



ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

М.Р. Карпова

Диагностика вирусных инфекций

■ **Прямые методы:**

- непосредственное исследование материала на наличие вируса (**вирусоскопический метод**), вирусного АГ или вирусных нуклеиновых кислот;
- **вирусологический метод**: выделение и идентификация вируса из клинического материала;

■ **Непрямые методы:**

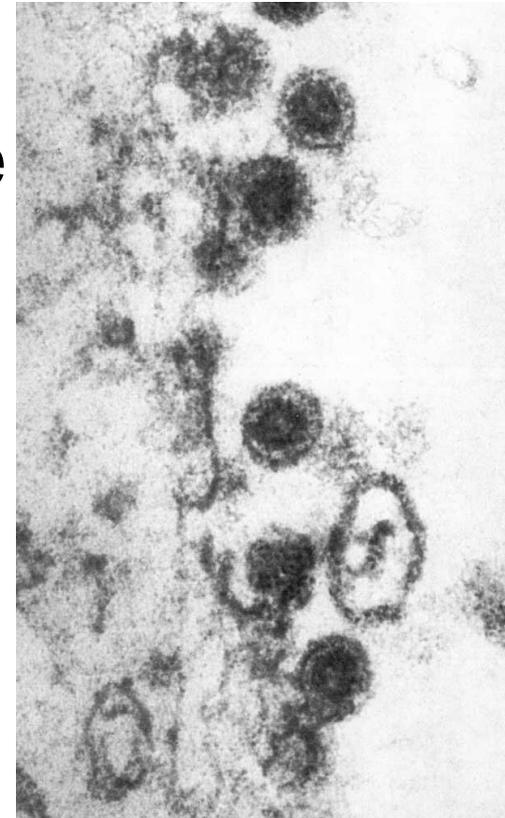
- **серологический метод**: определение специфических противовирусных АТ (в динамике, классы Ig).

Прямые методы диагностики

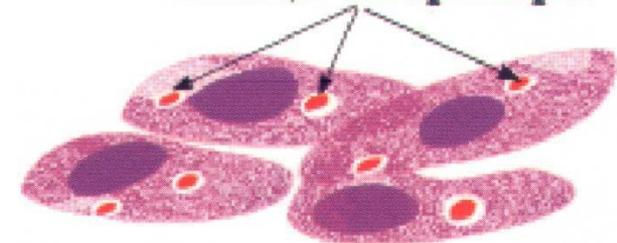
Вирусоскопический метод:

микроскопия вируса в материале от больного.

- Электронная микроскопия.
- Иммуноэлектронная микроскопия.
- Цитологические методы.



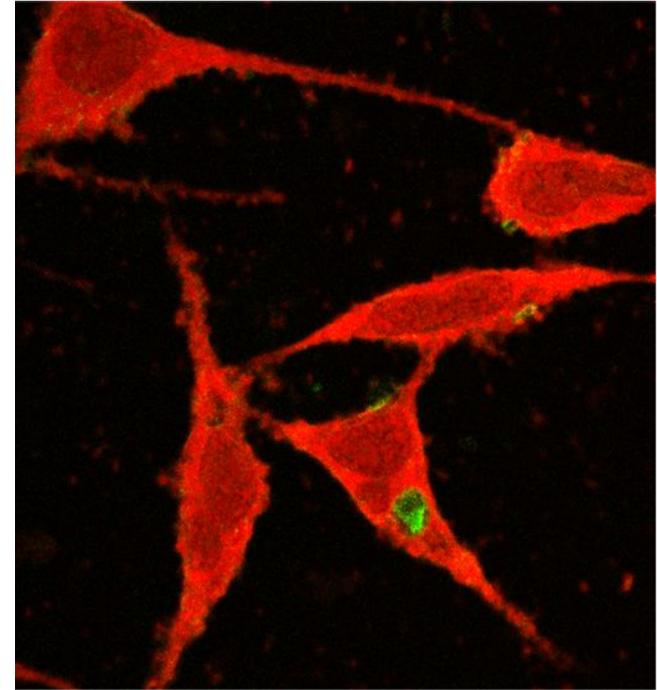
Тельца Гварниери



Прямые методы диагностики

Экспресс-диагностика –
обнаружение в материале
компонентов вирусов:

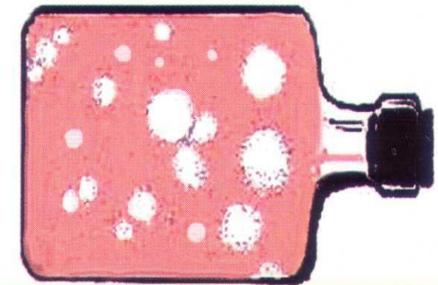
- **вирусных АГ** – РНГА,
РТГА, **РИФ**, **ИФА**;
- **вирусных нуклеиновых
кислот** в **ПЦР**. Количественная
ПЦР – «**вирусная нагрузка**».



Прямые методы диагностики

Вирусологический метод – выделение вируса из клинического материала, его культивирование, определение количественного содержания и идентификация.

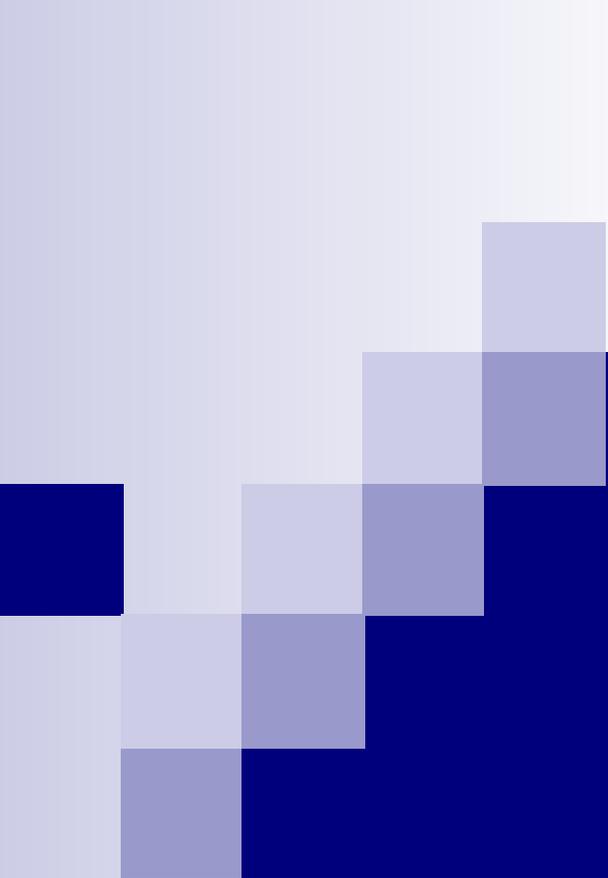
- **Клинический материал** отбирают как можно раньше, с учетом циркуляции возбудителя. «Холодовая цепь». Безопасность.
- **Культивирование:**
 - куриный эмбрион;
 - организм животного;
 - клеточные культуры.
- **Количественное определение вирусов:**
 - инфекционность (реакция бляшкообразования, определение инфекционной или летальной дозы);
 - выявлением вирусных АГ;
 - выявление вирусной нуклеиновой кислоты (ПЦР);
 - количественная электронная микроскопия.



Непрямые методы

Серологический метод:

- определение класса специфических иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG);
- определение титра специфических АТ в парных сыворотках от больного;
- **ИФА**, РТГА, НРИФ, РН, иммуноблотинг.



