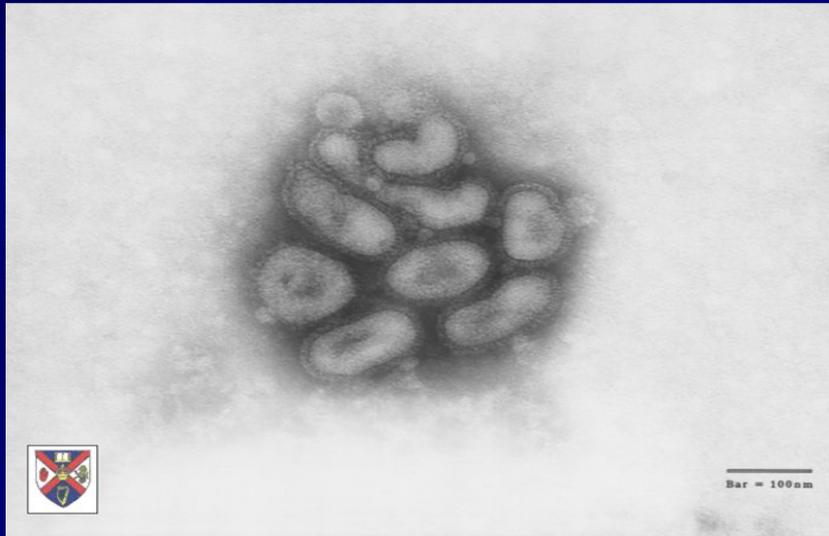


Вирусы гриппа. Лабораторная диагностика вирусов гриппа.



ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №11
Частная микробиология
Для студентов ОмГМА

- **ТЕМА: Миксовирусы. Вирусологическая диагностика гриппа, парагриппа, кори.**

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. Вирусы гриппа, их характеристика.
2. Методы лабораторной диагностики гриппа.
3. Специфическое лечение и профилактика гриппа.
4. Вирусы парагриппа, их характеристика.
5. Методы лабораторной диагностики парагриппа.
6. Вирус кори, его характеристика.
7. Методы лабораторной диагностики кори.
8. Специфическое лечение и профилактика кори.

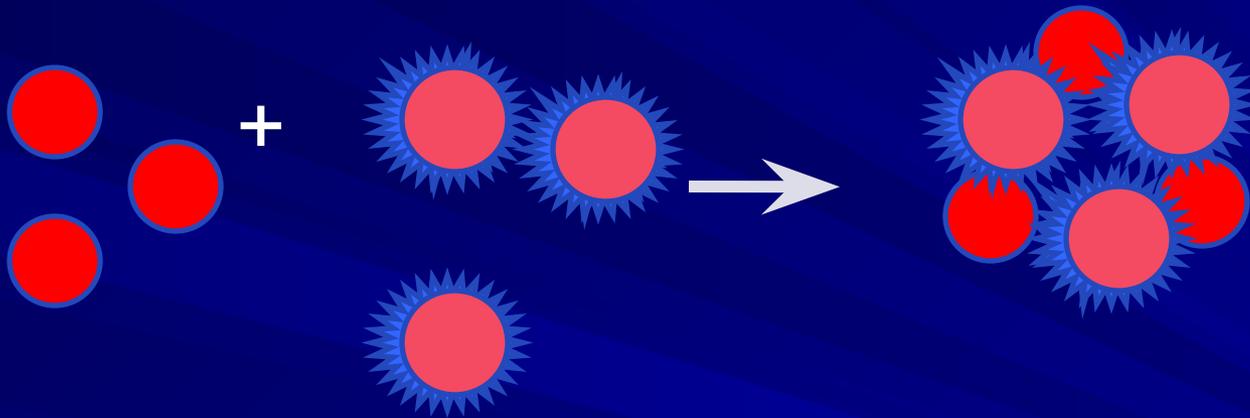
ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА:

1. Поставить и зарегистрировать реакцию вирусной гемагглютинации для обнаружения вируса гриппа в амниотической жидкости куриного эмбриона.
2. Поставить и зарегистрировать РТГА с целью серологического типирования вируса гриппа.
3. Зарегистрировать РТГА, поставленную с целью серодиагностики гриппа.
4. Зарегистрировать РСК, поставленную с целью серодиагностики кори.
5. Биопрепараты: гриппозные и парагриппозные диагностикумы для РТГА, гриппозная вакцина, коревой и гриппозный иммуноглобулин, ремантадин.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

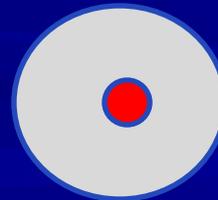
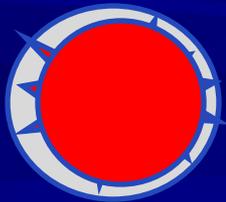
- Гемагглютинины вирусов склеивают эритроциты.
- Это свойство используют в реакции гемагглютинации для индикации и титрования вирусов, что необходимо для последующей постановки РТГА.
- РТГА основана на блокаде антигенов вирусов (гликопротеиновых «шипов» - гемагглютининов) антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.
- РТГА применяют для диагностики инфекций, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

Реакция гемагглютинации

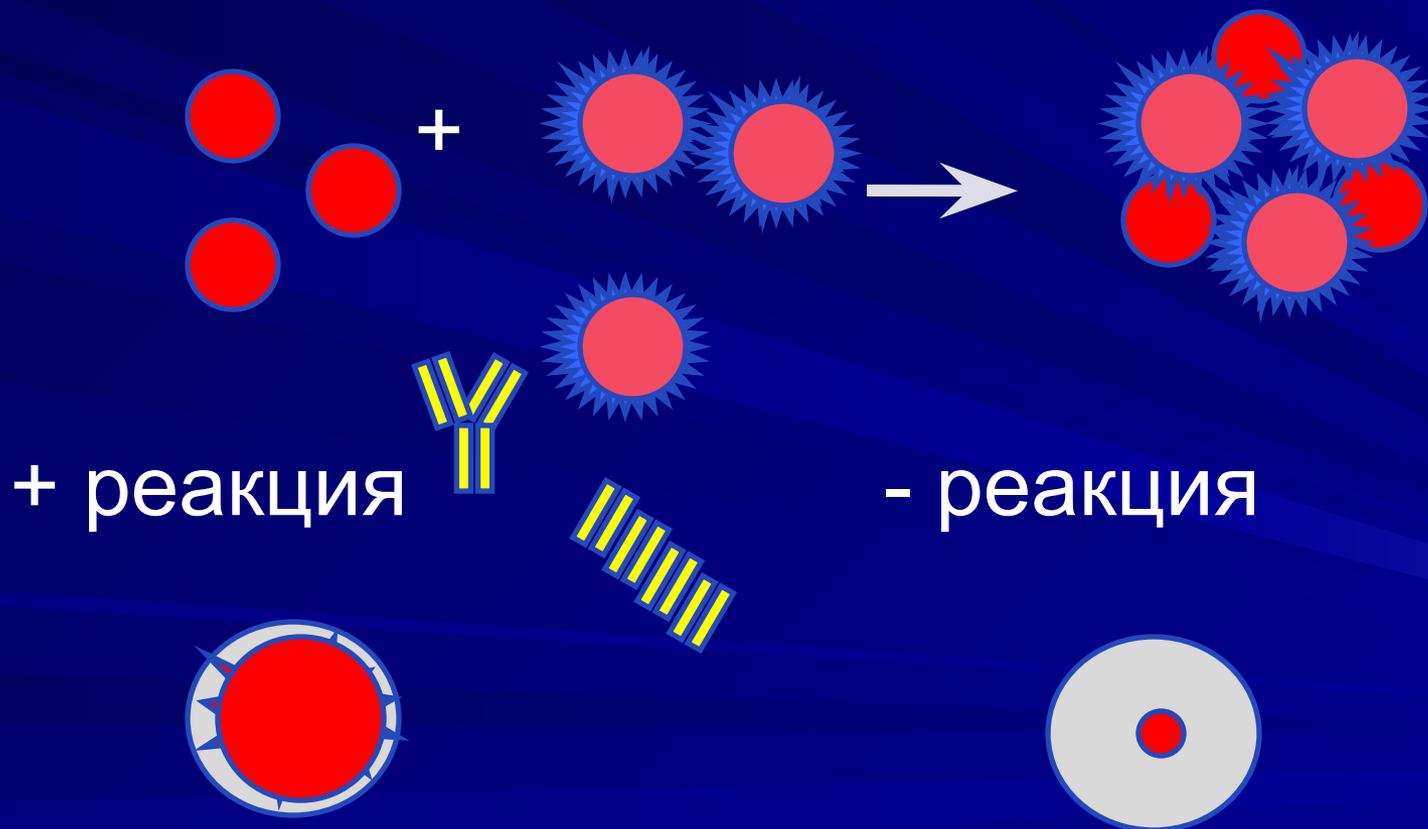


+ реакция

- реакция



Реакция торможения гемагглютинации



Заболлеваемость и смертность от гриппа во время 1 мировой войны

1914-1918 гг.	Первая мировая война	1918-1919 гг.	Пандемия Гриппа
	Убито		Умерло
	• 8 млн.400 тыс.		• 20-40 млн.
	Ранено		Заболело
	• 17 млн. 33 тыс.		• 100-500 млн.

Грипп

- Франц. Grippe, gripper – схватывать, царапать.
- Грипп - острое инфекционное вирусное заболевание человека, вызываемое вирусами Influenzavirus, характеризующееся поражением респираторного тракта, лихорадкой, общей интоксикацией, нарушением деятельности сердечно-сосудистой и нервной системы.

1. История

- 1933 г. Смит, Эндрюс и Лейдлоу впервые выделили специфический пневмотропный вирус из легких хомячков, зараженных смывами из носоглотки больных гриппом, и обозначенный ими как вирус гриппа типа А.
- В 1940 году Френсис и Мэджил открыли вирус гриппа типа В.
- в 1947 году Тейлор выделил еще один новый вариант вируса гриппа — типа С.

- Грипп представляет собой широко распространенное заболевание, которое периодически вызывает эпидемии среди людей, свиней, птиц и изредка среди других видов животных, например, тюленей.
- Отличительной чертой вируса гриппа является его вариабельность, которая способна изменять его антигенную структуру столь значительно, что установившийся в ответ на инфекцию определенным штаммом специфический иммунитет может дать незначительную защиту или почти совсем ее не обеспечить по отношению к вирусам, которые появляются впоследствии.

2. Характеристика вирусов гриппа.

- Возбудители гриппа подразделяются на **три серотипа вируса: А, В, С.**
- Они отличаются по ряду структурных и эколого-эпидемиологических признаков.
- Вирусы: А был открыт в 1933 г.,
В - в 1940 г.,
С - в 1947 г.
- Последовательность открытия вирусов гриппа находилась в соответствии с их значимостью в инфекционной патологии человека и с уровнем вирулентности этих возбудителей для людей.
- Самая высокая вирулентность у вируса А, и она незначительно выражена у вирусов группы С.
- Возбудители гриппа - пневмотропные **РНК-содержащие вирусы с фрагментированным геномом.**

Структура и свойства

- Вирус гриппа (*Mixovirus influenzae*)
- Семейство ортомиксовирусов. Названия которых происходят от греческого "ортос" - правильный и "микса" - слизь, и отражают сродство вирусов к муцинам секретов слизистых оболочек.
- Он имеет сферическую, реже - овальную структуру и размер 80-120 нанометров. В препаратах вирусов, свежевыделенных от больных людей, чаще встречаются нитевидные формы частиц
- Сердцевина вируса содержит **одноцепочечную отрицательную цепь РНК**, состоящую из 8 фрагментов, которые кодируют 10 вирусных белков. Фрагменты РНК имеют общую белковую оболочку, которая объединяет их, образуя нуклеопротеид.

Структура и свойства

- Снаружи вирус покрыт **липидной оболочкой**. Именно липиды ответственны за ту тяжелую интоксикацию, которая поражает человека во время болезни.
- На поверхности вируса находятся **выступы гликопротеиновые шипы**:
 - **гемагглютинин НА** и
 - **нейраминидаза НА**

 **гемагглютинин НА** - обеспечивает способность вируса присоединяться к клетке, а назван по способности агглютинировать эритроциты.

 **нейраминидаза НА** (фермент) - отвечает, во-первых, за способность вирусной частицы проникать в клетку-хозяина, и, во-вторых, за способность вирусных частиц выходить из клетки после размножения.

