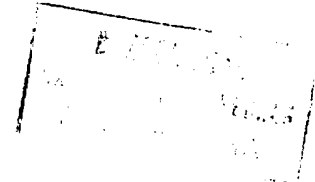




ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГИИТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- 1
- (21) 4233255/28-14  
(22) 20.04.87  
(46) 15.12.89. Бюл. № 46  
(71) Белорусский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии БССР  
(72) А.Г. Коломиец, В.И. Вотяков, Н.Д. Коломиец, Б.Я. Вильнер, Г.П. Дубойская, Н.И. Лущицкая и Л.Б. Степанова  
(53) 612.015 (088.8)  
(56) Баринский И.Ф., Щубладус А.К. Этиология хронических вирусных нейроинфекций. М.: Медицина, 1984.

2

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОВИРУСОВ  
В СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к диагностике нейроинфекций. Цель - повышение чувствительности способа. Для обнаружения нейровирусов в спинно-мозговой жидкости используют первичные культуры нейронов спинного и головного мозга эмбрионов крыс, предварительно обработав их средой "Игла" с рН 6,0-6,5 в течение 30-60 мин. После инкубации в нейронах выявляют антигены вируса иммунопероксидазным методом. Предварительная обработка культур клеток приводит к повышению чувствительности способа на 20%.

Изобретение относится к медицине. Целью изобретения является повышение чувствительности способа.

Способ осуществляют следующим образом.

Для обнаружения вируса использовали первичные культуры нейронов спинного и головного мозга эмбрионов (12-14- и 16-18-суточные, соответственно) крыс, приготовленные следующим образом. Беременные крысы соответствующих сроков беременности помещались в атмосферу углекислого газа, наркотизировались и забивались переломом шеи. После извлечения эмбрионов их помещали в раствор Хэнкса, отмывали в нем, затем у эмбрионов вскрывали спинно-мозговой канал или

черепную коробку, извлекали спинной или головной мозг. Мозг очищали от оболочек, измельченная мозговая ткань многократно пипетировалась пастеровскими пипетками различных диаметров (от большего к меньшему). В течение 5 мин пробирка со взвесью клеток отстаивалась для осаждения на дно крупных кусочков ткани, супернатант собирался и наносился на покровные стекла, предварительно покрытые коллагеном. Затем культуры помещались в термостат при 37°C. Культивирование вели в чашках Петри.

Исследование спинно-мозговой жидкости (СМЖ) на культуре клеток проводили следующим образом.

В 10-14-суточных культурах клеток ростовая среда изымалась и вносилась минимальная среда "Игла" (MEM) с добавлением глюкозы до 600 мг/% (рН 6,0-6,5) на 1 ч. Затем культуры переносили в ростовую среду (MEM 80%; сыворотка плацентарной крови человека 10%; лошадиная сыворотка 10%; глюкоза 600 мг/%) и добавляли к ней 10% СМЖ. Через 1-5 сут. стекла с культурами извлекали из среды роста, промывали 5 мин в физиологическом растворе, подсушивали феном и фиксировали в охлажденном до +4°С ацетона 7 мин. После фиксации стекла отмывали 2 раза по 3 мин в физиологическом растворе и погружали на 10 мин (клетками вверх) в раствор азидата натрия (0,001 М) с добавлением 0,01% перекиси водорода. Затем стекла с клетками отмывали 3 раза по 10 мин и подсушивали феном. На культуры клеток наносили необходимые кроличьи антисыворотки (к вирусу простого герпеса или приону амиотрофического лейкоспонгиоза) в рабочем разведении 1:50 и помещали во влажную камеру на 40 мин при 37°С. Затем клетки снова отмывали, и наносили конъюгат (овечьи антикроличьи антитела меченные пероксидазой) в разведении 1:100. Через 40 мин контакта во влажной камере при 37°С повторяли процедуру отмывки, и стекла с исследуемыми культурами клеток погружали в темной камере в раствор субстрата (35 мг 3,3-диаминобензидаина в 50 мл физиологического раствора и 0,03% перекиси водорода) на 30 мин. Затем стекла извлекали, отмывали, проводили через серию спиртов и ксилол, и заключали в канадский бальзам. Результат учитывали под световым микроскопом, по наличию в зараженных клетках коричнево окрашенных круглых структур, при отсутствии таковых в незараженных клетках.

Для того, чтобы установить оптимальные условия для проникновения возбудителей из СМЖ в клетки был проделан ряд опытов. Культура клеток нейронов обрабатывалась средой с рН 6,0-6,5 в течение 30-60 мин. Это было сделано для изменения проницаемости клеточной мембраны.

**Пример 1.** Исследовали СМЖ больной К, с подозрением на герпетический энцефалит. Заражали эмбриональную культуру клеток диссоциированных нейронов после обработки ее средой с рН 6,0 в течение 30 мин. Через 2 сут после заражения в нейронах были выявлены антигены вируса простого герпеса иммунопероксидазным методом. Диагноз - герпетический энцефалит.

**Пример 2.** Исследование СМЖ больной Д с подозрением на амиотрофический лейкоспонгиоз, заражали культуру клеток диссоциированных нейронов после обработки их в течение 40 мин средой с рН 6,0. Через 3 сут после культивирования в клетках был обнаружен антиген возбудителя. Диагноз - амиотрофический лейкоспонгиоз.

**Пример 3.** СМЖ больной Г. с подозрением на амиотрофический лейкоспонгиоз заразили эмбриональную культуру клеток диссоциированных нейронов после их предварительной обработки средой с рН 6,5 в течение 15 мин. При наблюдении и исследовании этой культуры в течение 2 недель развития вирусной инфекции не установлено.

Предварительная обработка культур клеток диссоциированных нейронов приводит к повышению чувствительности метода - из 53 образцов СМЖ с подозрением на герпетическую инфекцию при использовании предлагаемого способа вирус выявлен в 23 случаях, а по способу-прототипу - в 11 случаях.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения нейровирусов в спинно-мозговой жидкости, включающий культивирование вирусов в культуре клеток с последующим иммуноферментным анализом, отличающийся тем, что, с целью повышения чувствительности способа, в качестве культуры клеток используют первичные диссоциированные нейроны мозга эмбрионов, которые перед определением нейровирусов обрабатывают минимальной средой "Игла" с рН 6,0-6,5 в течение 30-60 мин.