МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
_____ 2014 г.
Регистрационный № 174–1113

МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АЦИКЛОВИР-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д.м.н., доцент Бореко Е.И., к.б.н. Рубаник Л.В., Савинова О.В., д.м.н., профессор Полещук Н.Н.

Минск, 2013

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) устанавливает методы лабораторной диагностики ацикловир-устойчивых форм герпесвирусных инфекций, предусматривающие идентификацию и выделение возбудителя из клинического материала, а также определение его чувствительности к действию ацикловира.

Инструкция предназначена для вирусологов, гинекологов, урологов, дерматовенерологов, врачей других специализаций.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- весы электронные (предел измерений 260 г., погрешность ±1 мг), или аналогичные (торсионные, др.),
- микроскоп биологический,
- термостат, поддерживающий температуру (37 ±1) С
- CO_2 инкубатор;
- холодильник, поддерживающий температуру (4±2) ^{0}С;
- морозильник
- шкаф сушильный стерилизационный

Реактивы:

- герпевир, таблетки (источник ацикловира),
- линия клеток RD №CCL-136 коллекции АТСС или другая культура клеток;
- изоляты вирусов герпеса (вируссодержащая суспензия);
- среда Дульбекко, модификация среды Игла (ДМЕМ);

- сыворотка крови плодов крупного рогатого скота;
- L-глютамин
- Бактагар,
- Среда 199,
- Раствор нейтрального красного,
- вода бидистиллированная (стерильная) ГОСТ 6709–72
- спирт этиловый ГОСТ 18300 и ГОСТ 5962-67
- перекись водорода ГОСТ 10929;
- раствор гентамицина сульфат 4% ТУ BY 101362058.047;
- дез. раствор
- посуда лабораторная (ГОСТ 1770-74);
- пипетки градуированные, ГОСТ 29227;
- пипетки ГОСТ 20292-74 и ГОСТ 29 227-91
- флаконы ФО-10, ТУ 64-2-10-87
- пробирки П -1-20, ГОСТ 1770;
- планшет 96-луночный для культур клеток;
- пробки резиновые размер 14,5

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рецидивирующий герпес простой, вызванный вирусами герпеса человека 1 и 2 типа; формы инфекции с частыми рецидивами; низкая эффективность противовирусной терапии при использовании лекарственных средств на основе ацикловира.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютных и относительных противопоказаний к применению нет. Определение чувствительности изолятов герпесвируса к ацикло-

виру затруднено при наличии у пациента микст инфекций, так как в этих случаях при пассировании изолята на культуре клеток отмечается эффект доминирования условно-патогенной микрофлоры (активный рост *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Схема лабораторной диагностики ацикловир-устойчивых форм герпесвирусных инфекций представлена в приложении и состоит из следующих основных, последовательно выполняемых этапов:

1) взятие биологического материала для исследования и идентификация возбудителя,

2) пассирование возбудителя на культуре клеток до получения приемлемого репродукционного уровня (5–6 lg $ТЦИД_{50}$/мл),

3) собственно определение чувствительности возбудителя к действию ацикловира на культуре клеток.

1. Взятие биологического материала для исследования и идентификация возбудителя

У женщин материалом для исследований служит отделяемое из цервикального канала, влагалища и уретры. Забор соскобного материала осуществляют универсальным зондом или ложкой Фолькмана перед началом (за 2–4 дня) или сразу после менструации. У мужчин исследуют как отделяемое из уретры, так секрет предстательной железы и эякулят. Забор соскобного материала проводят после пищевой провокации (спиртное, острое, соленое). Перед взятием материала из мочеполового тракта пациентам рекомендуют задержку мочеиспускания 1,5-2 ч (для предотвраще-

ния смыва пораженных клеток возбудителя струей мочи, а также контаминации сопутствующей микрофлорой).

Забранный материал распределяют на предметном стекле, высушивают на воздухе и фиксируют метанолом. Для выделения возбудителей в культуре клеток соскобный материал, взятый от пациентов помещают в специальную транспортную среду, обеспечивающую выживание возбудителей при транспортировке и хранении (–20°С, 1–2 суток). Доставка материала в лабораторию должна быть осуществлена в течение 2 ч.