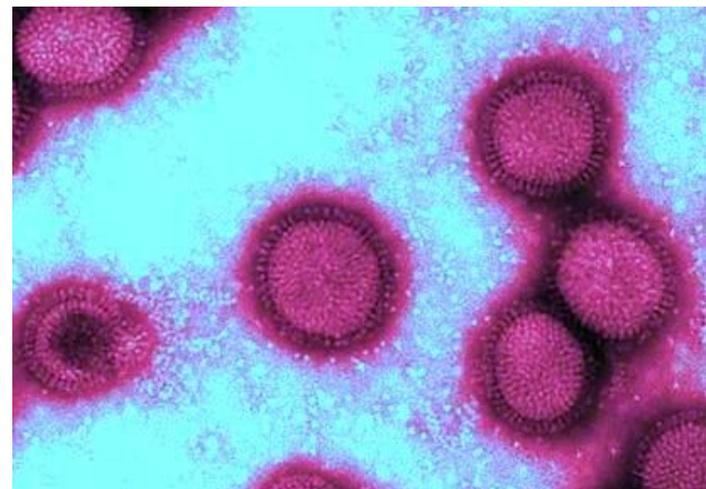
ОРТОМИКСОВИРУСЫ И ПАРАМИКСОВИРУСЫ

М.Р. Карпова

ОРТОМИКСОВИРУСЫ

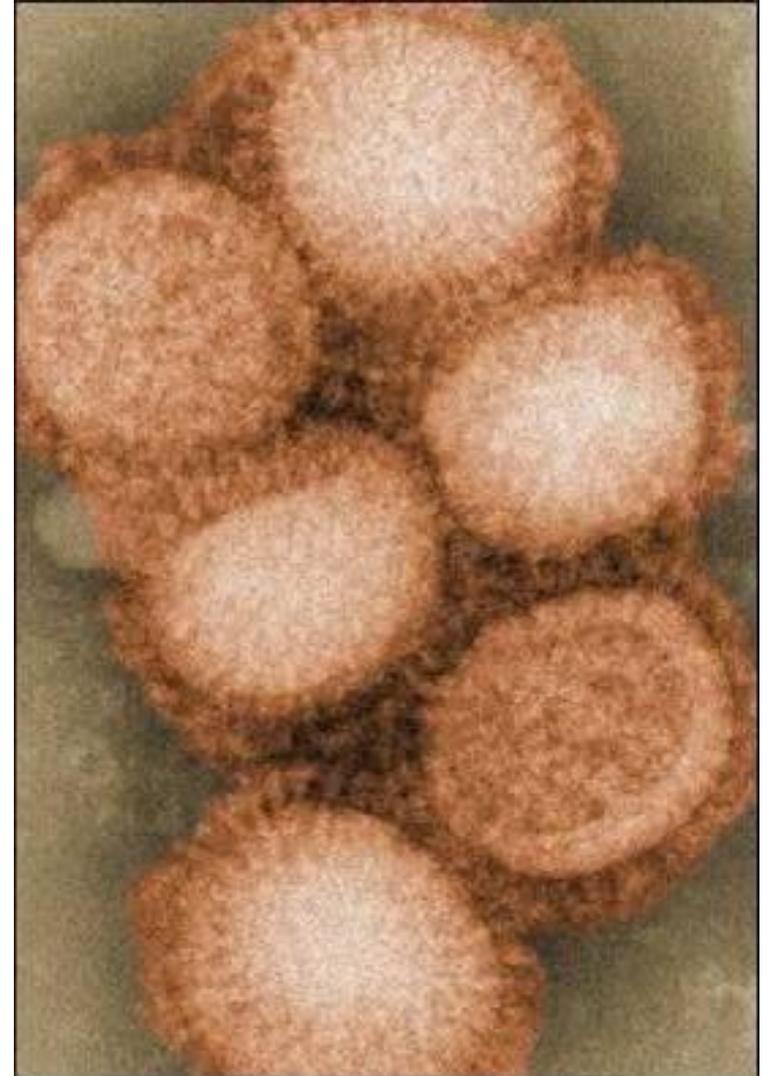
- Царство – *Vira*;
- Подцарство – *РНК-вирусы*;
- Семейство – *Orthomyxoviridae*;
- Роды – *Influenzavirus A*,
Influenzavirus B и *Influenzavirus C*.

мухо – родство к муцину.



Вирус гриппа

- «Грипп» – 1743 г. Соваж (от фр. **agripper** – «схватывать»);
- «инфлюэнция» (от «**influentia**» – эманация энергии звезд).



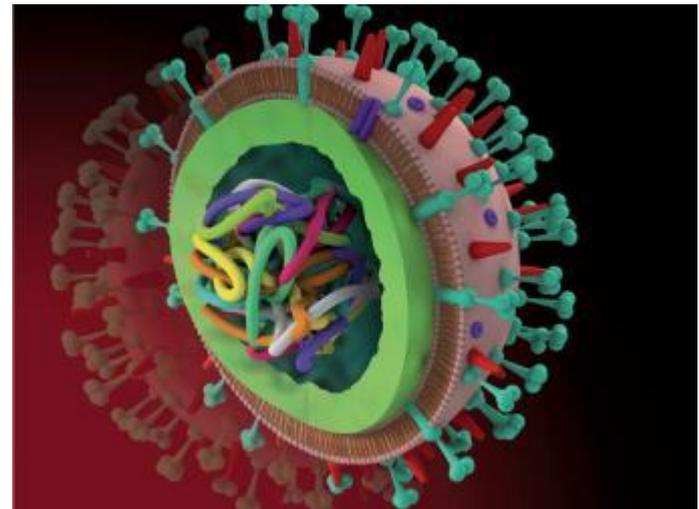
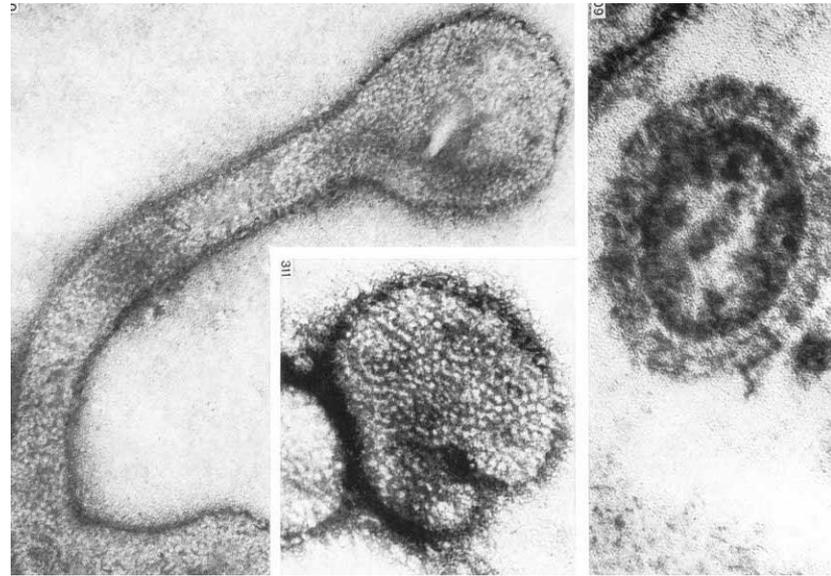
Вирус гриппа А

- Вирус выделен в **1930** году Шор от свиней.
- В **1933** году Смит, Эндрюс и Лейдлоу изолировали вирус на сирийских хомячках путем их заражения смывом со слизистой носа больного человека.



