

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
10 апреля 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: д-р мед. наук, проф. Ю.В. Крылов, д-р мед. наук, проф. В.М. Семенов, В.В. Голубцов, Е.В. Стычевская

Витебск 2009

Проблема смешанных вирусных инфекций все больше привлекает к себе внимание исследователей. Уже установлена возможность возникновения смешанных вирусных инфекций и выявлена роль вируса простого герпеса (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 ВПГ. Также был проведен мониторинг инфицированности ДНК-вирусами семейства *Herpesviridae*, в частности вирусами простого герпеса и цитомегаловирусами (ЦМВ) и показана их роль у больных туберкулезом легких, хроническим бронхитом и пневмонией, установлена частота развития активных и латентных форм вирусной инфекции. В то же время роль герпес-вирусов в течении хронических диффузных поражений печени, в т. ч. при вирусных гепатитах, остается практически не изученной.

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

Данная инструкция предназначена для применения в патологоанатомических отделениях при исследовании биоптатов печени с целью оптимизации диагностики персистенции герпетической инфекции. Ее используют врачи-инфекционисты и врачи-гастроэнтерологи с целью правильной интерпретации полученных морфологических данных и более эффективного применения лекарственных средств.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

При использовании иммуногистохимического метода (ИГХМ) *in vitro* необходимы:

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

2. Стеклянные стаканы (100–150 мл, 5 шт.); в них промывают срезы на различных этапах ИГХ.

3. Один пластиковый планшет с крышкой для выполнения ИГХ — окрашивания размерами 25×20×30 см (можно использовать фотованночки).

4. Пробирки пластиковые с крышками или стеклянные флаконы с закручивающимися пробками (1–2 мл 50 шт. — для хранения разведенных антител и ДАБ хромогена).

5. Пробирки обычные 5–10 мл для разведения антител.

6. Стеклянные емкости с закручивающейся крышкой (1–2 л, 2 шт. — для хранения разведенных буферных растворов).

7. Стеклянные контейнеры из термостойкого стекла с 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 шприцев и самому контролировать температуру).

9. Гидрофобный карандаш для ИГХ.

10. Лабораторный рН-метр.

11. Термостат 58–60 °С.

12. Автоматические пипеточные дозаторы с набором наконечников: малого объема 0,5–10 мкл 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.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Методы 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 базо- или эозинофильными включениями) типов. Причем преобладание включений I типа характерно для острого течения болезни (активная фаза персистенции), а II типа — для хронического (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%. Этот метод является ведущим, поэтому при отрицательных лабораторных данных (МФА, иммуногистохимический) диагноз устанавливается на основании

обнаружения морфологических признаков герпетической инфекции, а положительные лабораторные результаты 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 установить фазу процесса, что имеет существенную роль для определения тактики лечения. При этом можно выявить характер патологического процесса в плохо сохранившихся биоптатах или биоптатах с недостаточным объемом материала.

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

Процедура исследования

Биоптаты печени фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение до 12 ч при температуре 37 °С. 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% позитивно окрашенных клеток.

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 20–30 мин.

5. Стряхнуть сыворотку и раскапать на срезы первичные (кроличьи) антитела в рабочем разведении. Инкубировать во влажной камере 30–60 мин.

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 аминоэтилкорбазола с перекисью водорода. Инкубировать 5–15 мин.

10. Промыть водой, докрасить ядра гематоксилином и заключить в глицерин-желатину.

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, ИГХМ) определяется этиология (вирус простого герпеса 1 и/или 2 типа), стадия (активная, неактивная), а также фаза процесса (острая, хроническая, обострение).

Примечание. Следует помнить, что иммуногистохимический метод как и другие методы, позволяют выявить антиген ВПГ только в течение первых двух недель острого периода. После этого срока диагностика 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. При положительных результатах иммуногистохимического исследования, морфологических признаков персистенции герпетической инфекции в заключении указывается тип вируса, стадия процесса персистенции (активная), а также фаза (острая, хроническая, обострение) с назначением специфической противовирусной терапии.