Для выделения герпесвирусов в соскобном материале из урогенитального тракта пациентов, используют чувствительную культуру клеток McCoy, Vero, RD или др., выращенную на покровных стеклышках, помещенных на дно пенициллинового флакона. При наличии вируса(ов) герпеса, на 3 сутки культивирования в клетках отмечаются специфические цитоморфологические признаки: гигантские клетки и образование синцития. У части клеток выявляется денуклеация ядер (от явных зон лизиса нуклеоплазмы, ее вакуолизации до формирования безъядерных клеток). Для дифференциации вирусов герпеса (ВПГ 1 и 2 типа и ЦМВ) используют ПЦР тест-системы или тест-системы для постановки реакции иммунофлуоресценции зарегистрированные в Республике Беларусь.

Титр изолятов герпесвирусов определяют стандартным методом по цитопатическому действию ($ТЦИД_{50}$/мл). Для этого готовят последовательные 10-кратные разведения. Затем по 0,2 мл каждого разведения вносят в 2-суточную культуру клеток, выращенную в пенфлаконах на стеклышках. Инфекционным титром считают наивысшее разведение, при котором в 50% клеток культуры выявляется характерный цитопатический эффект и отмечается специфическое свечение антигенов возбудителя при обработке флуоресцирующими антителами.

2. Пассирование возбудителя на культуре клеток до получения приемлемого репродукционного уровня

Исследование устойчивости изолятов герпесвирусов может быть выполнено на культурах клеток различного происхождения (RD, Vero, McCoy и др.), поскольку практически все они обеспечивают хорошую репродукционную активность вируса. Монослойную культуру клеток, выращенную во флаконах, отмывают от ростовой среды, инфицируют материалом, содержащим изолят вируса, путем нанесения на клетки в объеме 0,1–0,2 мл на 1 ч при 37°С. Затем жидкость удаляют и на клетки наносят среду поддержки (среда DMEM). После 48–72 ч инкубации при 37°С регистрируют морфологические изменения монослоя клеток (цитопатическое действие (ЦПД) вируса, увеличение ×80). При наличии цитопатического действия (ЦПД) проводят титрование инфекционности вируса методом последовательных разведений, затем при необходимости выполняют следующий пассаж. При достижении титра вируса 5–6 lg $ТЦИД_{50}$/мл приступают к определению чувствительности возбудителя к действию ацикловира.

3. Определение чувствительности возбудителя к действию ацикловира

Сокращенный вариант исследования. Суспензию культуры клеток вносят во флаконы или лунки пластиковой 96-луночной панели и оставляют на 48 ч в термостате (CO_2 инкубаторе) при 37^0 С для формирования монослоя клеток.

Ацикловир растворяют в стерильной бидистиллированной воде для получения исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Дальнейшее разведение этого раствора выполняют на среде поддержки DMEM до получения концентрации 5 мкг/мл.

Сформировавшуюся монослойную культуру клеток отмывают DMEM от ростовой среды и инфицируют 1–1000 $ТЦИД_{50}$ (50% тканевых цитопатогенных инфицирующих доз) вируса путем нанесения на клетки разведений вируссодержащей суспензии (используют 3–4 разведения вируссодержащей жидкости) в объеме 0,1 мл на 1 ч при 37^0 С. Затем вируссодержащую суспензию удаляют и на клетки наносят подготовленную среду поддержки, содержащую 5 мкг/мл ацикловира. Контрольную культуру после инфицирования покрывают средой поддержки без ацикловира (контроль вируса).

На каждое разведение вируссодержащей суспензии, как в группе ацикловира, так и в контрольной группе, используют по 4–6 флаконов/лунок.

После 48 ч инкубации при 37^0 С регистрируют морфологические изменения монослоя клеток (цитопатическое действие (ЦПД) вируса, увеличение ×80). На основе наличия/отсутствия цитопатического действия в лунках по разным разведениям вируссодержащей суспензии вычисляют титр вируса в группе ацикловира и контрольной группе.

Снижение титра вируса в группе ацикловира в сравнении с контролем вируса на 1 lg $ТЦИД_{50}$/мл или более свидетельствует о чувствительности исследуемого изолята вируса к действию ацикловира.