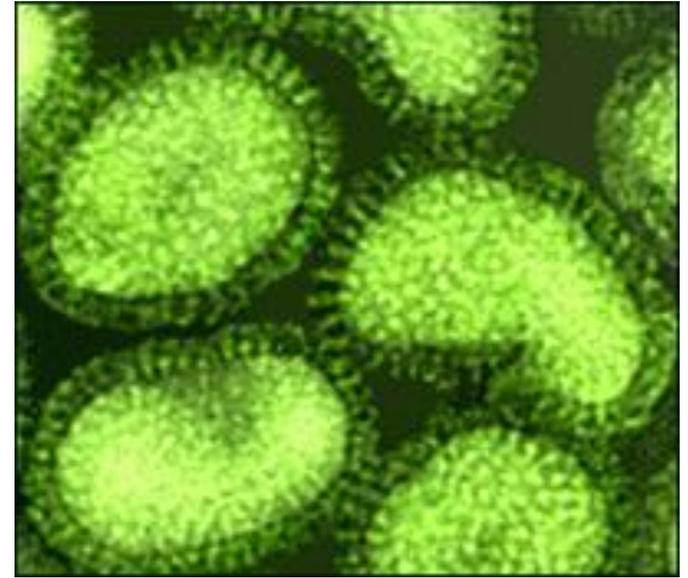
Морфология

- Две формы: нитевидная (70 нм) и сферическая (80-120 нм).
- Нуклеокапсид, суперкапсид с шипиками (Н и N).
- Геном – 8 фрагментов однонитчатой линейной «минус-нитевой» РНК.



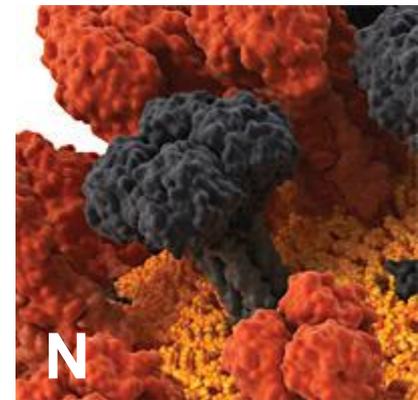
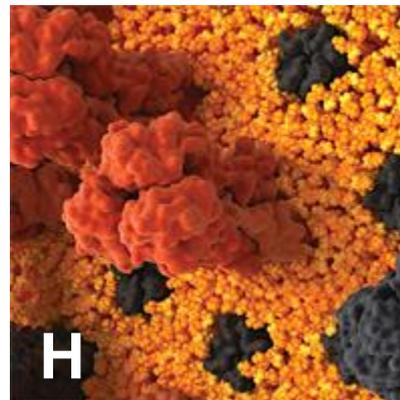
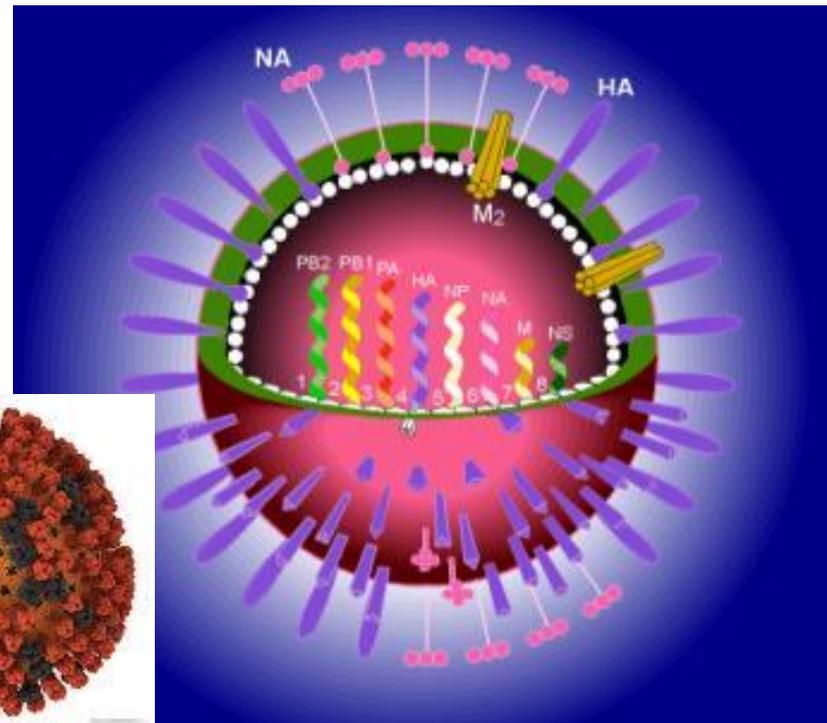
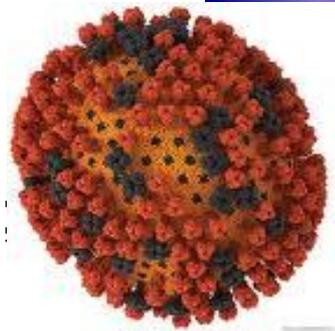
Культивирование вируса гриппа

- **Куриный эмбрион** – в аллантоисной и амниотической жидкостях.
- **Клеточные культуры** – ЦПД.
- **Организм животных**: в легочной ткани белых мышей, сирийских хомячков, хорьков, морских свинок, обезьян.
- Вирус гриппа А циркулирует не только среди людей, но и среди некоторых видов животных и **птиц**.



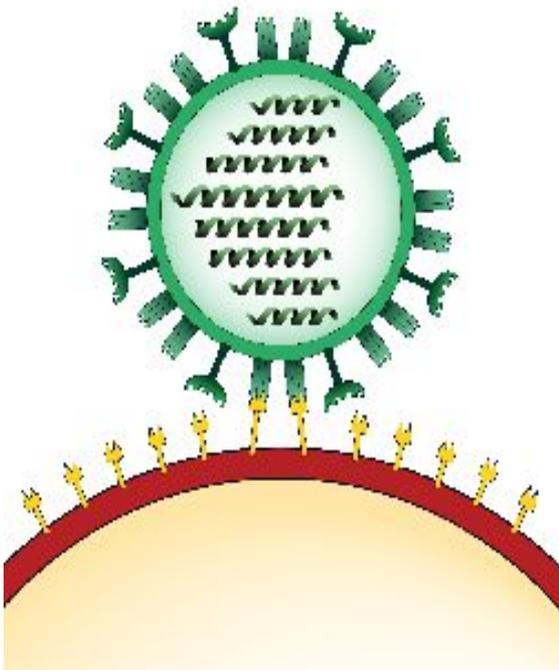
Антигены вируса гриппа А

- Вирус имеет 10 АГ: 7 структурных и 3 неструктурных (клеточных).
- **Структурные АГ:**
 - **H** и **N** (H1-H16 и N1-N9), у человека – А(H1N1), А(H2N2), А(H3N2).
 - **P1, P2** и **P3** – ферменты полимеразного комплекса.
 - **NP** – внутренний АГ, формирующий капсомеры;
 - **M** – внутренний матриксный белок, медиатор сборки вирусной частицы (M1 и M2).
- **Неструктурные белки: NS1, NS2, NS3.**