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

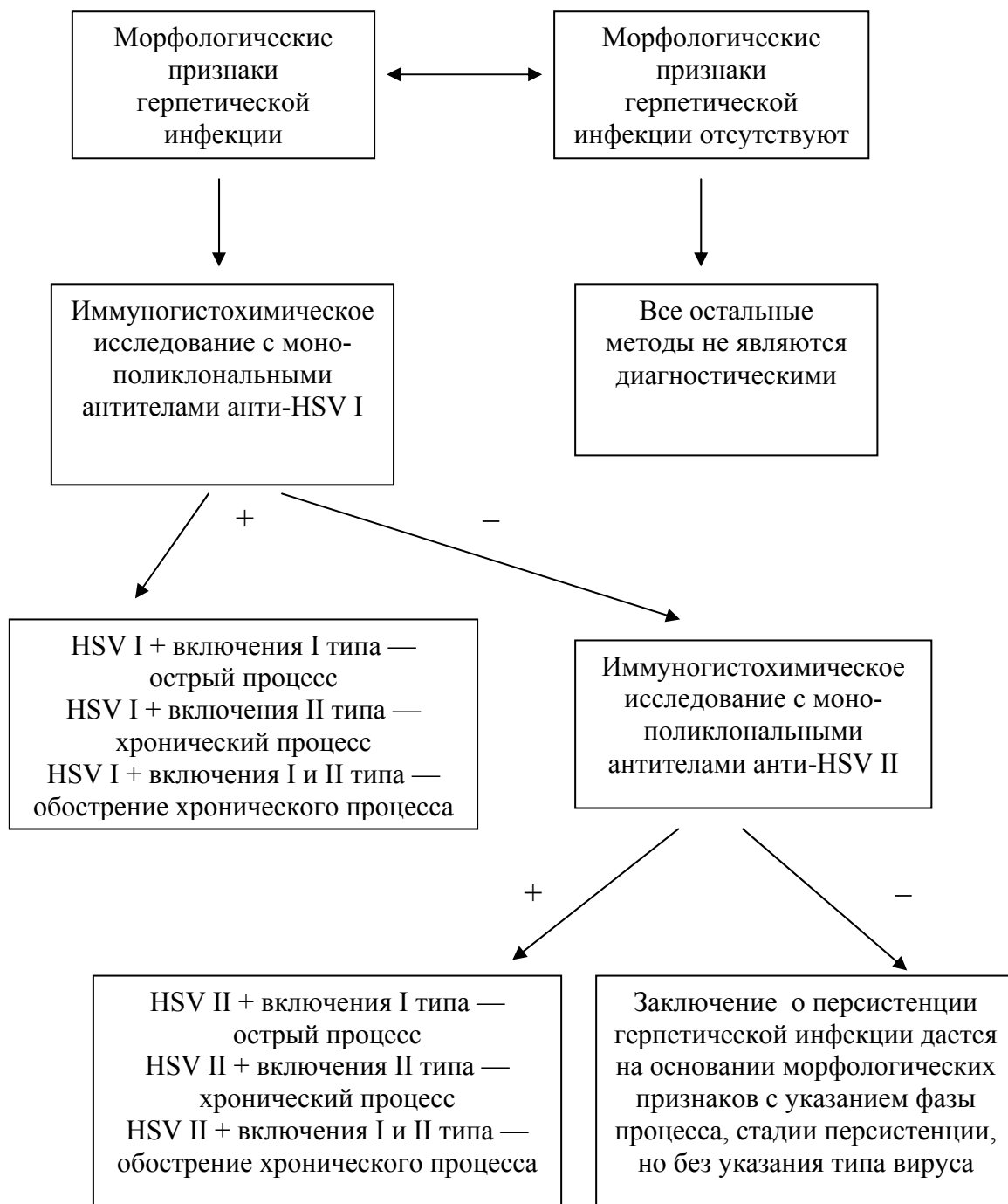


Рис. Алгоритм диагностики с определением фазы процесса, стадии персистенции и типа вируса простого герпеса в биоптатах печени при хронических гепатитах

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Если антиген плохо выявляется на парафиновых срезах, то после регидратации необходимо провести демаскировку антигенов либо по протоколу HIR, либо с протеолитическими ферментами. Затем следовать протоколу окраски с п. 2 протокола.

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.