров герпетической инфекции с помощью дополнительных лабораторных методов (МФА, ПЦР, иммуногистохимический) определяется этиология инфекционного процесса (вирус простого герпеса 1 и / или 2 типа), стадия процесса (активная, неактивная), а также выявляется фаза процесса (острая, хроническая, обострение хронической).

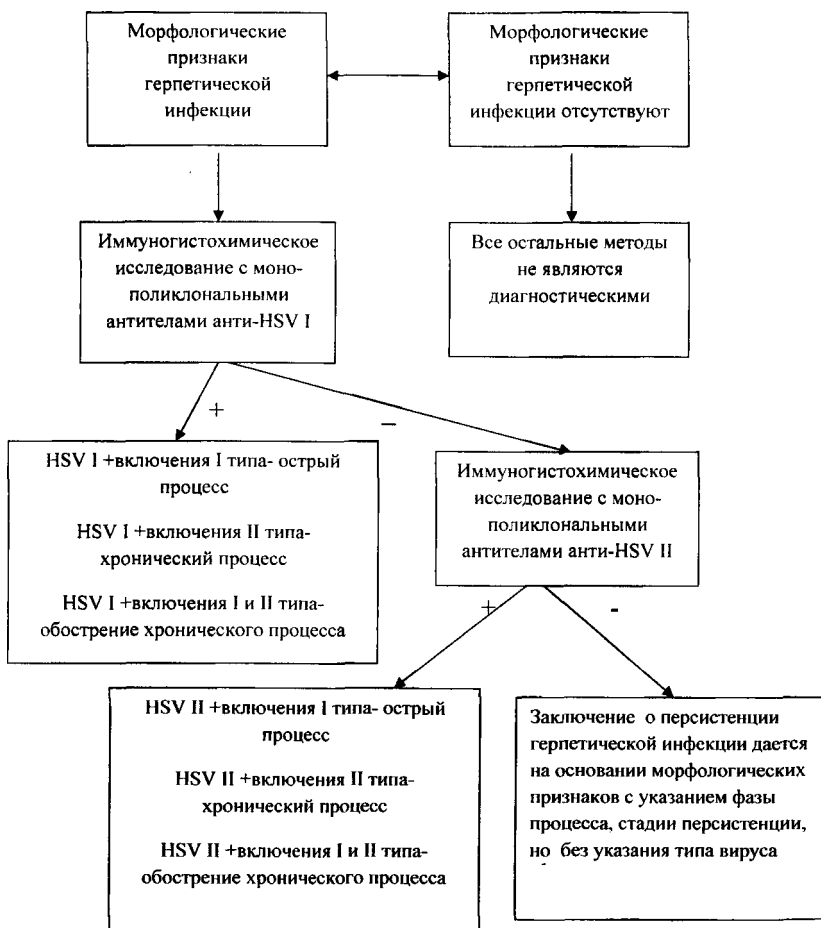


Рис. 1. Алгоритм диагностики с определением фазы процесса, стадии персистенции и типа вируса простого герпеса в биоптатах печени при хронических гепатитах.

Примечание: Следует помнить, что иммуногистохимический метод как и другие методы позволяют выявить антиген ВПГ только в течении первых двух недель острого периода. После этого срока постановка диагноза базируется только на результатах световой микроскопии.

Поэтому, при наличии морфологических признаков персистенции герпетической инфекции и отрицательных результатах лабораторных методов заключение дается на основании гистологических маркеров с указанием стадии персистенции (неактивная) герпетической инфекции, но без указания типа вируса и специфическая противовирусная терапия в данном случае не показана. В случаях положительного результата при проведении иммуногистохимического исследования, наличия морфологических признаков персистенции герпетической инфекции в заключении указывается тип вируса, стадия процесса персистенции (активная), а также фаза процесса (острая, хроническая, обострение хронической), с назначением специфической противовирусной терапии.

Вместо ИГХ метода в схеме возможно использование МФА, но ввиду его более низкой чувствительности и специфичности предпочтение отдается ИГХ методу.

Подписано в печать 19.01.09, Формат бумаги 64x84 1/16
бумага типографская № 2 Гарнитура Times Усл. печ. листов 0,58
Уч.-изд. л. 043 Тираж 36 экз. Заказ № 335
Издатель и полиграфическое исполнение УО «Витебский государственный
медицинский университет»
ЛН № 02330/0549444 от 8.04.09

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном медицинском университете
210602, Витебск, Фрунзе, 27
Тел. (8-0212) 246256

Библиотека ВГМУ