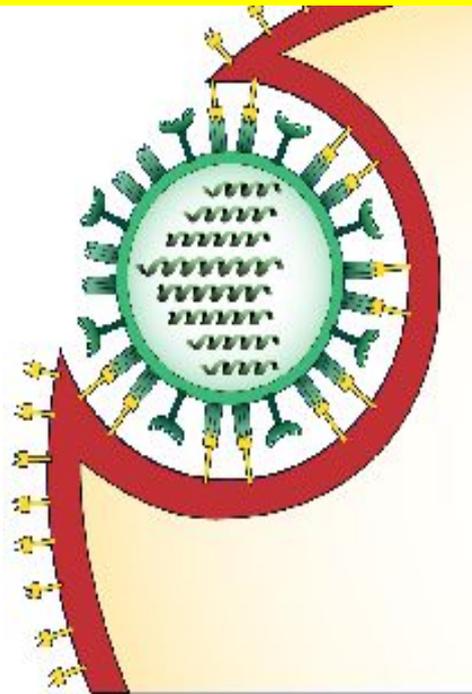


Роль вирусного гемагглютинина

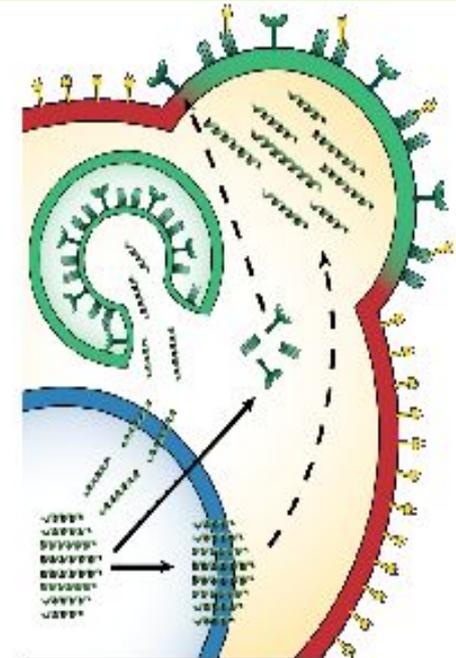
А. Связывание с сиаловой



В. Проникновение вируса



С. «Раздевание» и репликация вируса



Изменчивость вируса гриппа А

- «Антигенный дрейф» (от англ. – медленное движение).
- «Антигенный шифт» (от англ. – сдвиг).
- Шифт – стратегия, дрейф – тактика антигенной изменчивости.
- Реассортация.

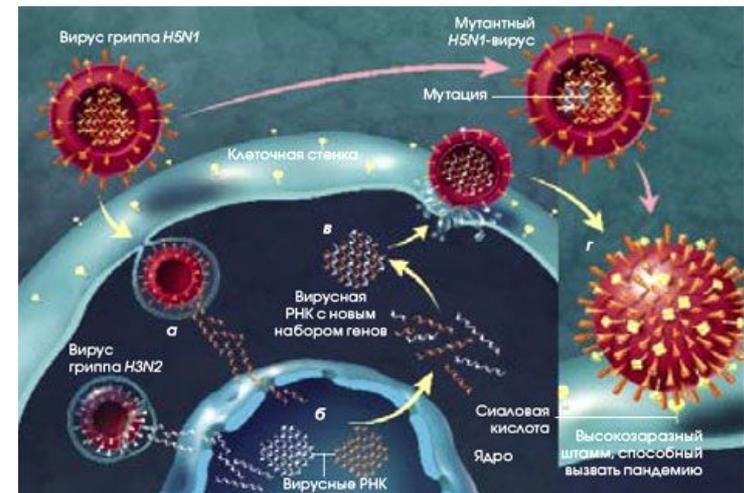
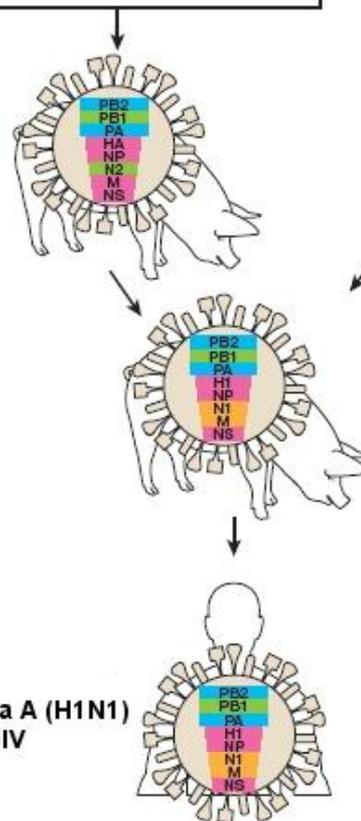
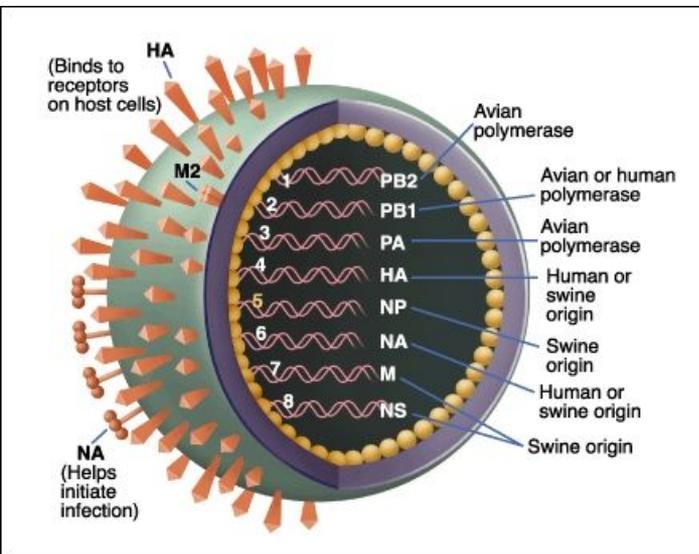
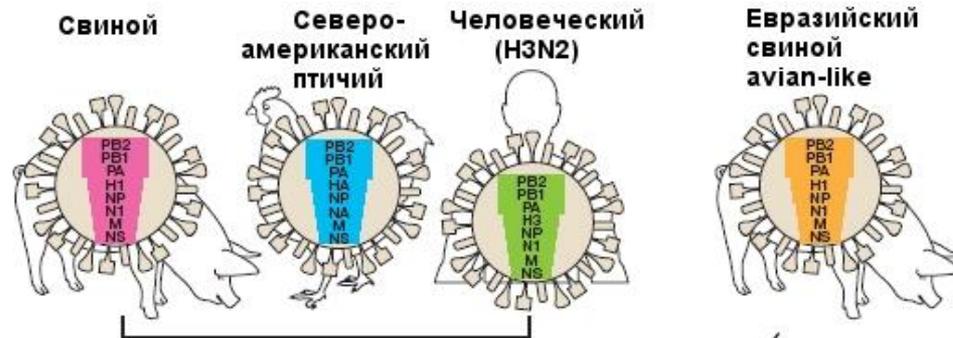