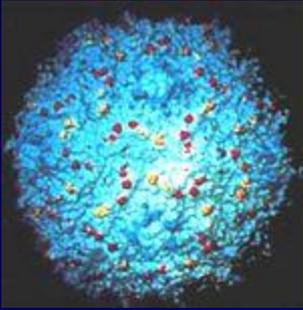
 **haemagglutinin (НА)**, тример 135\AA

 **neuraminidase (НА)**, тетрамер 60\AA

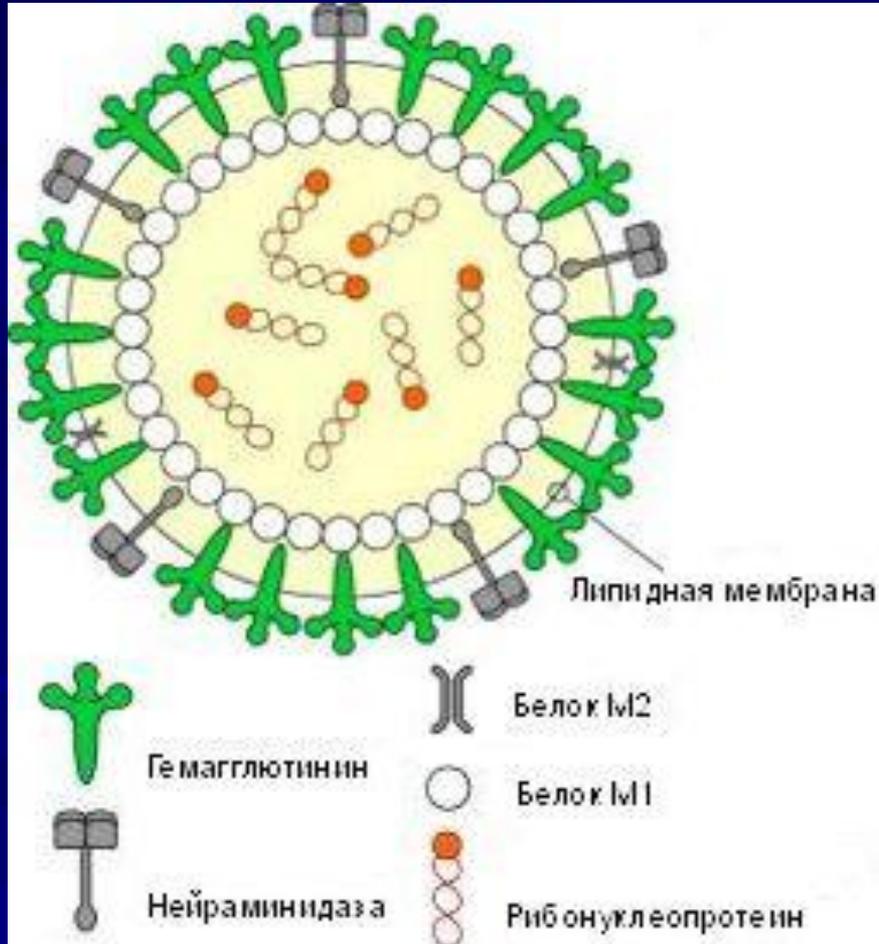
 Внутренняя сторона оболочки выстлана матриксным белком (**matrix protein**).

 Частицы относительно нестабильны, чувствительны к высушиванию, высокой температуре (свыше 50C), ультрафиолету, ко всем детергентам, разрушающим липиды, формалину.

Структура и свойства



- Нуклеопротеид (также называемый S-антигеном) постоянен по своей структуре и определяет тип вируса (А, В или С). Поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидаза - V-антигены), напротив, изменчивы и определяют разные штаммы одного типа вируса.



Схематическое строение вируса гриппа

Антигенные вариации (реассортация)

- Антигенные вариации являются результатом молекулярных изменений в поверхностных белках вирусов гриппа, т. е. в гемагглютанине (HA) и нейраминидазе (NA), которые отражают изменения в нуклеотидных последовательностях соответствующих генов.
- Существует два типа изменений, которые происходят с HA и NA: они протекают по разным механизмам и известны в литературе как антигенный «дрейф» и антигенный «шифт».

Антигенный дрейф и шифт

- **Антигенный дрейф** происходит в пределах подтипа и включает в себе серию точечных мутаций на уровне гена с образованием новых вариантов вируса, вызывающие межэпидемические и межэпизоотологические вспышки (**эпидемии**), каждый из которых слабо отличается от своего предшественника.
- **Антигенный шифт – «скачок»** (применительно к вирусу гриппа) – резкая или полная смена одного или др. поверхностного антигена (НА и/или NA).

Обусловлен пересортировкой и полной заменой гена, кодирующего НА или NA.

Обычно является результатом рекомбинаций, происходящих при попадании в одну клетку двух разных подтипов вирусов.

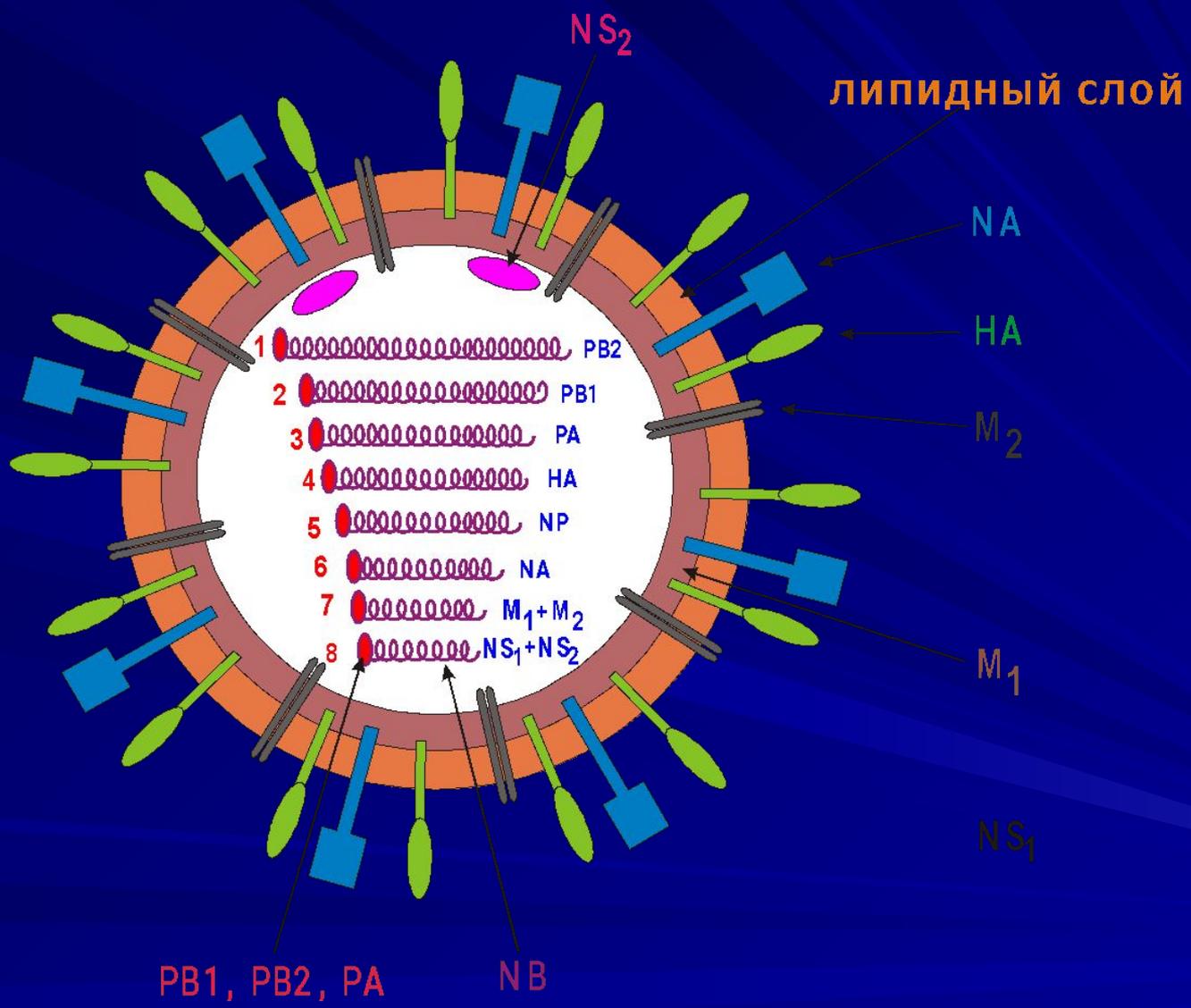
Т.е. появляется вирус с иной антигенной структурой. В этом случае в популяции появляются вирусы гриппа с поверхностными антигенами, не похожими на антигены непосредственно предшествующих им вирусов. Появление такого вируса неизбежно сопровождается **пандемическим** распространением вируса.

- Выделение вирусов показывает, что антигенный шифт может происходить в вирусе гриппа в свиньях.

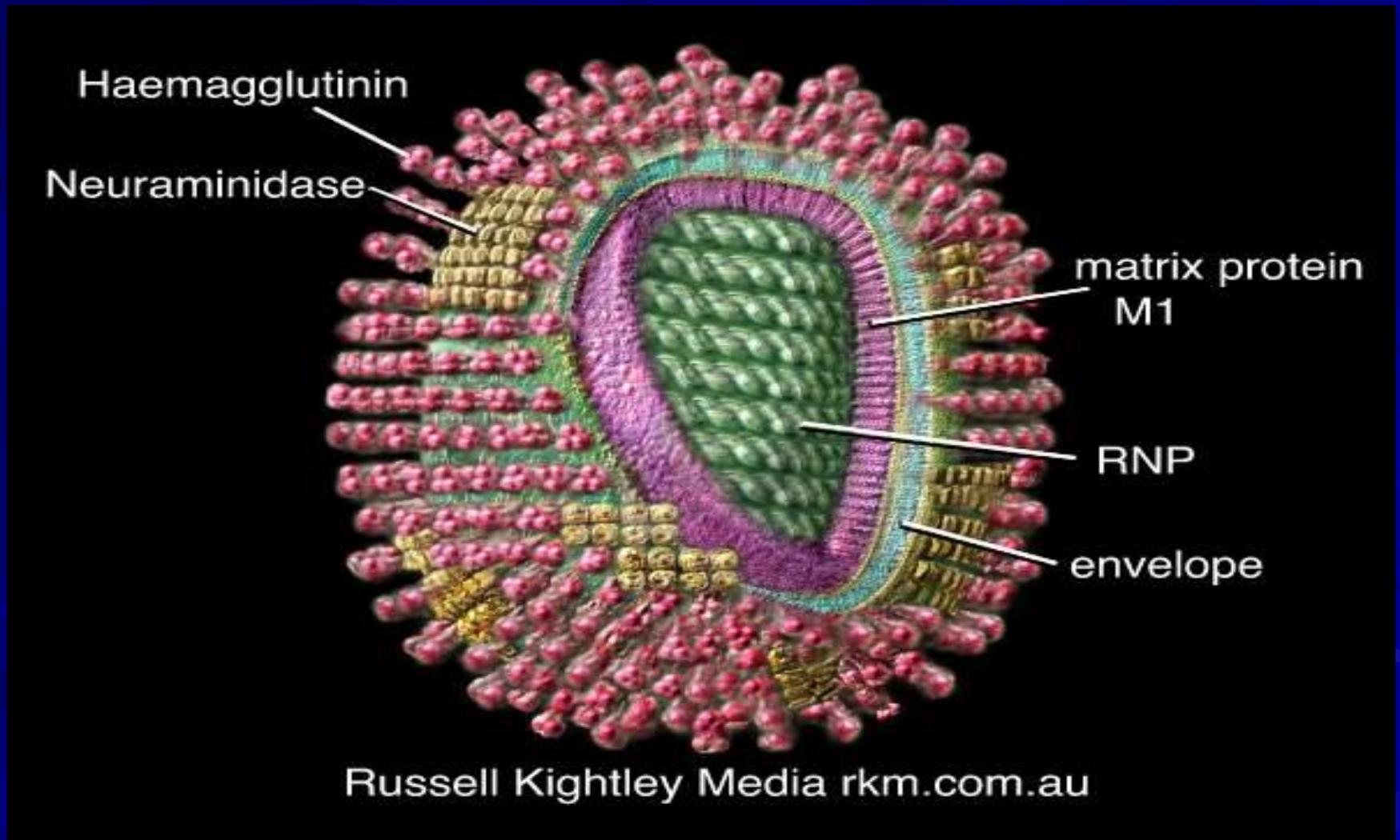
- Происхождение этих новых вирусов еще неясно; некоторые могут образовываться в результате генетической пересортировки между штаммами вируса гриппа человека и животных; другие могут находиться в дремлющем состоянии в течение длительных периодов времени перед повторным их появлением.
- Вследствие антигенных вариаций по существу невозможен эффективный контроль гриппозной инфекции с помощью вакцинации.
- На распространение и тяжесть эпидемий гриппа влияют также вариации в вирулентности, круге хозяев и трансмиссibilityности вируса.

Детерминанты патогенности

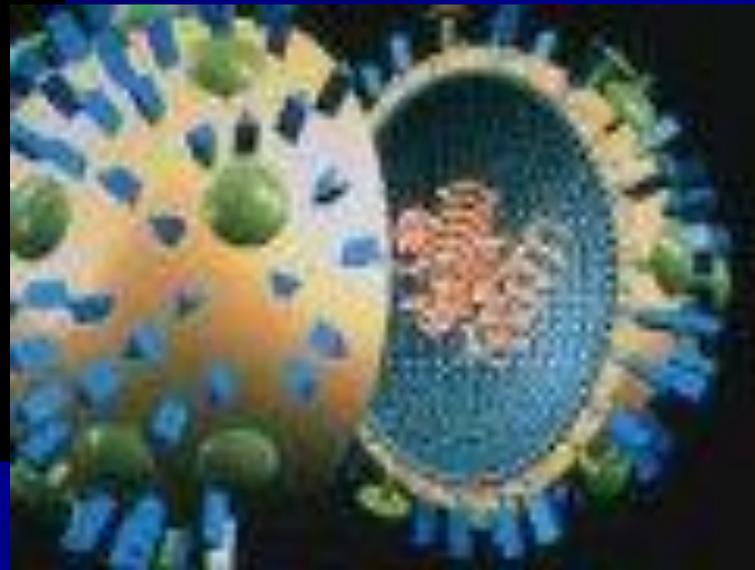
- Исследования первичной структуры генома высоко патогенных для людей штаммов вирусов гриппа H5N1 и H7N7 (1997-2004 гг. выделения), выполненные в различных лабораториях мира, показали, что они содержат в сайте расщепления молекулы **гемагглютинаина на две субъединицы множественные последовательности основных аминокислот (МАП)**, что является главным признаком патогенности возбудителя для кур (Hatta et al., 2001).
- Наличие таких мутаций обеспечивает вирусу высокую инфекционную активность и патогенность.
- Особенностью высоко патогенных штаммов является их способность сорбироваться не только на **сиаловых клеточных рецепторах** птиц ($\alpha 2-3Gal$), что свойственно обычным птичьим вирусам, но и на человеческих рецепторах ($\alpha 2-6Gal$).