Исследование может быть также выполнено методом редукции бляшек. В этом случае в качестве среды поддержки используют плотное питательное покрытие на основе концентрата среды 199 с добавлением 1% агара и 0,05% нейтрального красного. Двойной концентрат среды 199 с добавлением необходимых ингредиентов, включая 5 мкг/мл ацикловира, разбавляют расплавленным на кипящей водяной бане 2% агаром на бидистиллированной воде в равном соотношении, и наносят на монослой клеток при температуре 43^0С. В покрытие для контроля вируса ацикловир не

вносят. После застывания покрытия флаконы переворачивают монослоем клеток вверх (для стекания конденсата) и инкубируют 48 ч при 37^0 С в термостате. Титр вируса в lg БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл вычисляют на основании количества бляшек, видимых благодаря присутствию в покрытии витального красителя (нейтральный красный).

Расширенный вариант исследования выполняют с несколькими концентрациями ацикловира: 25, 5, 1 и 0,2 мкг/мл. На основании количества флаконов/лунок с развившимся цитопатическим действием (количества бляшек) вычисляют среднеэффективную концентрацию (EC_{50}) ацикловира. Граничным значением EC_{50} лекарственного средства, отделяющим чувствительные изоляты вирусов от устойчивых является концентрация 1,5 мкг/мл. В случаях небольшого превышения порогового значения EC_{50} ацикловира следует обращать внимание также на величину снижения титра вируса в присутствии 5 мкг/мл лекарственного средства: если она достигает 1 lg $ТЦИД_{50}$/мл (БОЕ/мл), исследуемый вариант возбудителя считается чувствительным к действию ацикловира.

Примеры определения чувствительности вирусов герпеса к ацикловиру на культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD)

Образец вируса	Концентрация ацикловира, мкг/мл	Титр вируса, lg $ТЦИД_{50}$/мл	Разность с контролем, lg $ТЦИД_{50}$/мл	EC_{50}, мкг/мл
Изолят 1	25	5,0	1,0	1,0
	5	5,23	0,77	
	1	5,48	0,52	
	0,2	6,0	0	
	0	6,0	–	
Изолят 2	25	5,3	0,88	11,2
	5	6,12	0,06	
	1	6,18	0	
	0,2	6,18	0	
	0	6,18	–	
ВГП-1 (лабораторный штамм 1 С)	25	<3	>3	0,15
	5	4,48	1,52	
	1	5,11	0,89	
	0,2	5,64	0,36	
	0	6,0	–	

Интерпретация полученных результатов. В сокращенном варианте исследование степени устойчивости изолятов вирусов герпеса к ацикловиру предоставляет полуколичественный альтернативный результат. Более точным и информативным является расширенный вариант исследования, при котором полученные значения EC_{50} ацикловира могут свидетельствовать не только об отсутствии или наличии устойчивости исследованного изолята вируса к ацикловиру, но и о степени выявленной устойчивости.

Данная информация может быть полезна для выбора дальнейшей тактики использования противовирусных средств в лечении пациента: продолжение использования лекарственных средств на основе ацикловира

в сочетании с другими противовирусными средствами (комбинированная терапия) при умеренной степени устойчивости (EC_{50} до 10 мкг/мл), либо отмена использования ацикловира и замена его другими средствами с отличающимся механизмом противовирусного действия при более высокой устойчивости.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Цитопатический эффект вируса не развивается. Возможные причины могут быть связаны с качеством культуры клеток и среды поддержки, условиями инкубации, особенностями инфицирующего материала. Необходимо повторное исследование после устранения причины (замена культуры клеток, питательной среды, принятие мер для предотвращения возможной контаминации исследуемого материала и т.д.).

Результаты испытаний изолятов вирусов герпеса вызывают сомнения. Возможные причины — использование ацикловира из нового источника, смена культуры клеток, ошибка в вычислениях при подготовке разведений ацикловира и др. Для их устранения необходимо выполнить сравнительное исследование с лабораторным штаммом ВГП, заведомо чувствительным к действию ацикловира. Исследование с таким штаммом ВГП рекомендуется при каждой смене источника ацикловира (партии, серии вещества или лекарственного средства) для определения граничного значения EC_{50}. Согласно данным мировой литературы данное значение обычно находится в интервале 1–3 мкг/мл ацикловира (чаще всего 1,5 мкг/мл). По данным клинических наблюдений снижение эффективности лечения герпетических заболеваний ацикловиром начинается, если при исследовании изолята вируса значение EC_{50} ацикловира, определенное *in vitro*, составляет более 2 мкг/мл.