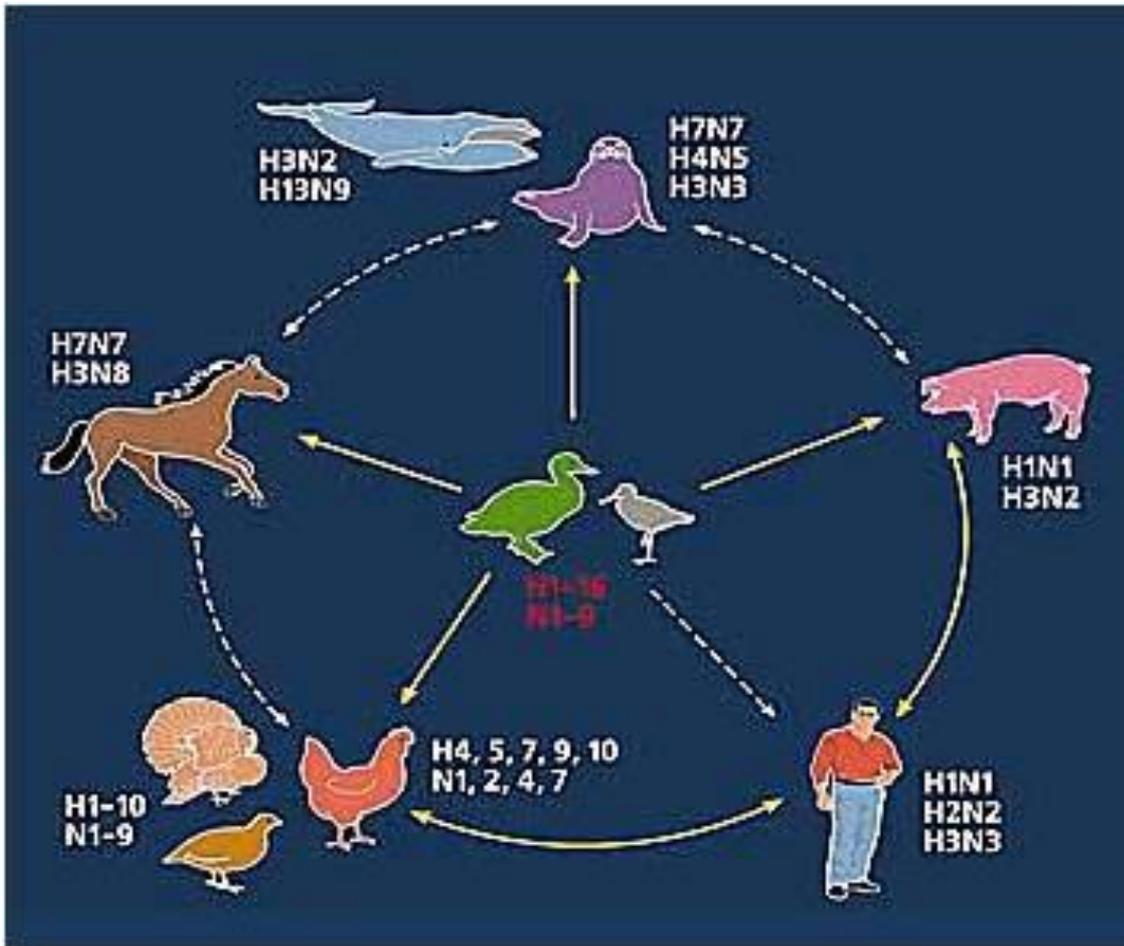
Схема происхождения пандемического вируса гриппа А H1N1v



Вирус гриппа А (H1N1) S-OIV

- PB2 - Североамериканский птичий
- PB1 - Человеческий H3N2
- PA - Североамериканский птичий
- H1 - Свиной
- NP - Свиной
- N1 - Евразийский свиной avian-like
- M - Евразийский свиной avian-like
- NS - Свиной

Вирус гриппа А в биосфере



Haemagglutinin subtypes			Neuraminidase subtypes				
H1				N1			
H2				N2			
H3					N3		
H4				N4			
H5				N5			
H6				N6			
H7					N7		
H8				N8			
H9				N9			
H10							
H11							
H12							
H13							
H14							
H15							

История эпидемий гриппа

- Средневековые английские хроники – **«лондонская потница»**.
- 1918-1919 гг. – **«испанка»** (вирус гриппа А H1N1), погибло свыше 20 млн. человек;
- 1957 г. – **«азиатский грипп»** (вирус гриппа А H2N2);
- 1968 г. – **«гонконгский грипп»** (вирус гриппа А H3N2);
- 1977–1978 гг. – **«русский грипп»** (вирус гриппа А H1N1).
- **2010 – ?**
- В настоящее время циркулируют три штамма вируса гриппа: **А H1N1**, **А H3N2** и **В**.





«Свиной» грипп

- Трахея свиней содержит рецепторы как птичьих, так и человеческих вирусов → реассортация.
- К человеку от больной свиньи вирус-реассортант вероятно попал воздушно-капельным путем, либо при прямом контакте человека и пяточковой слизи свиньи.
- Март-апрель 2009 г. – начало эпидемии.
- **11 ИЮНЯ 2009г.** ВОЗ объявил пандемию гриппа А (H1N1).



Патогенез гриппа

- **Источник инфекции** – больной человек.
- **Пути заражения:**
воздушно-капельный (кашель, чихание, разговор) и воздушно-пылевой.
- **Входные ворота** – слизистая ВДП.
- Из 1-ой вирусной частицы через 24 ч образуется 10^{27} частиц → **короткий ИП гриппа** – 1-2 дня.



Патогенез гриппа

- Вирус → бокаловидные и реснитчатые клетки → набухают → **слизь**. Клетки разрушаются → **интоксикация**. Клетки слущиваются и заполняют просветы бронхов.
 - Иммунный ответ → БАВ → цитотоксический эффект.
 - Повреждение мембран → **генерация инфекции**.
 - Повышение проницаемости стенок сосудов → периваскулярный отек, нарушение гемостаза → отек и полнокровие легких, мозга и других органов.
- Наиболее поражаемые органы – **легкие, ЦНС**.
Инфекционно-токсический шок.
Иммунодефицит → вторичные бактериальные инфекции (чаще стафилококковые).



Иммунитет при гриппе

- **Пассивный иммунитет** – у детей до 8-11 месяцев.
 - **Активный иммунитет:**
 - **АТ** – к концу 1-й недели заболевания, максимум – к 3-й неделе;
 - **факторы резистентности:** интерферон, термостабильные и термолабильные сывороточные ингибиторы, **факторы местного иммунитета:** на слизистых ВДП – sIgA.
- К вирусу гриппа вырабатывается стойкий иммунитет**

Микробиологическая диагностика гриппа

Вирусологический метод:

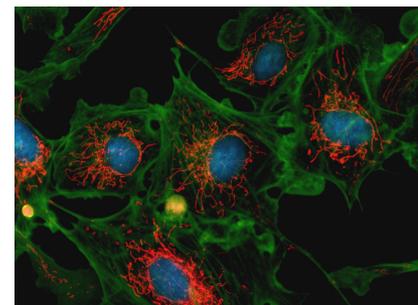
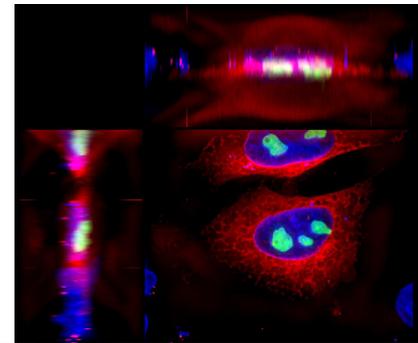
- **Материал:** кровь, смывы со слизистой носа, в летальных случаях – кусочки ткани легкого, соскобы со слизистой бронхов, трахеи.
- Материал → куриные эмбрионы (аллантоисная полость), **культура ткани**, белые мыши → идентификация в РТГА, РН, РИФ, ИФА и ПЦР.

Серологический метод:

- Парные сыворотки → ИФА, РТГА, РН.

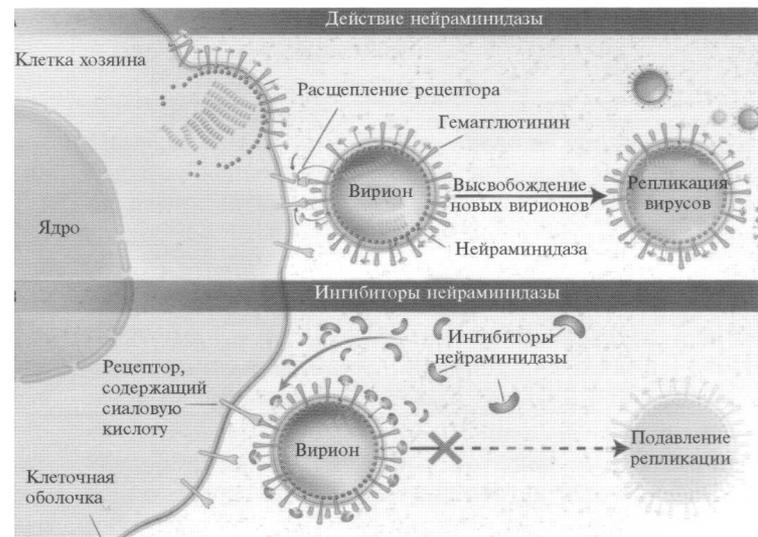
Экспресс-диагностика:

- Вирусный АГ в эпителии слизистой оболочки ВДП → РИФ, ИФА; **вирусная РНК → ПЦР.**



Лечение гриппа

- **Специфическое лечение:**
противогриппозный Ig.
- **Интерферон и его индукторы**
(циклоферон, арбидол, амиксин)
- **Противовирусные химиопрепараты:**
 - ингибитор гемагглютинаина (**арбидол**)
 - блокаторы M2-каналов (амантадин, **ремантадин**);
 - ингибиторы нейроминидазы – занамивир (**реленц**), озельтамивир (**тамифлю**);
 - подавление транспорта РНП – **ингавирин**.