Схематическое изображение вирусной частицы.



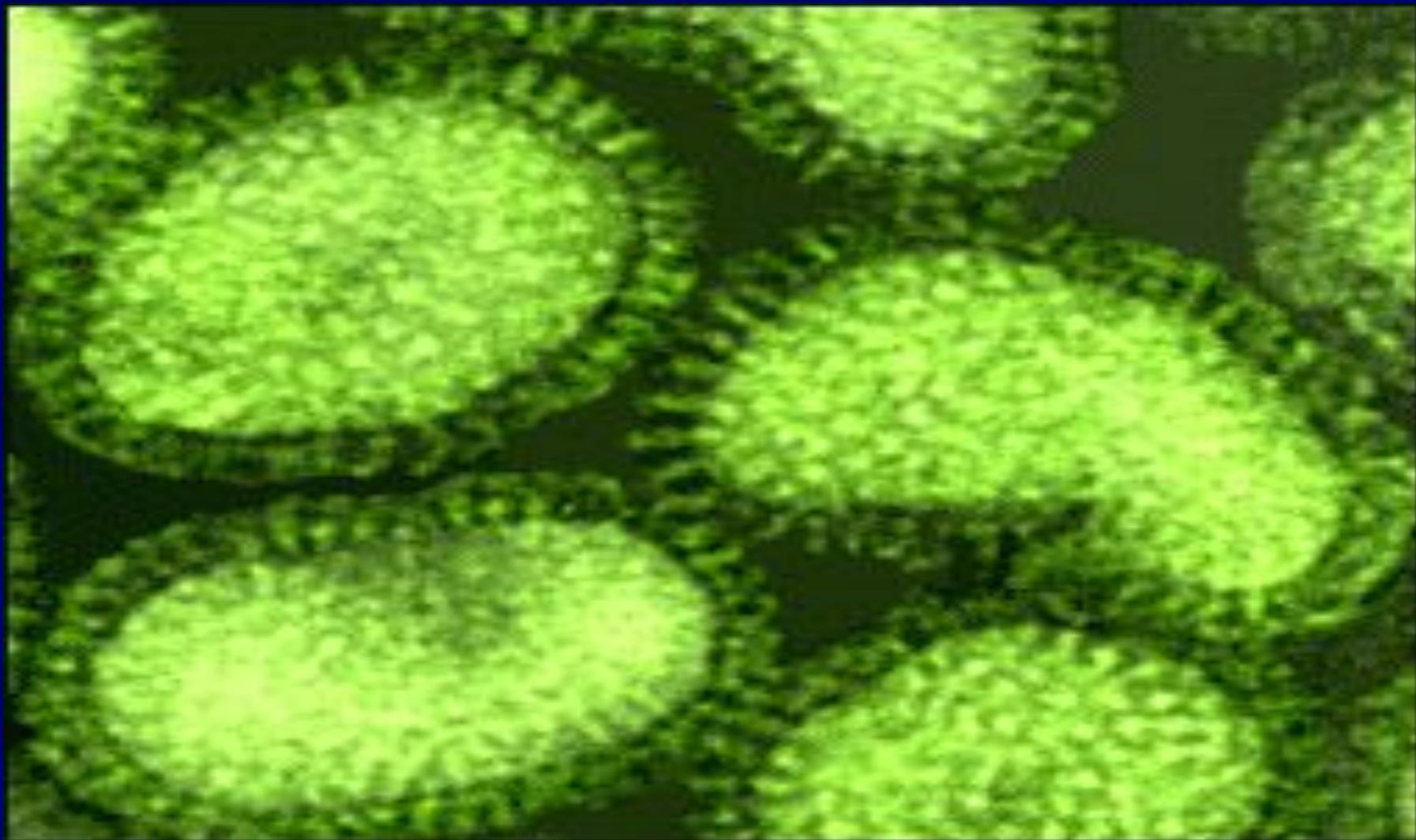
3. Вирусы гриппа типов А, В и С – сопоставление ЭТИОЛОГИИ.



Вирус гриппа А.

- Вирус гриппа А как правило вызывает заболевание средней или сильной тяжести.
 - Поражает как человека, так и некоторых животных (лошадь, свинья, хорек, птицы). Именно вирусы гриппа А ответственны за появление пандемий и тяжелых эпидемий.
 - Представлен несколькими серотипами и антигенными вариантами, которые различаются по составу гемагглютинаина и нейраминидазы.
 - Возбудители значительно более вирулентны и контагиозны, чем вирусы В и С.
 - В настоящее время известно:
 - 17 субтипов гемагглютинаина (Н1 – Н17) и
 - 10 субтипов нейраминидазы (N1-N10).
- Все они были выделены от птиц и постоянно реассортируют друг с другом в различных комбинациях.
- Нейраминидаза N1 сочетается с тремя гемагглютинаинами Hsw1N1, H0N1 и H1N1. Вирусам с нейраминидазой N2 свойственны 2 гемагглютинаина – H2N2 и H3N2. Каждый из 5 подтипов вируса А вызвал определённый пандемический цикл.

Электронная микрофотография вируса гриппа А



Электронная микрофотография вируса гриппа А



Электронная микрофотография вируса гриппа А



Пандемии гриппа А в прошлом

Пандемии гриппа – редкое, но повторяющееся явление. В предыдущее столетие произошли три пандемии и одна большая эпидемия:

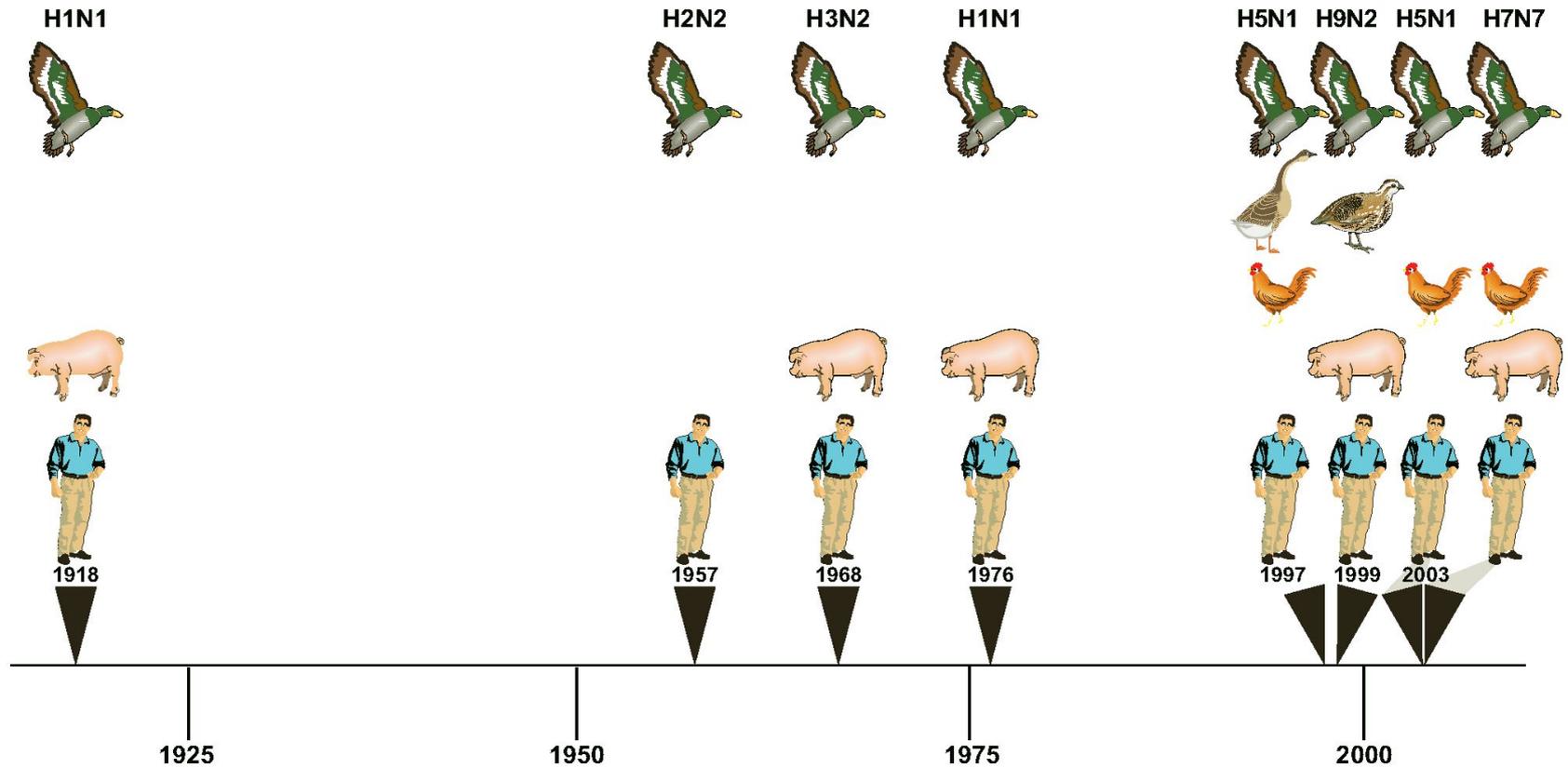
- «Испанка» в 1918-1921 гг;
- «Азиатский грипп» в 1957 году;
- «Гонконгский грипп» в 1968 году
- «Русский грипп» в 1977 году (на самом деле он южно-азиатский).

По данным экспертов ВОЗ пандемия 1918 года привела к гибели от 40 до 50 миллионов людей. Эта исключительно масштабная пандемия считается одним из наиболее смертоносных инфекционных событий в человеческой истории.

Последующие эпидемии были намного более умеренными: число жертв в 1957 году составило более 2 млн человек, а в 1968 – около 1 миллиона человек.



Вирус гриппа – прошлое и будущее



Вирусы гриппа В

- Эти возбудители по уровню вирулентности, контагиозности и значению в эпидемиологии группа уступает вирусам гриппа А.
- Эпидемии гриппа В возникают реже, не захватывают страну в целом и развиваются, как правило, лишь в масштабах большого города, региона.
- Кардинальные отличия в антигенной структуре вирусов гриппа А и В подтверждаются отсутствием перекрестной защиты как в опытах на мышах, так и в наблюдениях на людях которые в период смешанных эпидемий могут болеть дважды за счет обоих возбудителей.
- Изменчивость вирусов гриппа В носит более постепенный и медленный характер, чем у возбудителей гриппа А.
- Все известные вирусы гриппа В могут быть подразделены на **4 антигенных варианта**.
- Вирусы гриппа В выделены только от людей. Болеют чаще дети

Вирус гриппа С.

- Впервые человек переболевает вирусом гриппа С в детском возрасте.
- Грипп С носит как правило характер локальных вспышек в детских коллективах или изолированных случаев заболевания, чаще выявляемых в период эпидемий гриппа А и В.
- Характерной особенностью вируса гриппа С является **наличие одного гликопротеида во внешней оболочке.**
- В составе вируса **нет фермента нейраминидазы**, хотя имеется **рецепторно-разрушающий фермент**, полностью отличающийся от известных вирусных нейраминидаз.
- Вирус характеризуется низкой адаптационной способностью к клеткам куриных эмбрионов и различным клеточным культурам. Антигенные изменения для вируса гриппа С не отмечены.