Попадание инфекционного материала на рабочие поверхности, одежду, открытые части тела персонала. Устранение — мероприятия при аварии в соответствии с требованиями СП 17–129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

Приложение
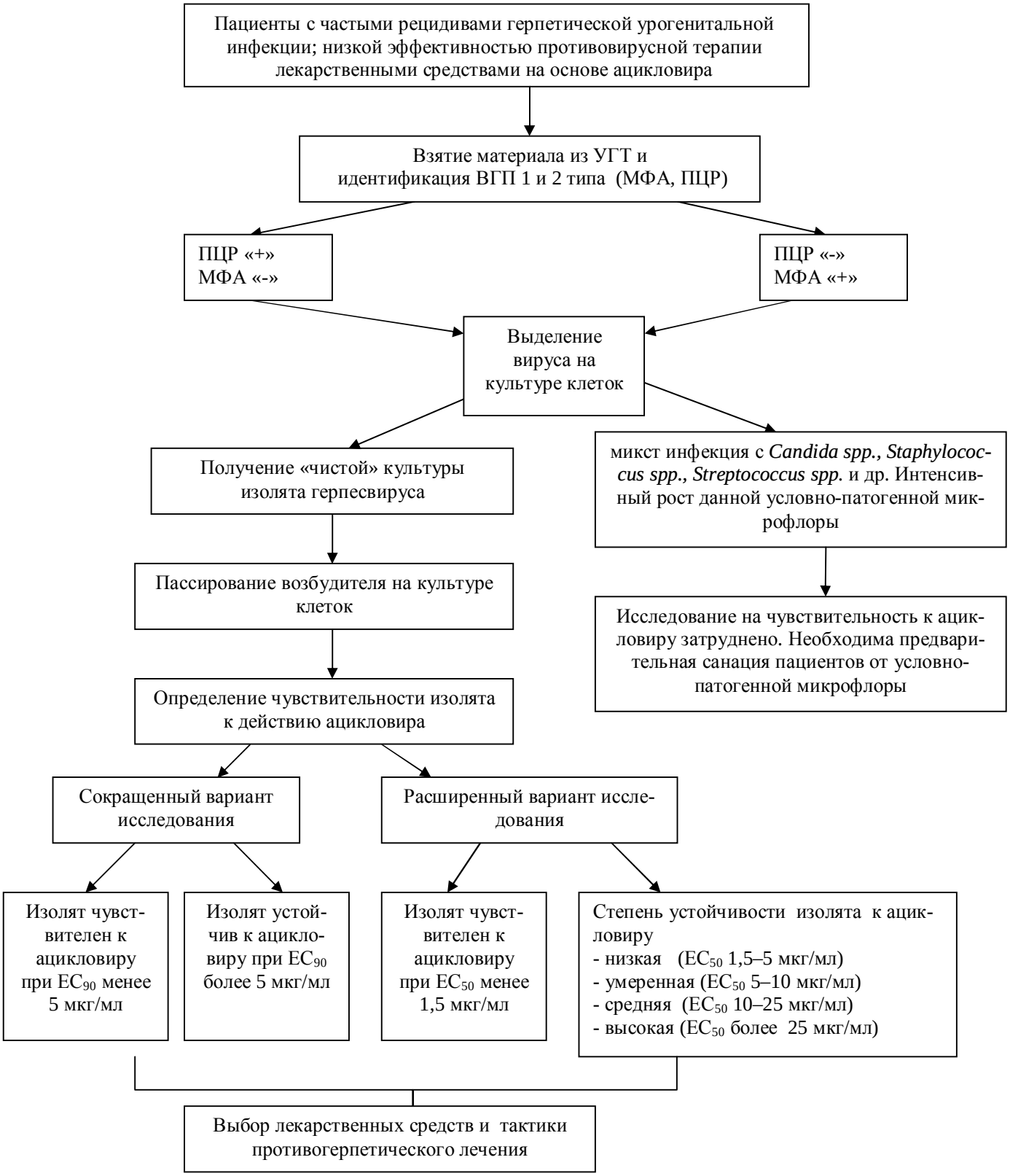
Схема лабораторной диагностики ацикловир-устойчивых форм герпесвирусных инфекций