Вакцины против гриппа



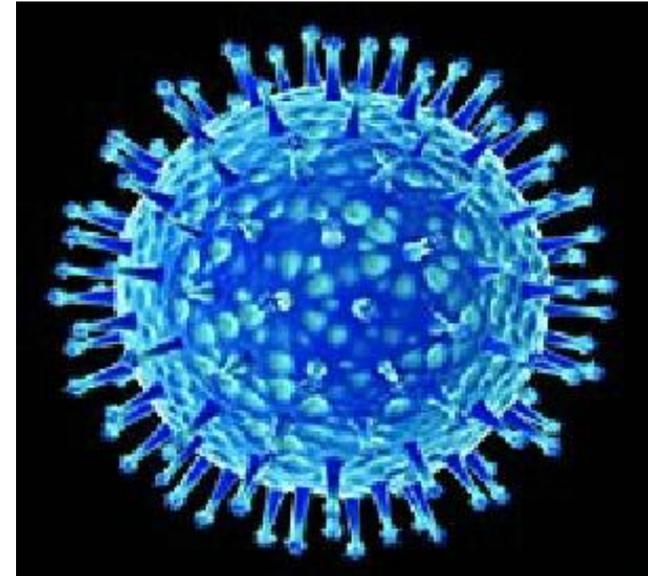
- **Цельновирионные** (живая и убитые);
- **Сплит-вакцины** (расщепленные), содержат все внутренние и поверхностные АГ, в них нет реактогенных липидов. Ваксигрип, Флюарикс, Бегривак.
- **Субъединичные вакцины** проходят еще один этап обработки, удаляются внутренние АГ, остаются только НА и NA. **Гриппол**, Инфлювак.



**Поливалентные вакцины:
А (H3N2), А (H1N1) и В.
Прививки рекомендуется
проводить ежегодно
в осенне-зимний период.**

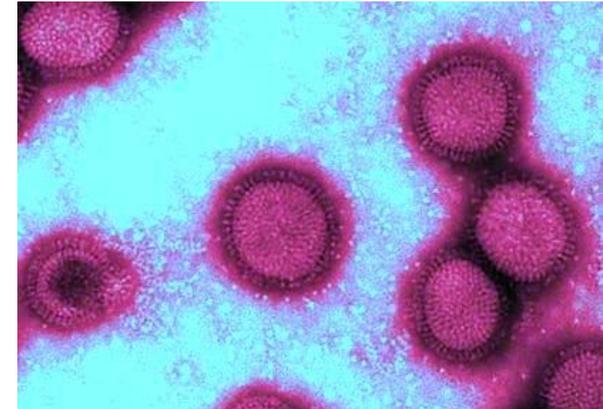
Вирус гриппа В

- По морфологическим и биологическим свойствам не отличается от вируса гриппа А.
- **Отличия:**
 - антигенная структура;
 - циркулирует только среди людей;
 - вызывает локальные и спорадические случаи, вспышки среди школьников;
 - менее изменчив, вирулентен и контагиозен.
- Против вируса гриппа В существует вакцина.



Вирус гриппа С

- По основным свойствам не отличается от вирусов гриппа А и В.
- **Отличия:**
 - по антигенному составу;
 - не содержит нейроминидазу, ее заменяет ацетилэстераза;
 - имеет 7 сегментов РНК;
 - постоянство антигенной структуры → спорадические случаи, особенно у детей первого года жизни, как правило, к 10 годам у большинства людей имеются АТ к этому вирусу.
- Вакцины против вируса гриппа С нет.



Парамиксовирусы (Paramyxoviridae)

- Крупные (150 – 300 нм), суперкапсидные вирусы со спиральным типом симметрии.
- Форма вириона сферическая.
- Геном – однонитевая нефрагментированная «–» РНК.
- Парамиксовирусы чаще вызывают инфекции у детей.

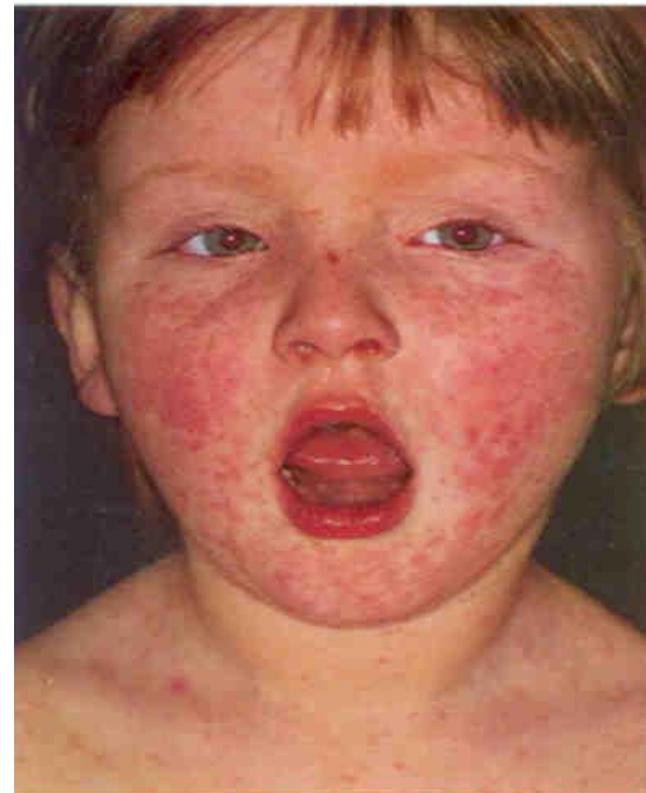
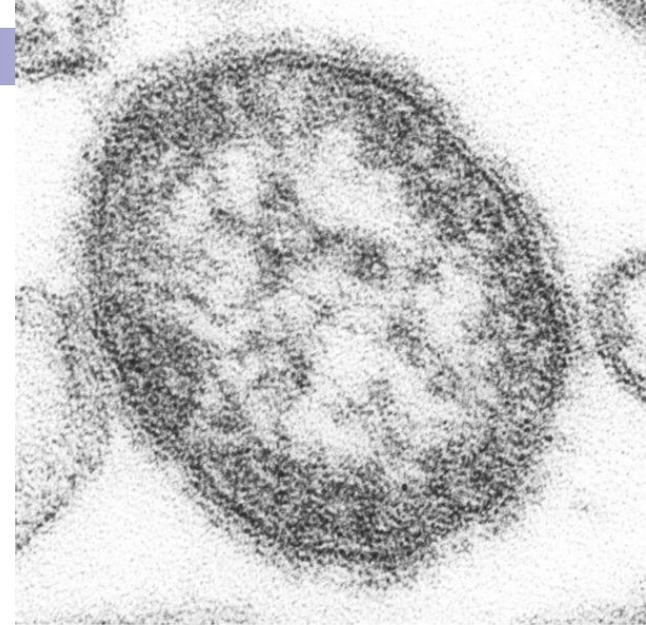


Таксономическое положение

- Царство – *Vira*;
- Подцарство – *РНК-вирусы*;
- Семейство – *Paramyxoviridae*;
- Роды – *Respirovirus* (вирус парагриппа), *Rubulavirus* (вирус эпидемического паротита), *Morbillivirus* (вирус кори), *Pneumovirus* (РС-вирус).