Электронная микрофотография вируса гриппа С

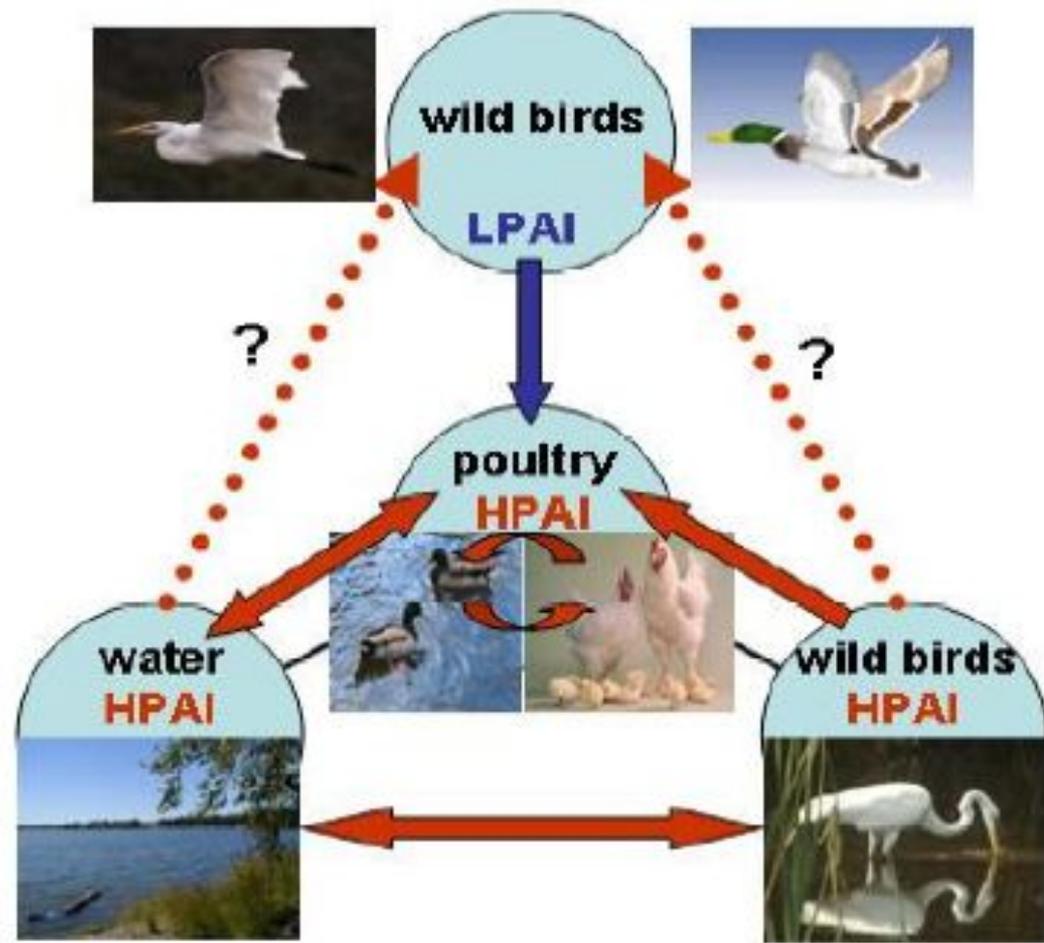


4. Птичий грипп

- Грипп птиц – высококонтагиозная вирусная инфекция, которая может поражать все виды пернатых.
- Из домашних видов наиболее чувствительными являются индюки и куры.
- Дикие виды птиц могут служить переносчиками вируса.
- В мае 1997 г. в Гонконге от респираторного заболевания умер 3 – летний мальчик. Это был первый лабораторно подтвержденный случай гриппа А(Н5N1) у человека.
- 13 февраля 2006 г. в различных странах (Гонконг, Камбоджи, Китай, Индонезия, Таиланд, Вьетнам, Ирак, Турция) подтвержден 171 случай гриппа А(Н5N1) у людей.

Модель происхождения и распространения высоко патогенного вируса гриппа птиц H5N1

Figure 2. Model of an HPAI spreading cycle





Новые исследования доказали, что домашние утки могут выделять летальный вирус H5N1 без проявления внешних признаков заболевания. Эта «молчаливая» роль домашних уток может объяснить, почему для некоторых случаев среди людей не удалось выявить непосредственных контактов с пораженными птицами



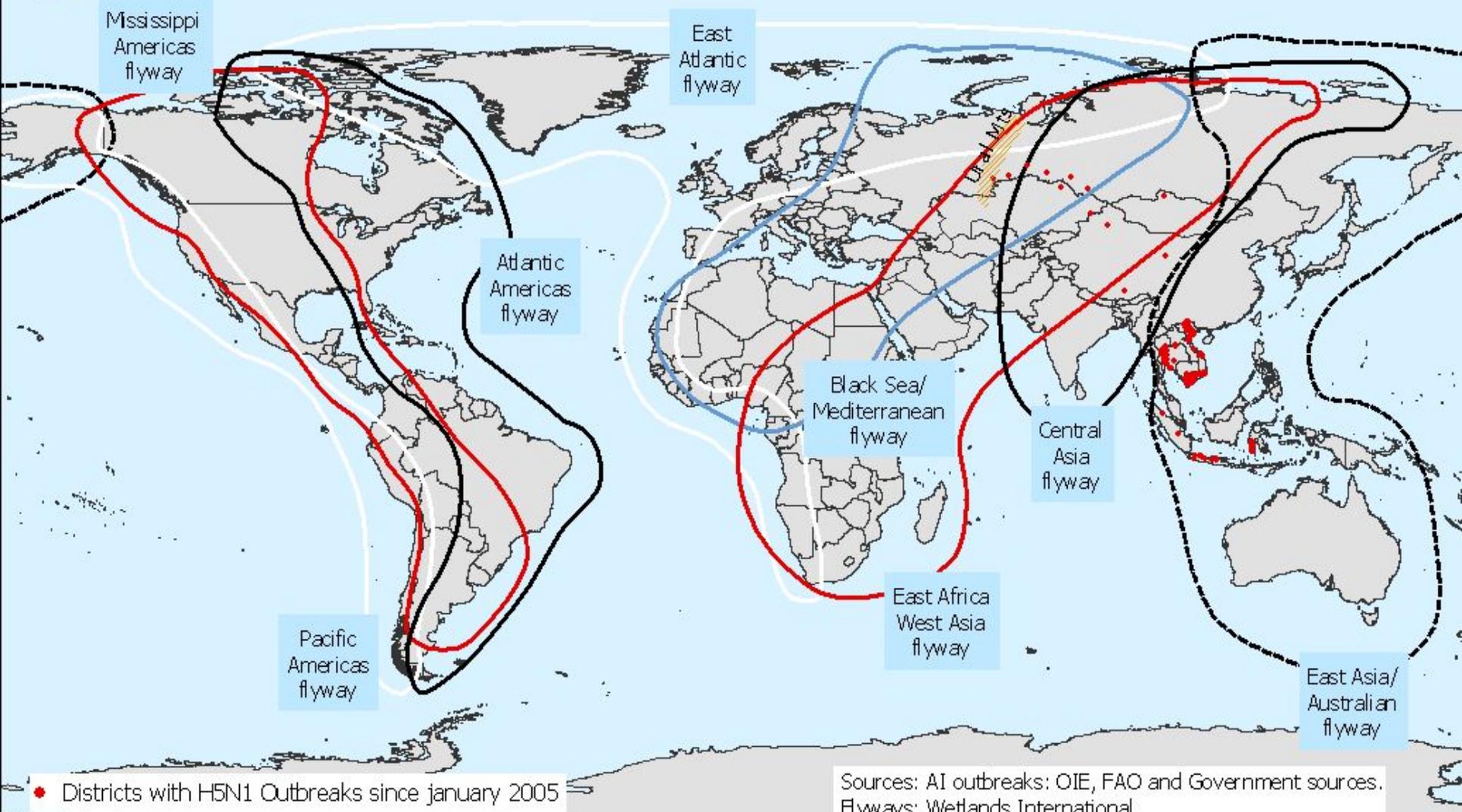
*Поскольку вирус
циркулирует в отдаленных
сельских районах,
быстрая его элиминация
из птичьих стай более не
представляется возможной*

Вспышки гриппа H5N1 и основные миграционные маршруты перелетных птиц

Данные на 30 августа 2005 г.

H5N1 outbreaks in 2005 and major flyways of migratory birds

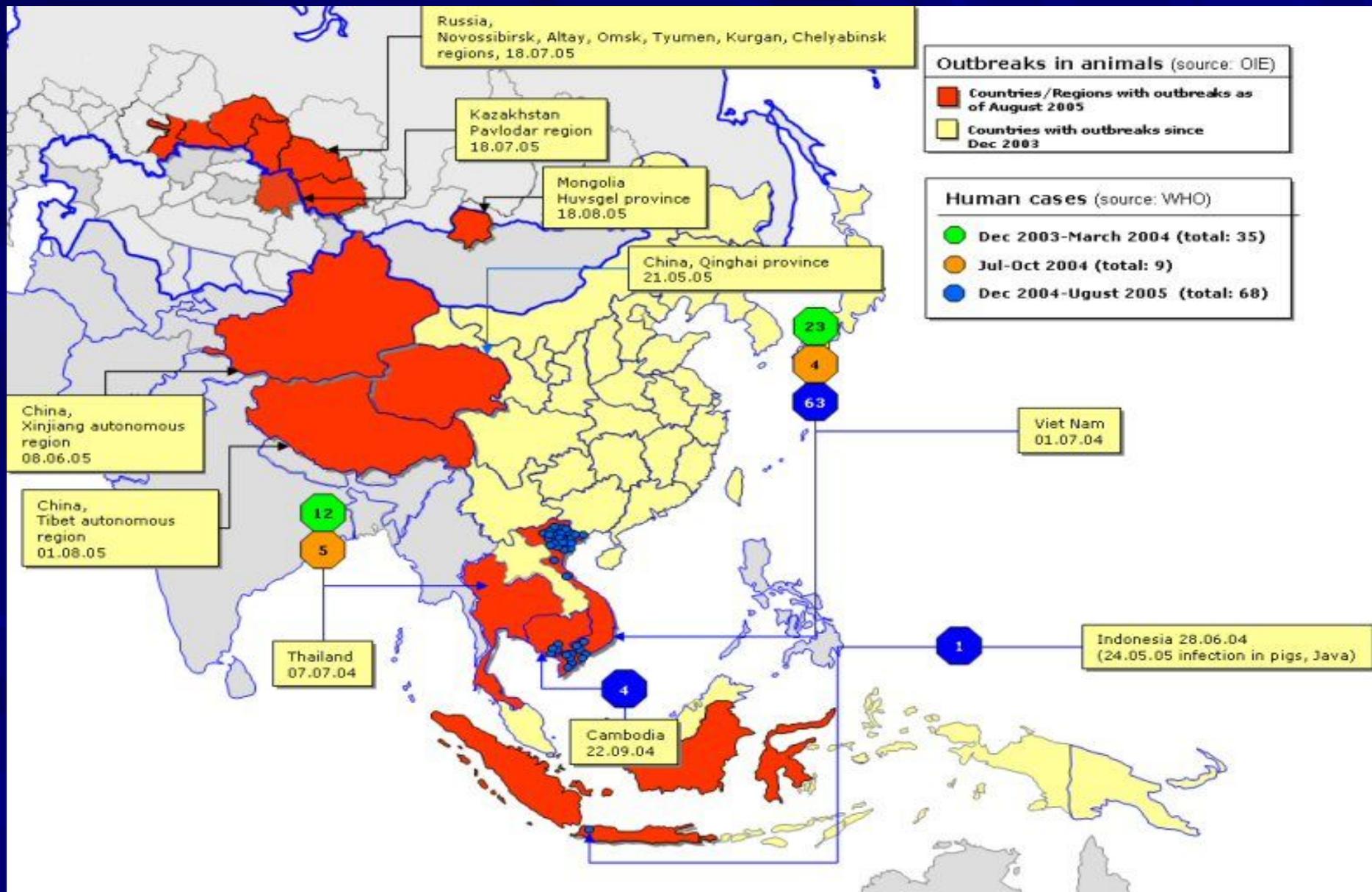
Situation on 30 August 2005



Sources: AI outbreaks: OIE, FAO and Government sources.
Flyways: Wetlands International

Вспышки птичьего гриппа у животных (данные OIE)

Случаи заболеваний птичьим гриппом у людей (данные ВОЗ)



Природноочаговый характер гриппа

Весьма вероятно, что вирусы гриппа в целом и так называемого «птичьего гриппа», в частности, исходно имеют именно природноочаговое происхождение.

Их природноочаговые «корни», проявляющиеся в связи вирусов с дикими птицами, теперь уже ни у кого не вызывают сомнений. В пользу этой гипотезы говорят следующие факты:

- ❖ вирусы гриппа А способны длительно сохраняться во внешней среде (в воде до месяца при 22°C и до 6-8 мес. - при +4°C);

- в естественных условиях вирусы гриппа способны к антигенному дрейфу - постепенным мутационным процессам, которые приводят к изменениям структуры поверхностных антигенов (гемагглютинаина и нейраминидазы), играющих в значительной мере роль факторов патогенности;
- все известные подтипы вирусов гриппа А обнаружены у птиц (в основном у водоплавающих и околоводных);
- среди вирусов гриппа диких птиц могут быть патогенные для домашних птиц (вызывающие их гибель), различных млекопитающих, в том числе и человека (например вирус H9N2 или всем известный в последнее время вирус H5N1);

- у водоплавающих птиц инфекция обычно протекает бессимптомно; вирус размножается в основном в клетках кишечника и выделяется с фекалиями, а это значит, что грипп у птиц - **типичная инфекция кишечной группы**, для которых не характерна непосредственная прямая передача возбудителя от инфицированной особи здоровой (например, воздушно-капельным путем), но **типично заражение алиментарным путем через воду и (или) пищу**; по всей видимости, именно алиментарным путем заражаются домашние птицы и млекопитающие, а также ластоногие и китообразные;
- **млекопитающие (особенно свиньи) восприимчивы как к вирусам гриппа птиц, так и человека**;
- одновременная **репликация вирусов в организме этих хозяев приводит к реассортации возбудителей**, при которой возможна полная замена фрагментов генома и появление вируса нового или давно отсутствовавшего типа, включая патогенные для человека, способные передаваться воздушно-капельным путем от больных людей здоровым;
- пандемии гриппа обычно начинаются в теплых регионах Юго-Восточной Азии (в частности, в Китае), при этом их возбудители - новые для людей или давно не встречавшиеся подтипы вирусов.

Во многих хозяйствах утки и гуси содержатся в непосредственной близости с курами, свиньями и другими домашними животными в неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях.

Это способствует реализации фекально-орального пути передачи возбудителя, причем в эпизоотию особенно быстро вовлекаются домашние птицы и свиньи. Так возникают антропургические (т.е. в преобразованной человеком среде) очаги гриппа.

Наиболее подходящие для этого условия (абиотические, биотические и социальные) складываются в Юго-Восточной Азии. Именно там периодически возникают эпизоотии среди домашних птиц и первые случаи заболевания людей гриппом.

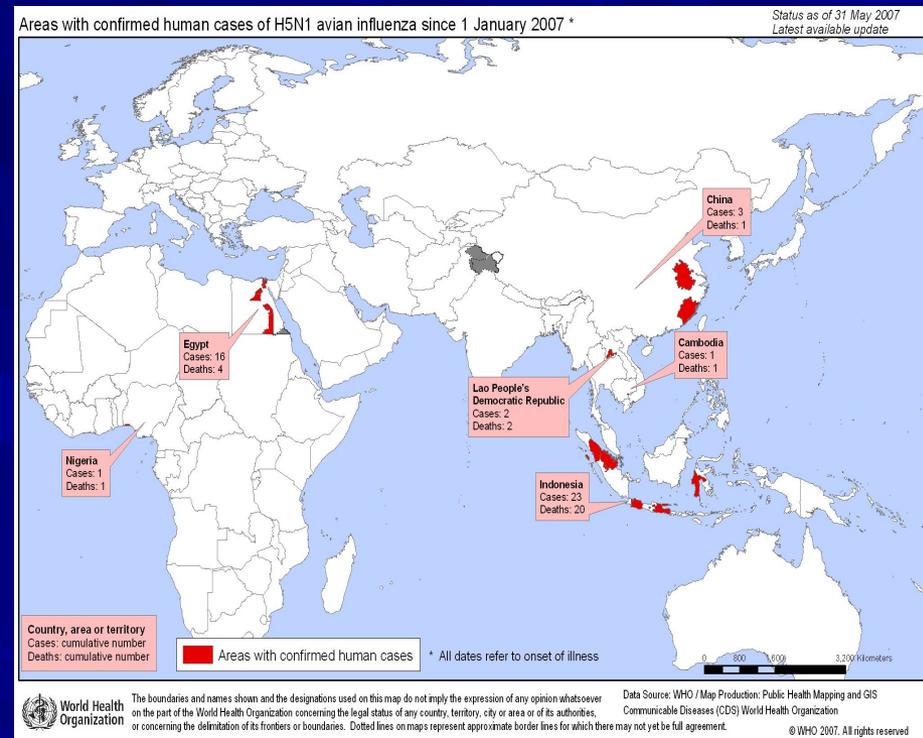
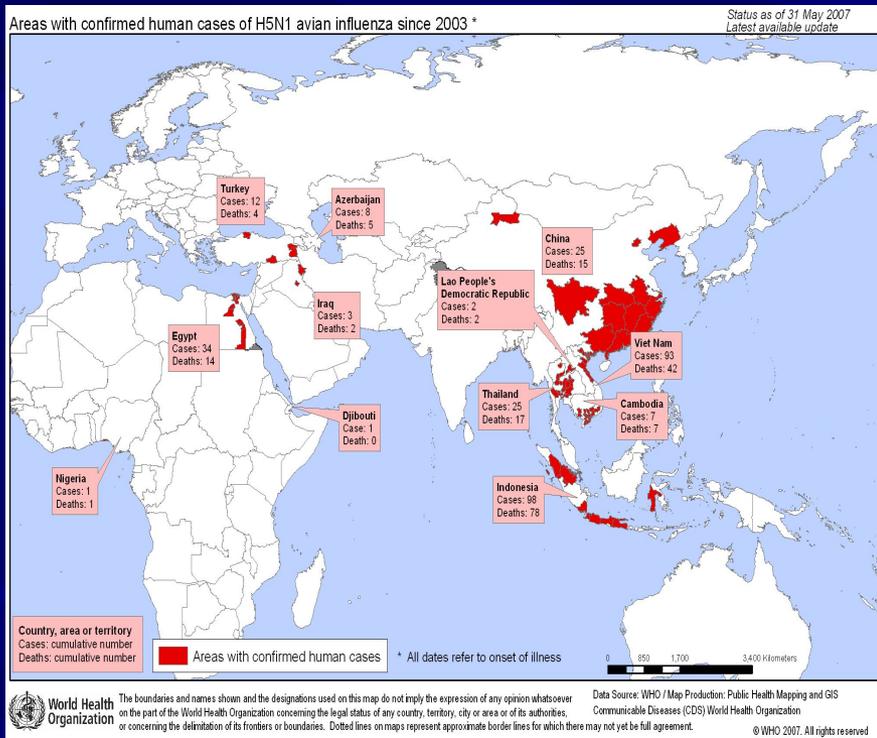
Инфицирование домашних уток (и, видимо, кур) вирусом H5N1, например, происходит не на крупных птицеводческих фабриках, где соблюдаются санитарно-гигиенические правила, а в индивидуальных хозяйствах, где могут заражаться домашние кошки и даже голуби.

За последние годы грипп птиц неоднократно регистрировался в различных странах нашей планеты. Как свидетельствуют эти данные вспышки инфекции регулярно и постоянно возникают в различное время и в различных регионах мира.

В большинстве случаев источники первичных вспышек гриппа не были обнаружены, и эпизоотологических связей между ними в дальнейшем не наблюдается. История высокопатогенного вируса гриппа птиц по опубликованным данным следующая (по годам):

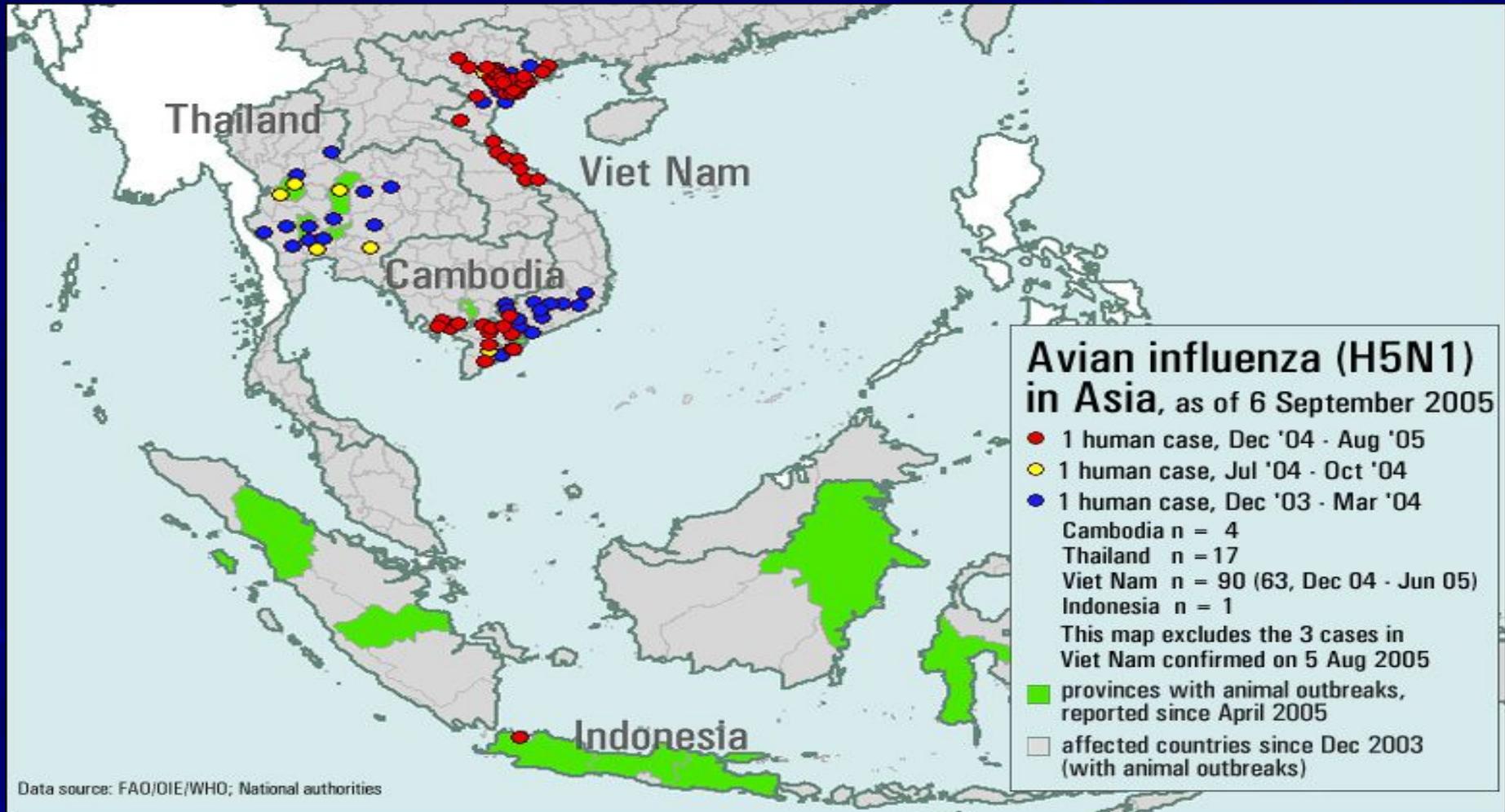
1959 - Шотландия	цыплята
1961 - Южная Африка	крачки
1963 - Англия	индейки
1966 - Канада	индейки
1967 - Советский союз (Таджикская ССР)	цыплята и куры
1976 - Австралия	разные виды птиц
1979 - Германия, Англия	индейки
1983 - США, Ирландия	цыплята, куры, индейки
1985 - Австрия	цыплята
1991 - Англия	индейки
1992 - Австралия	цыплята, утки
1994-95 - Пакистан	цыплята, куры
1997 - Гон Конг, Австралия, Италия	цыплята, страусы
1999 - Италия	413 птицеводческих ферм
2003 - Нидерланды, Германия, Бельгия	цыплята, куры (более 40 млн.)
2004 - Вьетнам, Япония, Таиланд, Китай	цыплята, куры
2005 - Россия (Новосибирск, Тюмень и	утки, куры

Вспышки гриппа птиц у людей, вызванных вирусом гриппа подтипа H5N1, в Восточном полушарии с 2003 по 2007 год (левый слайд) и с 1 января по 31 мая 2007 г.



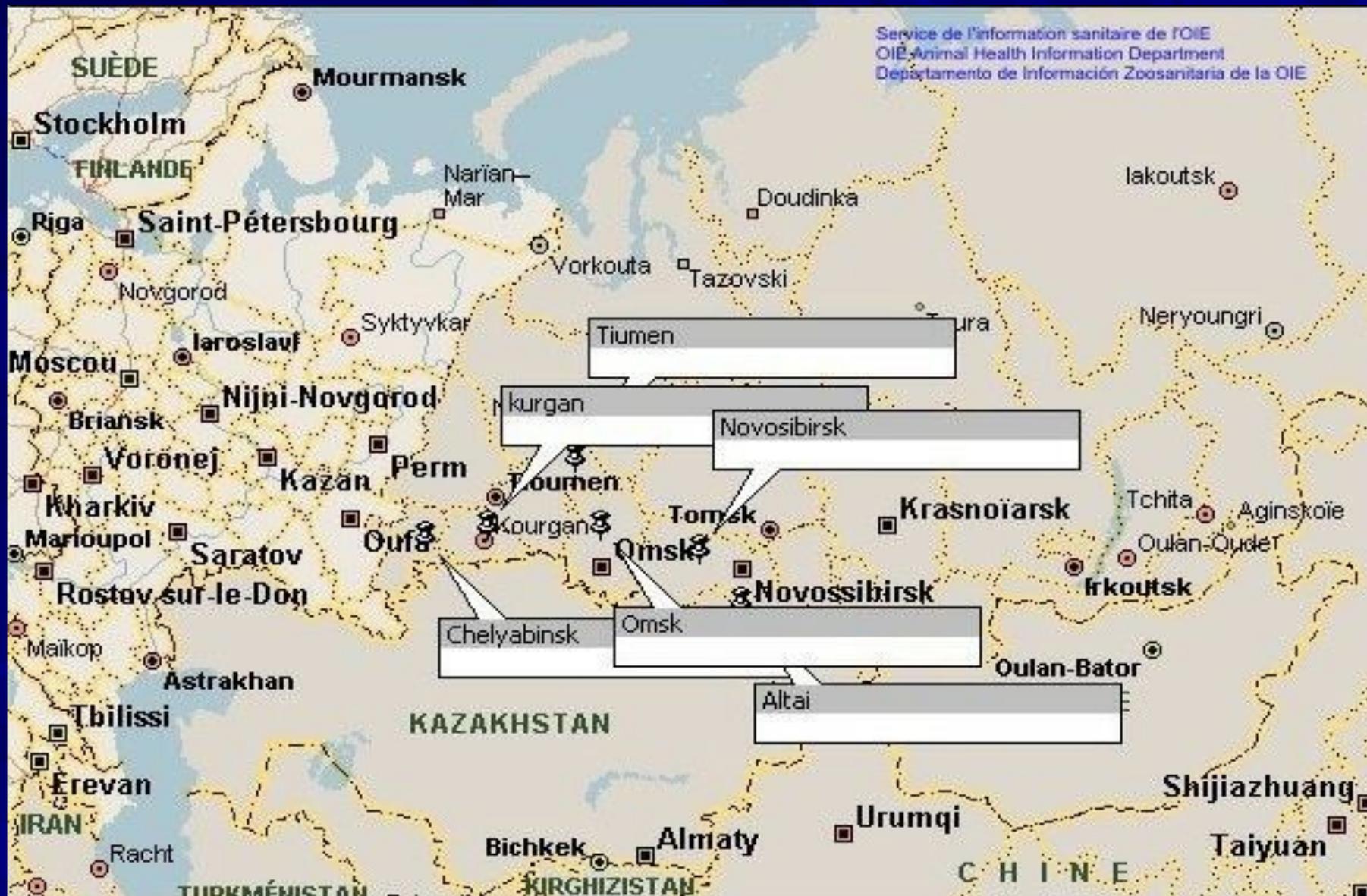
Распространение гриппа H5N1 в странах Юго-Восточной Азии и России

Данные на 6 сентября 2005 г.