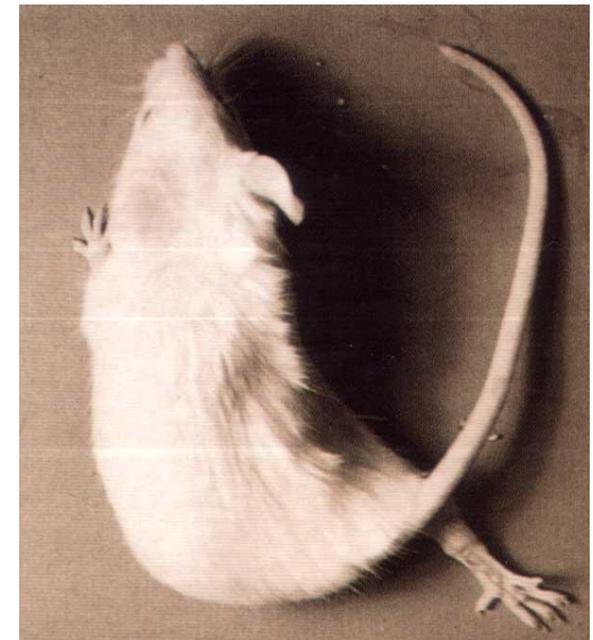
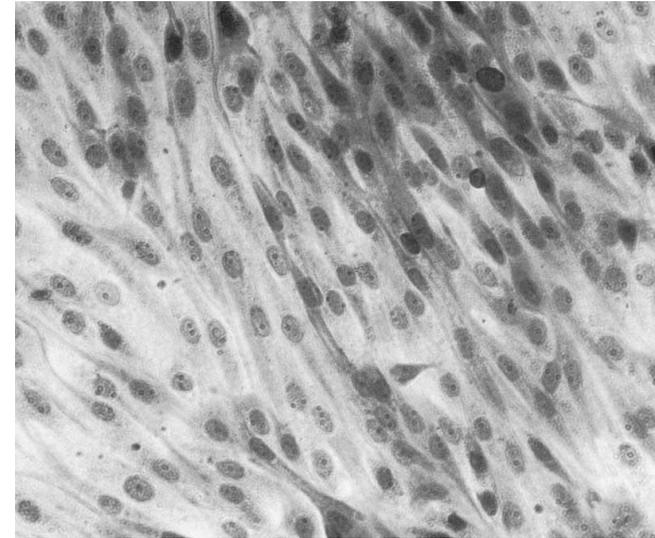
Вирус кори

- **Measles virus.**
- **Корь** – острое инфекционное заболевание с высокой температурой, интоксикацией, катаральными явлениями на слизистых ВДП, глаз, появлением сыпи (крупная, пятнисто-папулезная).



Культивирование

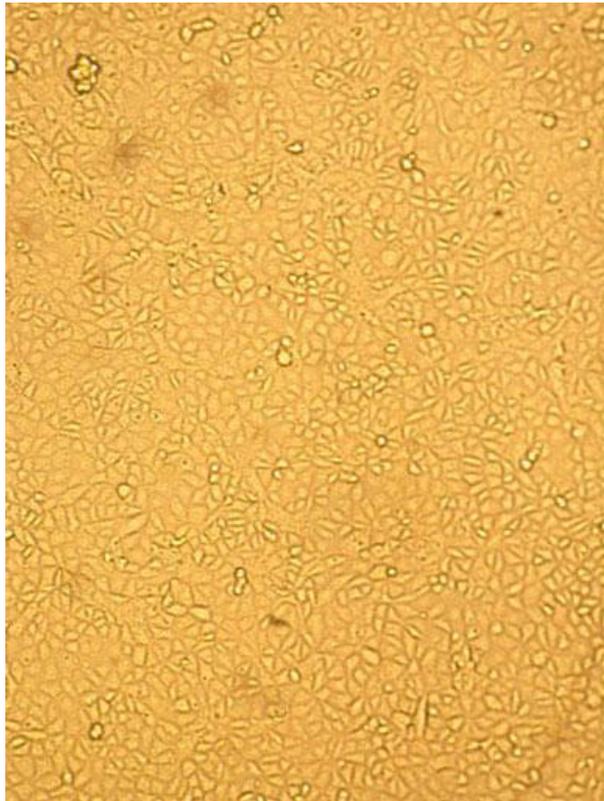
- Культура клеток:
 - образование многоядерных клеток – симпластов → **СИНЦИТИЙ**;
 - эозинофильные включения в ядре и около ядерной зоне и интенсивная дегенерация.
- Животные и птицы к вирусу не чувствительны, кроме приматов (корь). Белые мыши-сосунки – энцефалит с летальным исходом.



Образование симпластов

ЦПД вируса кори на клетки Vero: образование гигантских многоядерных клеток – **симпластов**, включающих до 100 ядер, с последующей деструкцией и формированием крупных полостей типа "**мыльных пузырей**".

Интактные
клетки
линии
Vero



ЦПД
вируса
кори в
культуре
клеток
Vero

Антигенные свойства вируса кори

- два гликозилированных белка, входящих в состав суперкапсида — **H** (гемагглютинин) и **F** (белок слияния, гемолизин);
- **M**-белок (матриксный);
- белки нуклеокапсида **NP**, **P** и **L** (белки полимеразного комплекса, содержащего транскриптазу).

Патогенез

- Источник инфекции – больной человек.
- Механизм заражения – аспирационный.
- Путь заражения: воздушно-капельный.
- Входные ворота – эпителиальные клетки слизистой оболочки носоглотки, трахеи и бронхов, конъюнктивы глаз.



Патогенез кори



Патогенез

- Эпителиотропность → катаральное воспаление ротоглотки, носоглотки, гортани, трахеи, бронхов, бронхиол.
- **Сыпь, пятна Бельского-Филатова-Коплика.**
- Поражение внутренних органов (пневмонии, менингиты, энцефалиты).
- Подострый склерозирующий панэнцефалит, нома.
- Стойкий иммунитет.

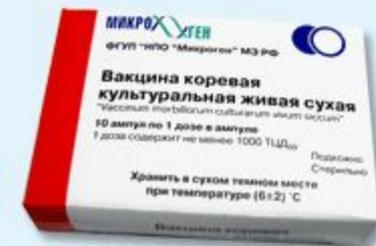


Микробиологическая диагностика

- **Материал** – кровь (в первые дни заболевания, 3-5 день от момента появления сыпи), носоглоточные смывы, соскобы с элементов сыпи, секрет конъюнктивы, моча, материал биопсии при летальных исходах.
- **Экспресс – диагностика:** специфический вирусный АГ в пораженных клетках (соскобы с элементов сыпи) в РИФ.
- **Вирусологический метод:** культивирование на культуре клеток, идентификация в РИФ, РН, РТГА, ИФА, **ПЦР**.
- **Серологический метод:** С парными сыворотками больного ставят **ИФА** с определением Ig M и Ig G, РНГА, реже РТГА и РН в культуре клеток.