Disclaimer: The presentation of material on the maps contained herein does not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or areas or its authorities of its frontiers or boundaries.

Вспышка вируса гриппа птиц H5N1 в



Эпизоотия, вызванная вирусом гриппа птиц H5N1-подтипа среди диких и домашних птиц в Сибири летом 2005 года

Дислокация и перемещения птичьего гриппа





*Более 120 миллионов
птиц погибли или были
уничтожены в течение трех
месяцев
(вверху:WHO/Huang-Liang
China; внизу: AP)*

Оценка потерь валового национального продукта в связи с потерями ферм из-за эпидемии птичьего гриппа в 2004 году^a

Таиланд	US\$ 1,2 миллиарда
Вьетнам	US\$ 0,3 миллиарда
Азия	US\$ 10 – 15 миллиардов

^a Источник: Лондонская школа международной экономики. Оценки потерь птицефабрик основаны на предположении, что полностью утрачены все птицы за один квартал года. Оценка общих потерь валового национального дохода учитывает, множественное воздействие на Азию от потерь на птицефабриках. Повышение риска для здравоохранения, связанного с птичьим гриппом, делает более серьезными проблемы жизнеобеспечения и отрицательно влияет на туризм, что приведет к ежегодным потерям 50 – 60 миллиардов US\$, даже если случаи среди людей по-прежнему будут ограниченными. Увеличение последних будет иметь еще более тяжелые последствия



*Тысячи рабочих птицеферм,
часто не защищенные,
подвергались опасности
заражения во время операции
по выбраковке птиц, создавая
этим дополнительные
возможности для
реассортации вирусов*

Характеристики штамма из с.Суздалка, Новосибирская обл. (данные представлены в ТУ Роспотребнадзора НСО 24 июля 2005 г)

- 1. По серологическим и генетическим данным – это штамм подтипа H5N1;**
- 2. Ген НА этого штамма содержит в сайте разрезания шесть положительно заряженных аминокислот, что говорит о его потенциально высокой патогенности для цыплят и людей;**
- 3. Анализ структуры М-гена показал, что это амантадин-чувствительный вариант;**
- 4. Штамм по структуре генов НА и NA наиболее близок к изолятам, выделенным от диких птиц с места весенней вспышки вируса гриппа птиц на озере Цинхай в Китае в 2005 году. Этот изолят также близок к изолятам от цыпленка из Шанту, Гуандун, Китай, 2004 г. и от вороны в Осаке, Япония, 2003 г.;**
- 5. Тест на патогенность (внутривенозный тест) показал высокую патогенность для цыплят (степень – 3).**

Механизм и пути передачи.

- Вирус попадает в верхние дыхательные пути или на конъюнктиву глаза преимущественно воздушно – капельным путем, а также прямым путем при контакте с инфицированным человеком или опосредованно при соприкосновении с зараженной поверхностью.
- Опасность заражения при приготовлении и употреблении в пищу инфицированной птицы не подтверждена.

Патогенетические особенности.

- Измененный гемагглютинин, облегчает слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной.
- Специфические протеины, пролонгируют репликацию вируса и повышают его резистентность к компонентам противовирусного иммунитета – интерферону, фактору некроза опухоли α , макрофагам и др.
- Относительно низкая заболеваемость людей, несмотря на широко распространенные контакты с больными домашними птицами, свидетельствует о высокой прочности межвидового барьера.
- Репликация вируса происходит в верхних дыхательных путях и желудочно – кишечном тракте.
- В крови был обнаружен высокий уровень хемокинов в сыворотке крови. Это позволило предположить, что тяжесть клинического течения инфекции может быть обусловлена чрезмерной выработкой провоспалительных цитокинов, усугубляющих повреждение тканей.
- Гуморальный иммунный ответ в виде образования защитных антител начинает формироваться у пациентов к 10 – 14 дню от начала болезни.

5. Лабораторная диагностика вирусов гриппа.

1. Выделение и идентификация респираторных вирусов
 - 1.1 Изоляция и идентификация вирусов гриппа
2. Быстрая диагностика гриппа
 - 2.1. Метод иммунофлуоресцентной диагностики гриппа
 - 2.2. Иммуноферментный метод индикации вирусных антигенов
3. Серологические методы диагностики гриппа
 - 3.1. Реакция торможения гемагглютинации для диагностики гриппа
 - 3.2. Определение антител к вирусам гриппа
 - 3.3. Реакция нейтрализации или ELISA

1. Ізоляція і ідентифікація вірусів гриппа.

Faculty of Veterinary Science, Mahidol University

Establish a **Biosafety laboratory class 3 and 2.5**



Faculty of Veterinary Science, Mahidol University



Faculty of Veterinary Science, Mahidol University



• Культивирование вируса гриппа

- Чувствительные системы репродукции вируса гриппа, используемые в лабораториях
- Культуры клеток
 - Vero (клетки почки обезьяны – отсутствие системы интерферона)
 - MDCK (клетки почки спаниэля)
- РКЭ
- Лабораторные животные
 - мыши,
 - Хорьки, норки и т.д
- Птица
 - Куры
 - Индейки
 - Утки

Культивирование

- Ферментер и биореактор для культивирования клеток BioFlo® 3000 (фирма-New Brunswick Scientific, USA)



Культивирование

Использование
генетически
модифицирован-
ных клеток

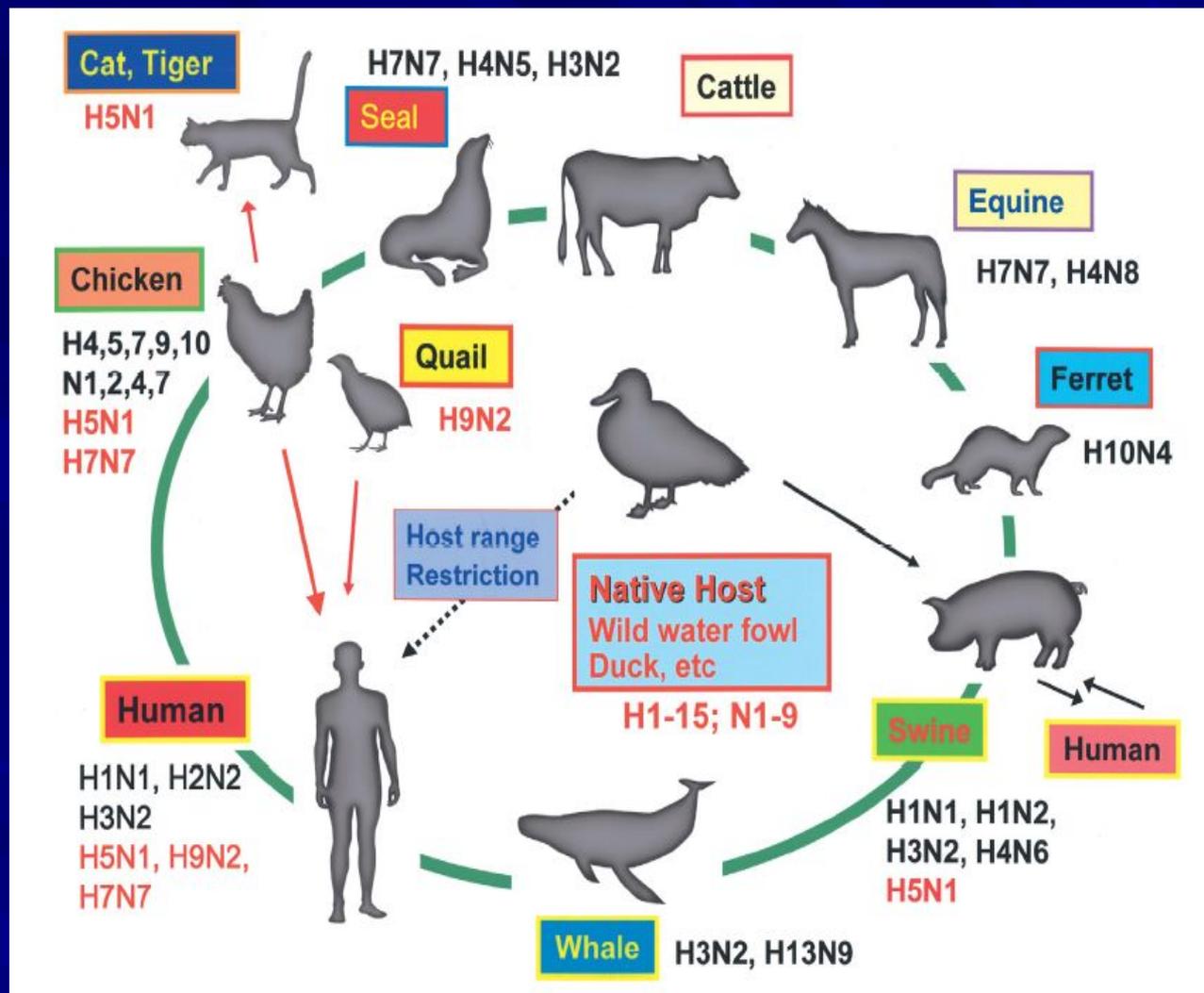
Слева – клетки
SLAM-Vero,
несущие на
поверхности белок –
рецептор для
вируса

Справа – поражение
вирусом на 5 сут

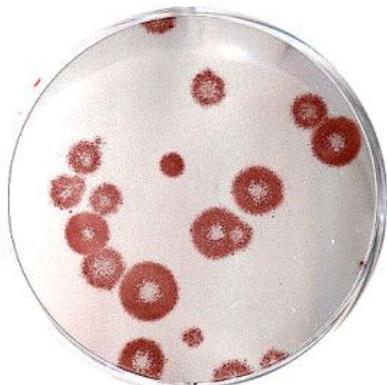


Культивирование

Животные,
чувствитель-
ные к
вирусу
гриппа



Морфологическая картина поражения культур клеток различными вариантами вируса гриппа



A/Memphis/14/96 (H1N1)



A/Hong Kong/1/68 (H3N2)



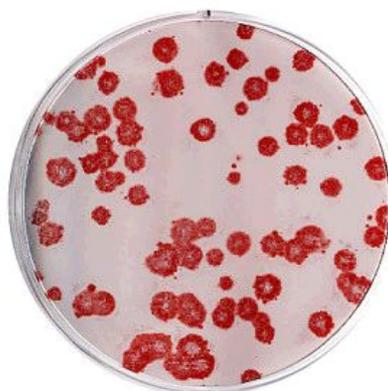
A/Hessen/1/03 (H3N2)



A/Thailand/KAN-1/04 (H5N1)



A/Duck/Alberta/119/98 (H1N1)



A/Duck/Minnesota/1525/81 (H5N1)



A/Chicken/Indonesia/1/05 (H5N1)

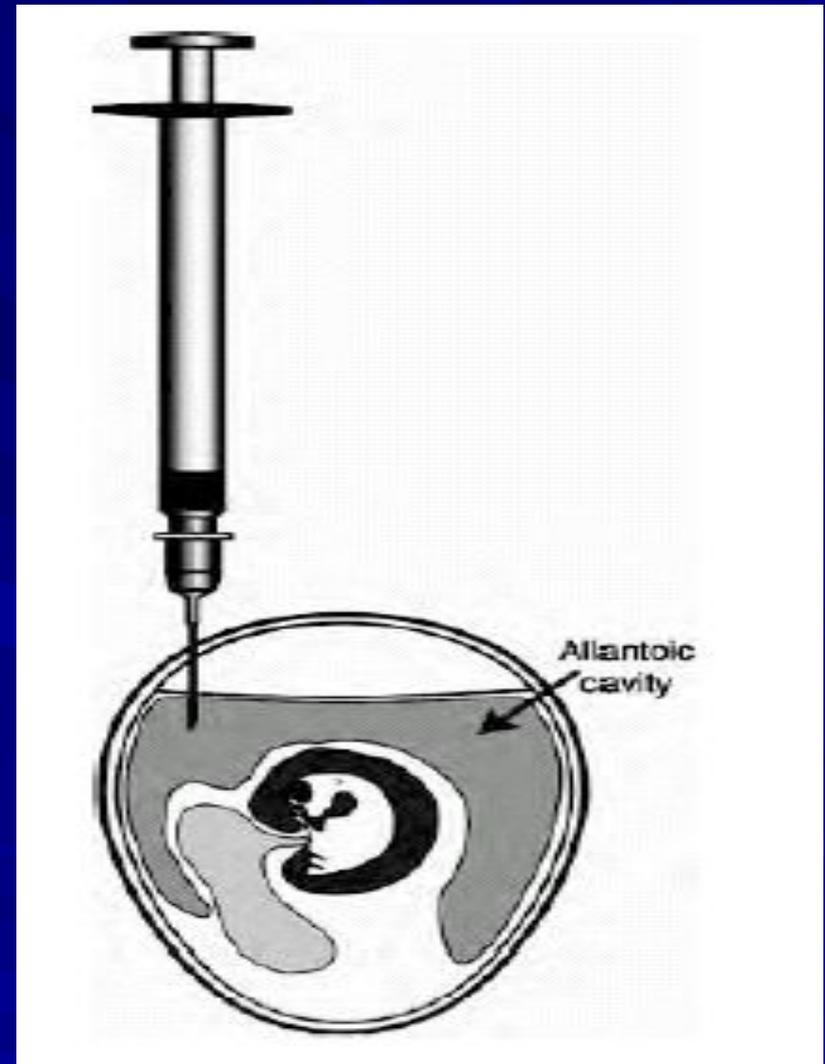


A/Chicken/Germany/R28/03 (H7N7)

Культивирование вируса гриппа

- Заражение РКЭ в хорио-алантоисную жидкость

Используются 9-10 дневные РКЭ. На 2-3 сут эмбрионы вскрывают и изучают.



- Индикация и идентификация
вируса гриппа

- Осуществляют в реакции
гемагглютинации.
- Идентификацию проводят в РТГА
- Типовую принадлежность вируса
определяют по ингибции
гемагглютинации, которая должна быть
зарегистрирована в разведении не
менее чем 1 : 20

2. Быстрая диагностика вируса гриппа (Экспресс-диагностика)

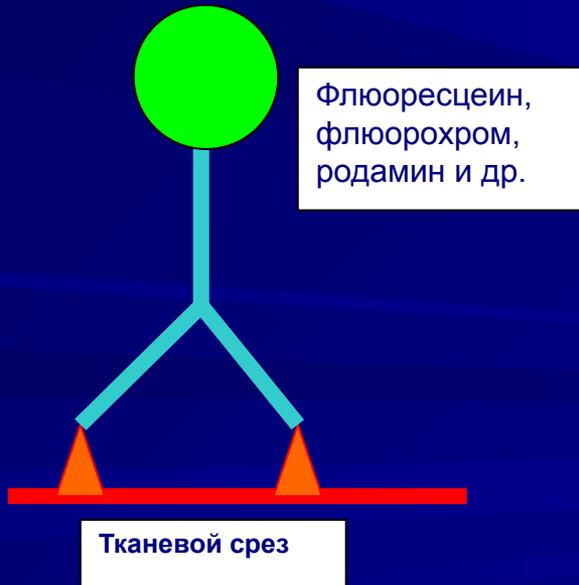
- Метод иммунофлюоресцентной диагностики – позволяет обнаружить вирусные антигены по их характерной локации непосредственно в клетках цилиндрического эпителия за счет взаимодействия антигенов со специфическими противовирусными антителами, меченными **флуоресцеинизотиоционатом**
- Иммуноферментный метод – преимуществом является высокая чувствительность, возможность одновременного анализа большого числа клинических материалов, объективный количественный учет результатов.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) (Метод Кунса)

Экспресс – метод для выявления антигенов или определения антител

Различают три разновидности метода: прямой, непрямой, с компонентом.

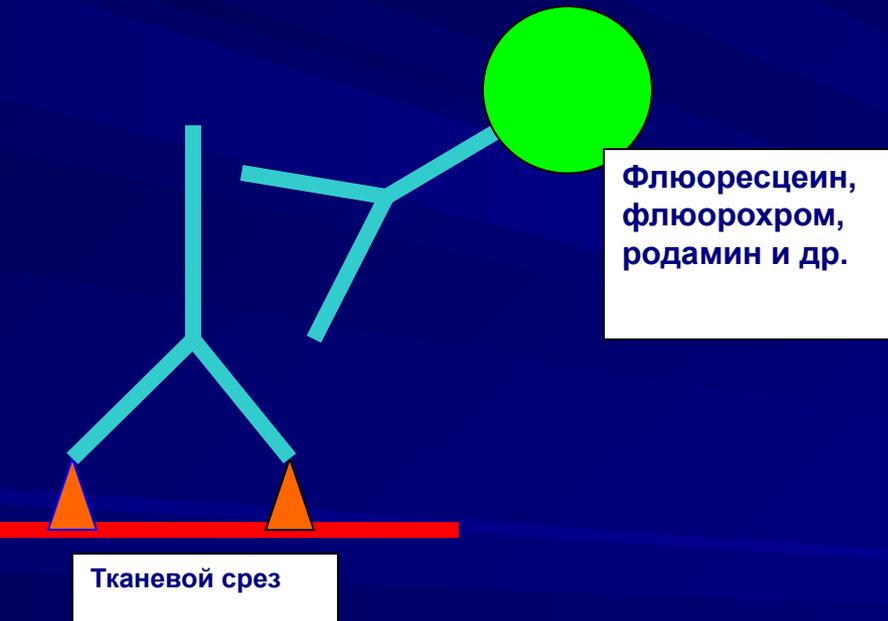
РИФ. Прямой метод



- **Прямой метод РИФ:** Антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами мечеными флюорохромами способны светиться в УФ и синих лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люмсывороткой и отмытые буфером, светятся по периферии клетки в виде каймы зелёного цвета.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Непрямой метод

РИФ. Непрямой метод



- **Непрямой метод РИФ:** заключается в выявлении комплекса $Ag+AT$ с помощью антиглобулиновую сыворотку, меченную флюорохромом.
- Мазки из взвеси микробов (Ag), обрабатывают специфической антимикробной кроличьей сывороткой. Затем антитела (AT), не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах AT выявляют обрабатывая мазки с помощью антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс:
 $Ag + AT +$ антимикробные кроличьи антитела, меченные флюорохромом.
- Этот комплекс наблюдают в люминисцентном микроскопе
- Метод эффективнее прямого РИФ, т.к. к первичному антителу может присоединяться несколько молекул меченого антитела.

Иммуноферментный анализ

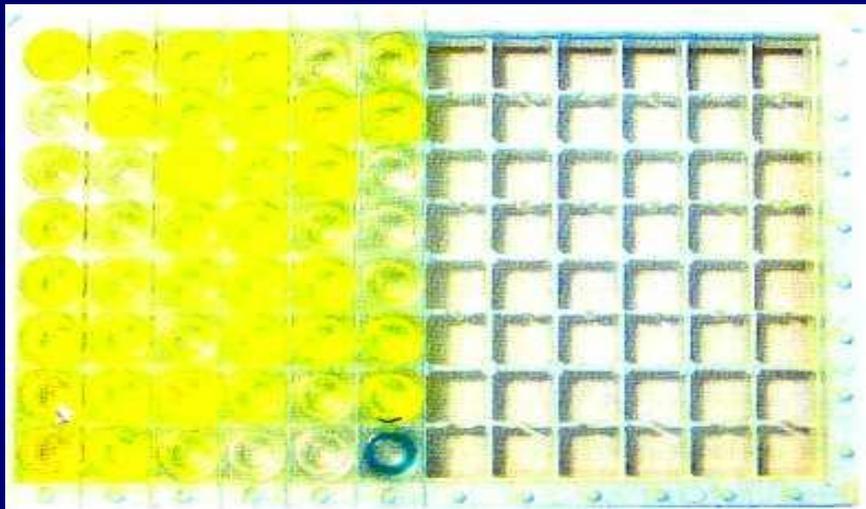
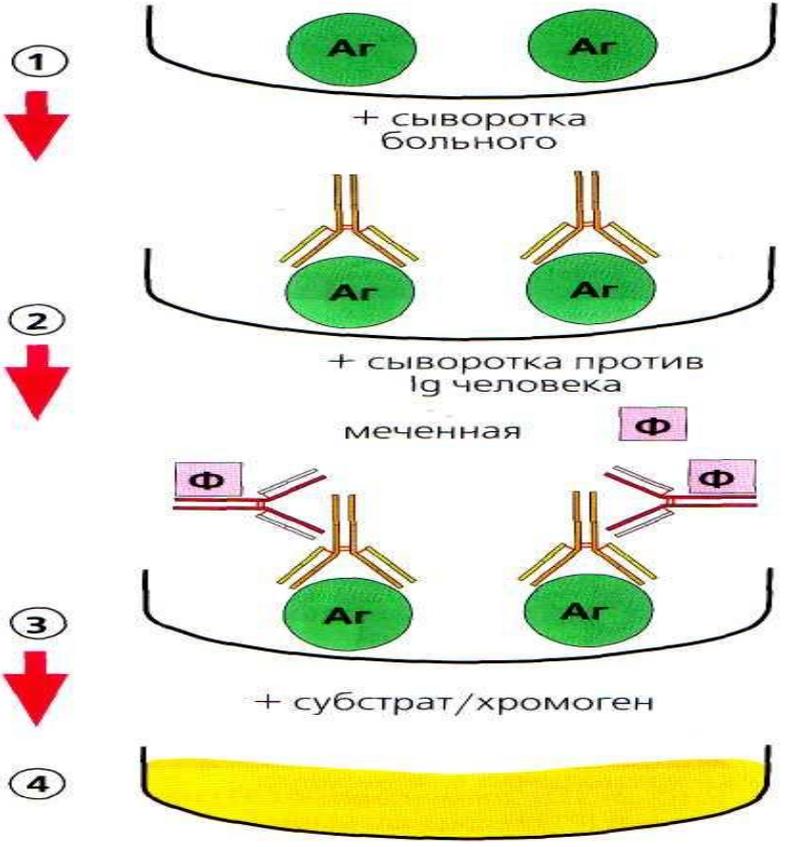
выявление антигенов или антител с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченой ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат пероксидазы - перекись водорода.

Субстрат расщепляется ферментом, что в конечном итоге приводит к изменению цвета продукта реакции: интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связанных молекул антигена и антител.

Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты.

Твердофазный ИФА — вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшеток из полистирола.



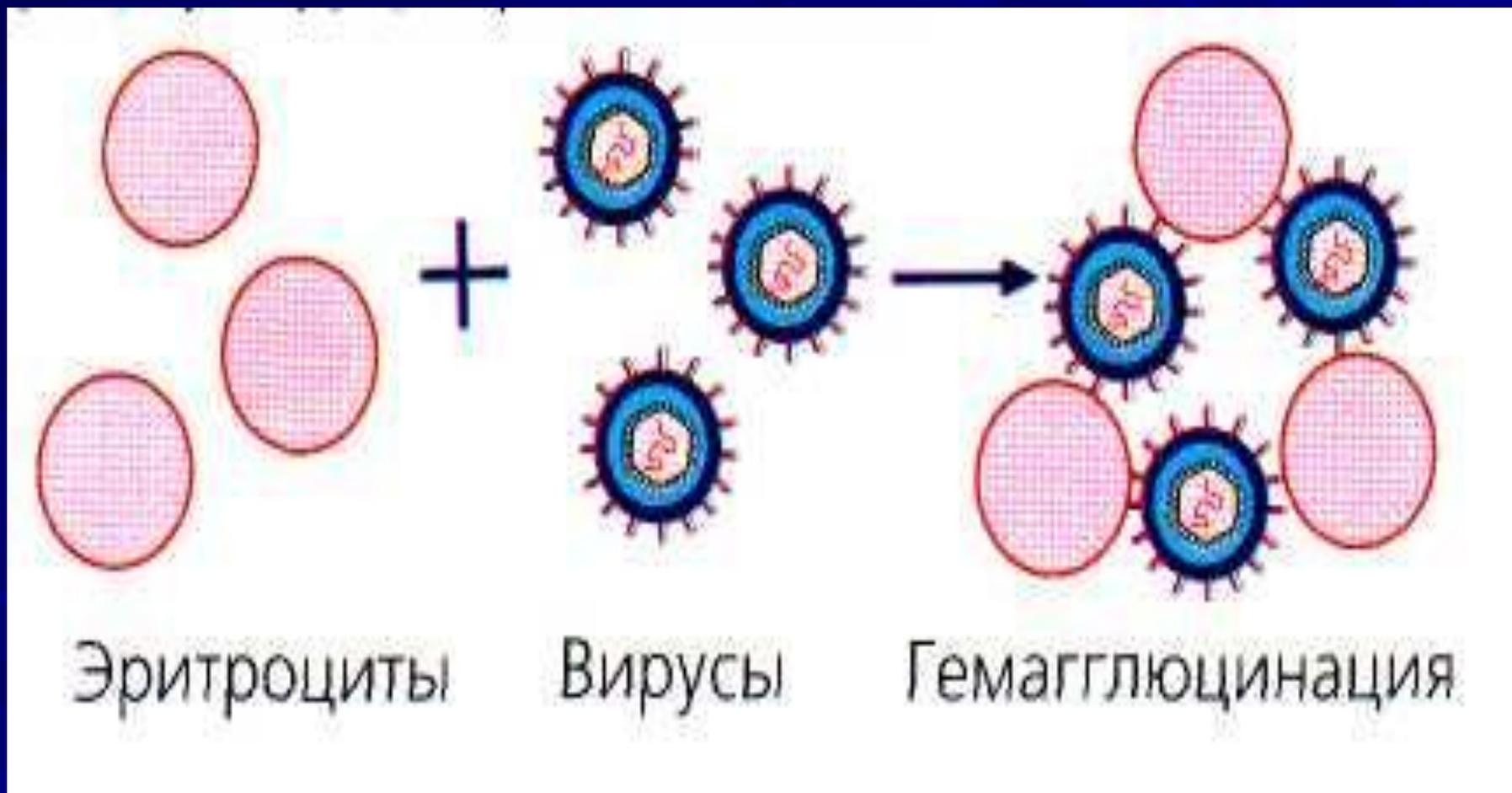
3. Серологические методы диагностики гриппа

- Применяют РТГА, РСК, ИФА, РБН
- Диагноз ставится при четырёхкратном увеличении титра At в парных сыворотках от больного, полученных с интервалом 10-14 дней.
- РТГА – метод основан на подавлении гемагглютинирующей активности вируса в присутствии специфических антител.