Профилактика и лечение

- **Живая культуральная коревая вакцина.**
Плановые прививки – двукратно в возрасте 12-15 мес. и 6 лет детям не болевшим корью. Взрослых 18-35 лет.
- Экстренную профилактику проводят детям с 12 месяцев, подросткам и взрослым, не болевшим корью и ранее не привитым, имевшим контакт с больным корью не позднее, чем через 72 ч после контакта. Иммунитет – 10 лет.
- Рувакс, MMR
- Нормальный донорский иммуноглобулин применяется для контактировавших детей.



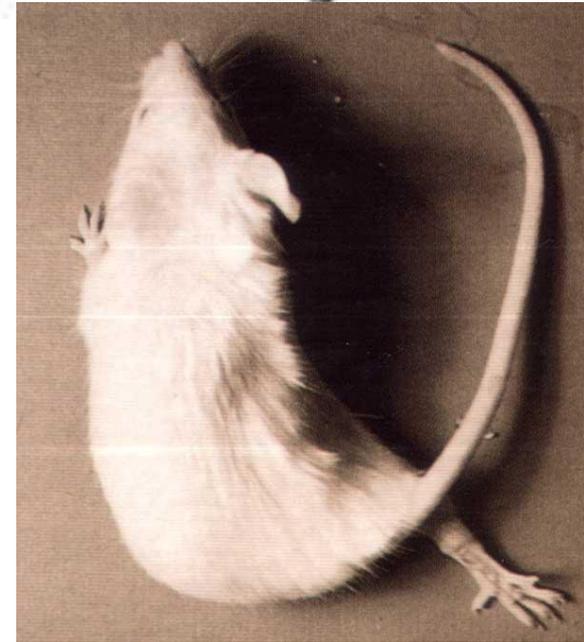
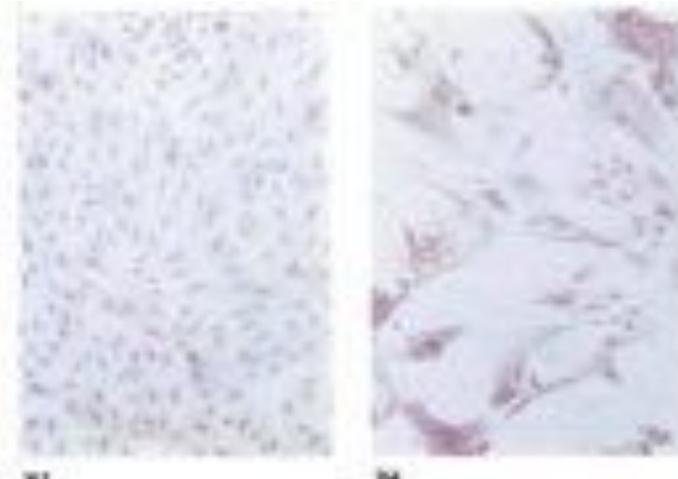
Вирус эпидемического паротита

- **Эпидемический паротит** (от греч. para – около, otos – ухо), синоним – «свинка» – острое инфекционное заболевание, возникающее в основном у детей и характеризующееся преимущественным поражением околоушных слюнных желез.
- В 30% случаев протекает бессимптомно.



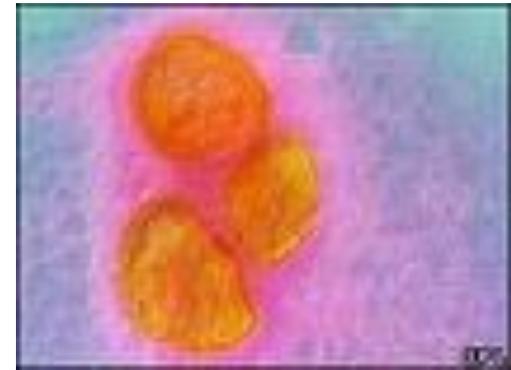
Культивирование

- Куриный эмбрион.
- Первичные и перевиваемые клетки (амниотические клетки человека, клетки HeLa или почечные клетки обезьян). ЦПД в виде синцития или дегенерации.
- Заражение обезьян в слюной протоке. У взрослых мышей при интраназальном введении развивается бессимптомная инфекция, мыши-сосунки, белые крысы и хомяки погибают от энцефалита.



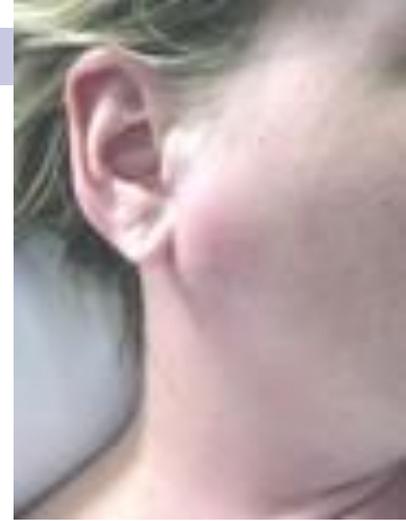
Антигенные свойства

- Два оболочечных гликопротеида **HN** (гемагглютинирующая и нейраминидазная активность) и **F** (от англ. fusion - слияние);
- белок **M**, формирующий внутренний слой вирусной оболочки;
- нуклеокапсидный белок **NP**.



Патогенез

- Источник инфекции – больной человек. Больной заразен в последние дни инкубационного периода (за одни – двое суток до припухания околоушных желез) и в первые три – пять дней от начала заболевания.
- Механизм заражения – аспирационный, пути передачи возбудителя – воздушно-капельный и контактно-бытовой через игрушки, посуду и другие предметы, загрязненные слюной больного.
- Входные ворота – слизистые оболочки ВДП, миндалины.



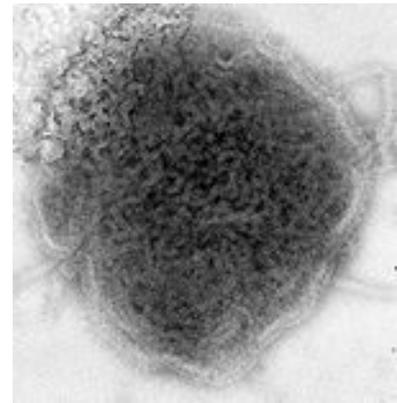
Патогенез

- Первичное размножение вируса в эпителиальных клетках ВДП и в шейных лимфоузлах → кровь (первичная вирусемия) → слюнные железы (околоушные, подъязычную, подчелюстную), активно размножается → кровь (вторичная вирусемия) → железистые и другие органы (яички, яичники, поджелудочная и щитовидная железы, мозг) → орхит, менингит, менингоэнцефалит, реже тиреоидит, полиартрит, нефрит, панкреатит.
- Наиболее поражаемые органы: слюнные железы, половые железы, поджелудочная железа, щитовидная железа, ЦНС, суставы.
- В 20-30% случаев паротит осложняется орхитом, возможна атрофия яичек.
- Возбудитель выделяется из организма со слюной и мочой.
- Формируется стойкий иммунитет.



Микробиологическая диагностика

- **Материал:** слюна, СМЖ, моча, кровь.
- **Вирусологический метод:** заражают 7-9 дневных куриных эмбрионов, амниотическую жидкость исследуют в РГА и РТГА.
- **Серологический метод:** РСК, РТГА, ИФА.
- **Аллергический метод:** внутрикожная проба к вирусному аллергену (инактивированная вытяжка куриного эмбриона, зараженного вирусом паротита).



Профилактика

- **Живая культуральная паротитная вакцина.** Плановые прививки проводят двукратно в 12-15 мес. и 6 лет детям, не болевшим паротитом. Экстренную профилактику проводят детям с 12 мес., подросткам и взрослым, не болевшим паротитом и ранее не привитым против этой инфекции, а также имевшим контакт с больным паротитом не позднее 72 ч после контакта.