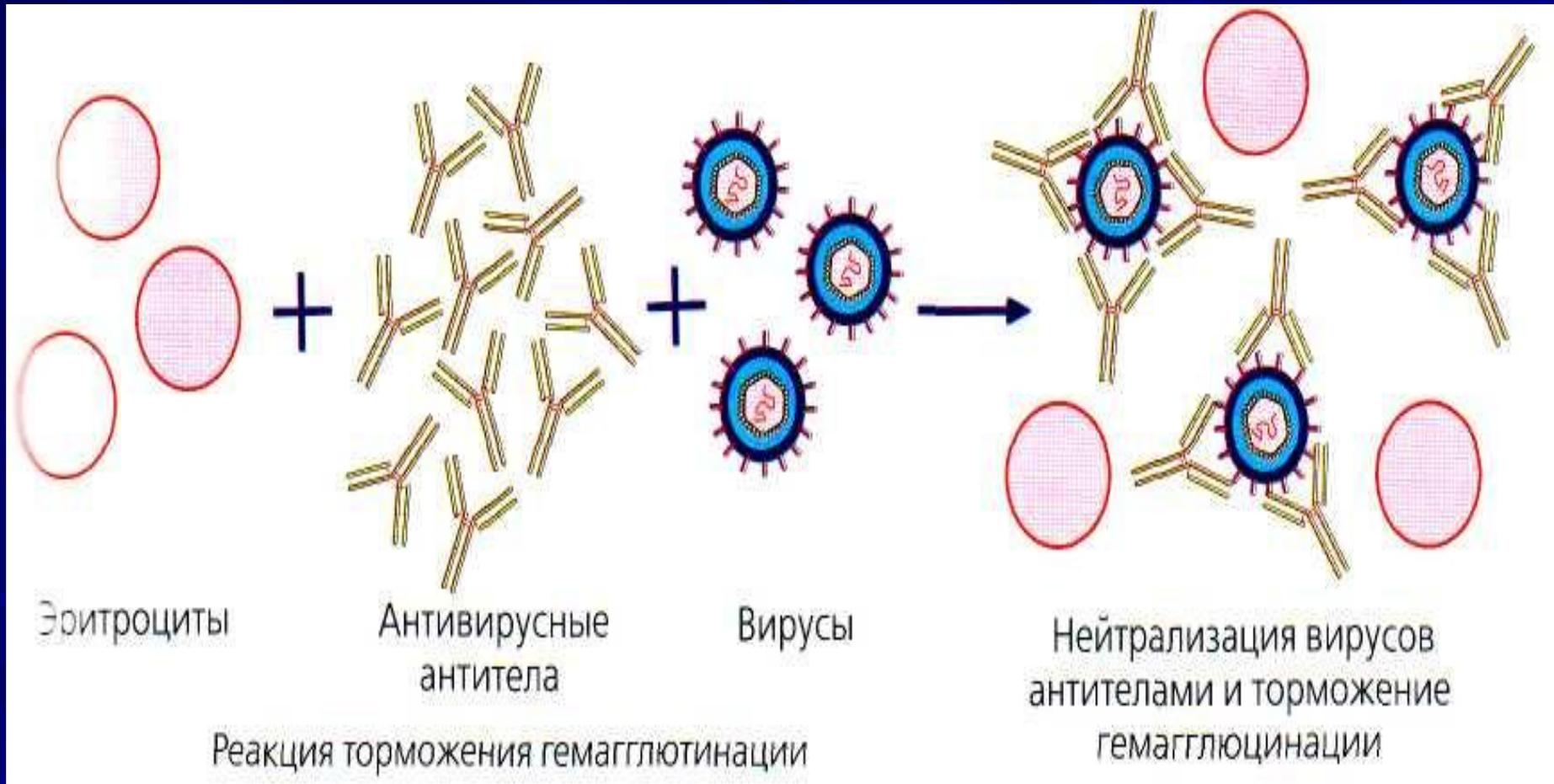
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- Гемагглютинины вирусов склеивают эритроциты.
- Это свойство используют в реакции гемагглютинации для индикации и титрования вирусов, что необходимо для последующей постановки РТГА.
- РТГА основана на блокаде антигенов вирусов (гликопротеиновых «шипов» - гемагглютининов) антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты.
- РТГА применяют для диагностики инфекций, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

Реакция гемагглютинации



Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)



Лечение

- В первые 48 часов:
- Альфа-интерферон интраназально.
- Ремантадин препятствует репродукции вирусов, блокируя М2-белок (только для вируса гриппа А).
- Арбидол – на вирусы гриппа А и В – иммуномодулятор и индуктор эндогенного интерферона.
- В первые 36 часов:
- Ингибиторы нейраминидазы – озельтамивир.
- В тяжёлых случаях:
- Противогриппозный донорский иммуноглобулин в/в
- Нормальный человеческий иммуноглобулин в/в
- АБ (при присоединении бактериальных инфекций)

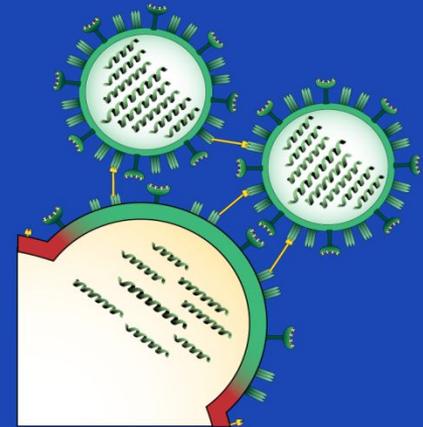
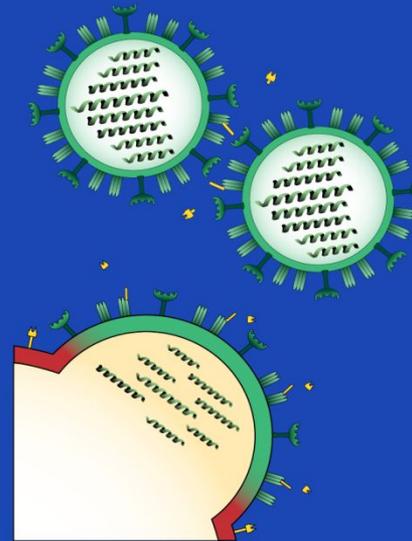
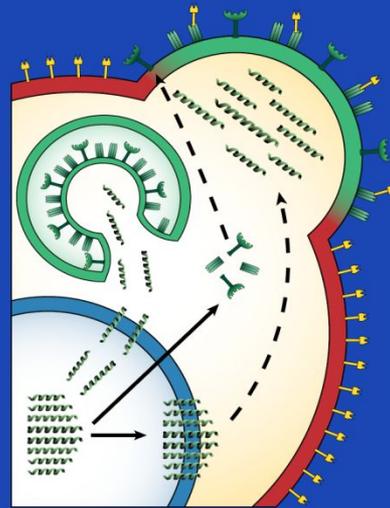
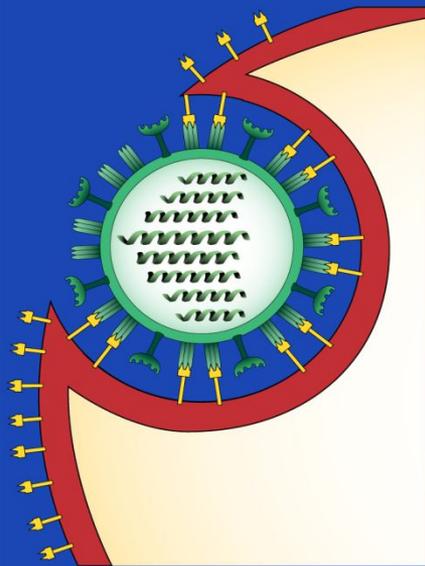
Ингибиторы нейраминидазы – новое поколение противовирусных препаратов. Лечение озельтамивиром.

Вирус проникает в клетку

Репликация РНК

Нейраминидаза необходима для выхода новых вирусов из клетки

Ингибиторы НА снижают выход потомства и инфицирование новых клеток



Профилактика

- Неспецифическая:

- п/э мероприятия

- **Альфа-интерферон интраназально**

- **Оксонин**

25 дней во время эпидемии

- **Арбидол**

- **Ремантадин**

2-3 недели

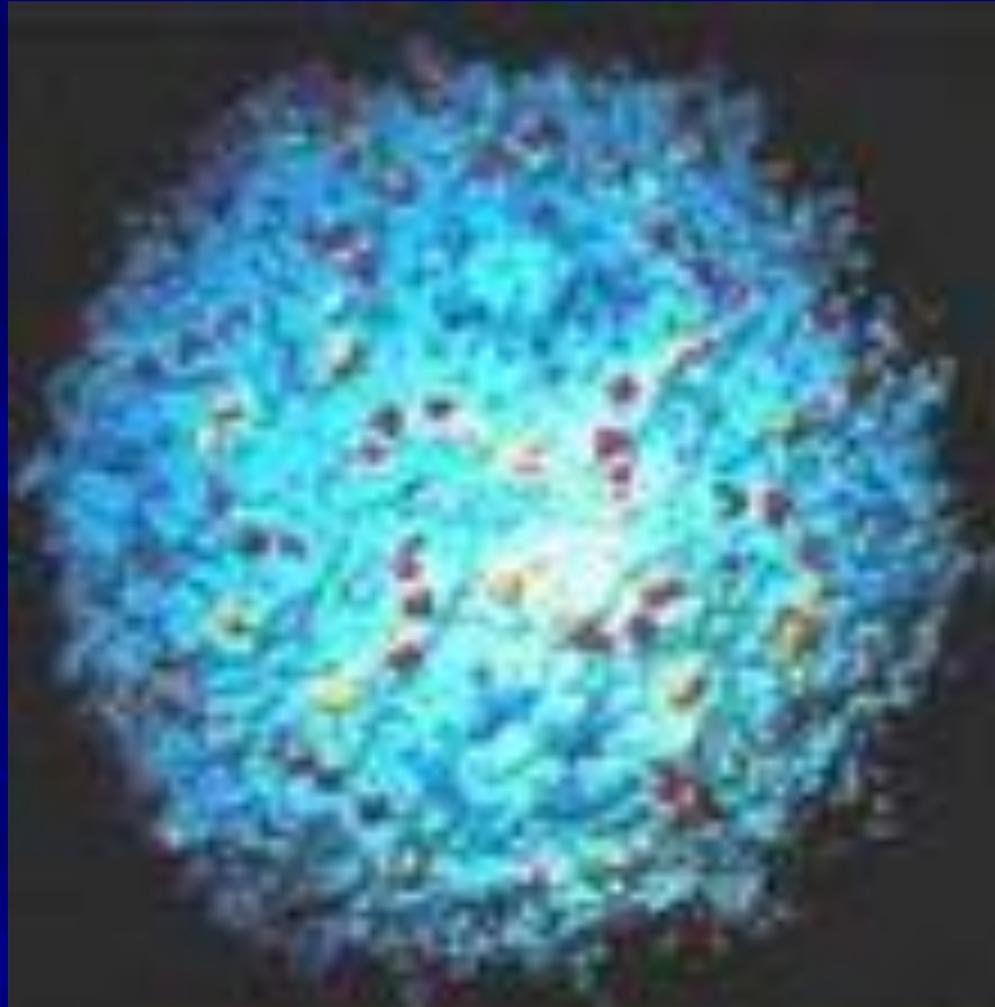
Профилактика

- Специфическая:
- Вакцинация октябрь - ноябрь
- Живые алантоисные интраназальные и подкожные, парентеральные
- Инактивированные,
- Цельновирионные
- Сплит-вакцины самые очищенные
- Субвирионные или химические (содержат Ag N и AG H)

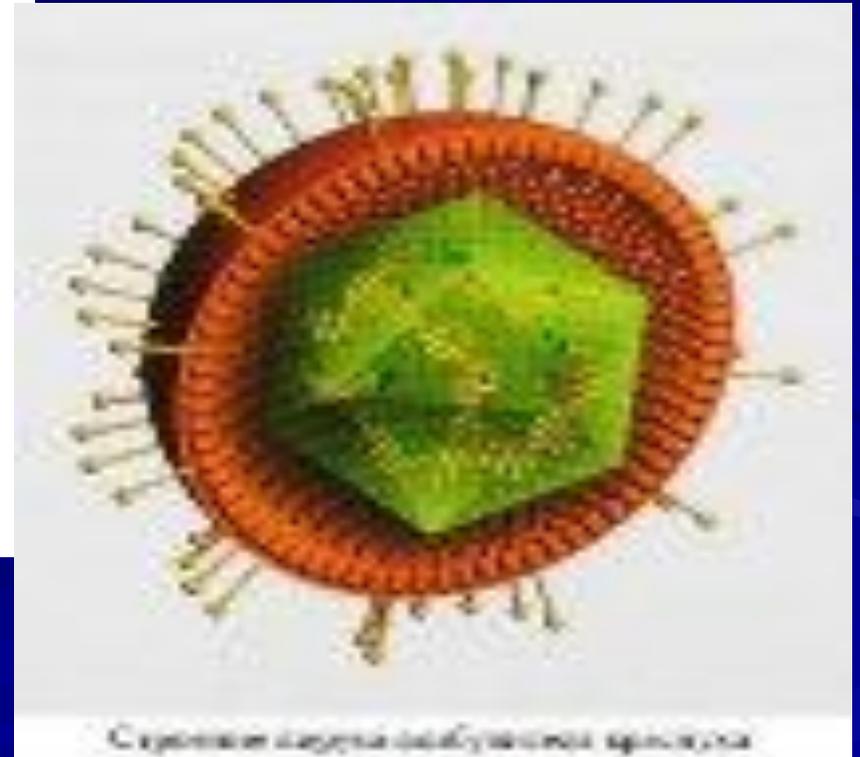
(Гриппол, Инфлювакс, Ваксигрипп...)

Требуется ежегодная вакцинация

Парамиксовирусы



Вирус кори



Суроний вирус дабуушска вирусуса