

Ставропольский государственный медицинский
университет

Кафедра микробиологии

Занятие 8

Тема занятия:

Микробиологическая
диагностика гриппа и
заболеваний полости рта,
вызываемых вирусом
герпеса.



План занятия

А. Обсуждаемые вопросы:

1. Обсуждение теоретических и практических вопросов по теме занятия по схеме:

Б. Практическая работа:

Методы лабораторной диагностики гриппа и герпеса:

1. Вирусоскопический: риноцитоскопия, РИФ;
2. Вирусологический:
 - а) Произвести забор материала от больного респираторными вирусными инфекциями (носоглоточный смыв, соскобы с герпетических высыпаний, соскобы с герпетических высыпаний, содержимое пузырьков). Метод подготовки исследуемого материала к посеву на куриный эмбрион.
 - б) Методика выращивания чистой культуры вируса с использованием куриного эмбриона, культуры клеток. Постановка РГА для доказательства накопления вирусов в клетках и идентификация вирусов с РТГА, РСК и др.



3. Постановить РТГА, провести учет этой реакции.
4. Профилактика и лечение респираторных вирусных инфекций с помощью биопрепаратов. Диагностические препараты.

В. Вопросы для самоподготовки:

- a) Дайте общую характеристику ортомиксовирусов, герпесвирусов
- b) Какую структуру имеет вирион гриппа, герпеса?
- c) Какие микробиологические методы применяются для диагностики вирусных респираторных и герпетических инфекций?
- d) В чем особенность серологических методов диагностики ОРВИ?
- e) Какими методами выделяется культура вируса гриппа и вируса герпеса?
- f) Каким методом обнаруживается наличие вируса гриппа, выращенного на курином эмбрионе?
- g) На чем основана РТГА? Каковы особенности ее постановки и учета результатов при обнаружении противогриппозных антител?



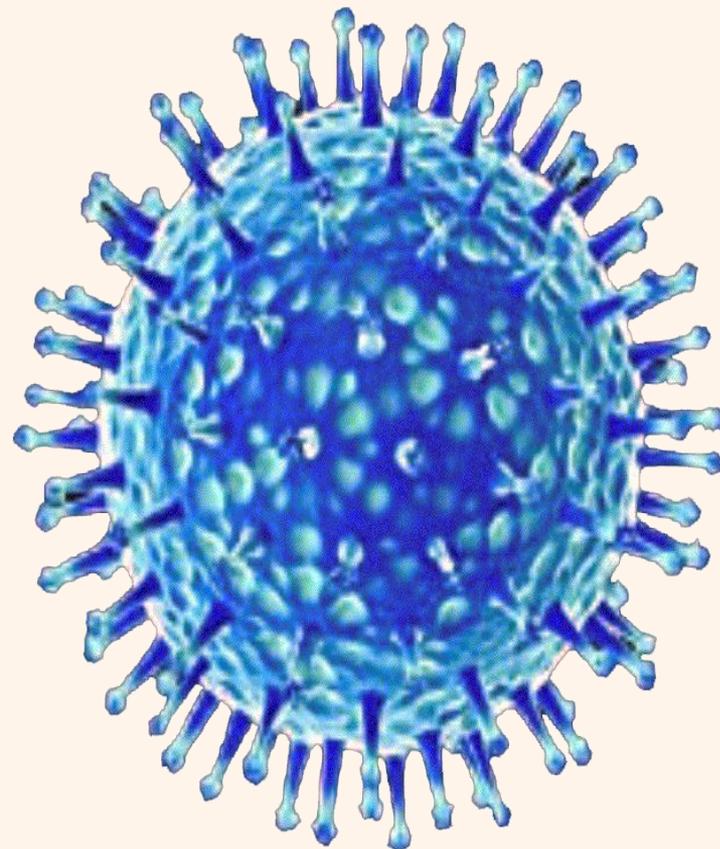
I. Историческая справка:

1. Вирус гриппа от человека был впервые выделен в 1933 г. английскими вирусологами У. Смитом, К. Эндрюсом и П. Лейдлоу путем заражения хорьков носоглоточными смывами больного гриппом. Позже этот вирус был отнесен к типу А. В 1940 г. Т. Френсис и Т. Меджил открыли вирус гриппа типа В. В 1947 г. Р. Тейлор выделил вирусы гриппа типа С.

2. **Семейство:** Orthomyxoviridae

Род: Influenzavirus

Вид: Грипп А, Грипп В



Историческая справка:

В XX веке наиболее известны три **пандемии** гриппа А:

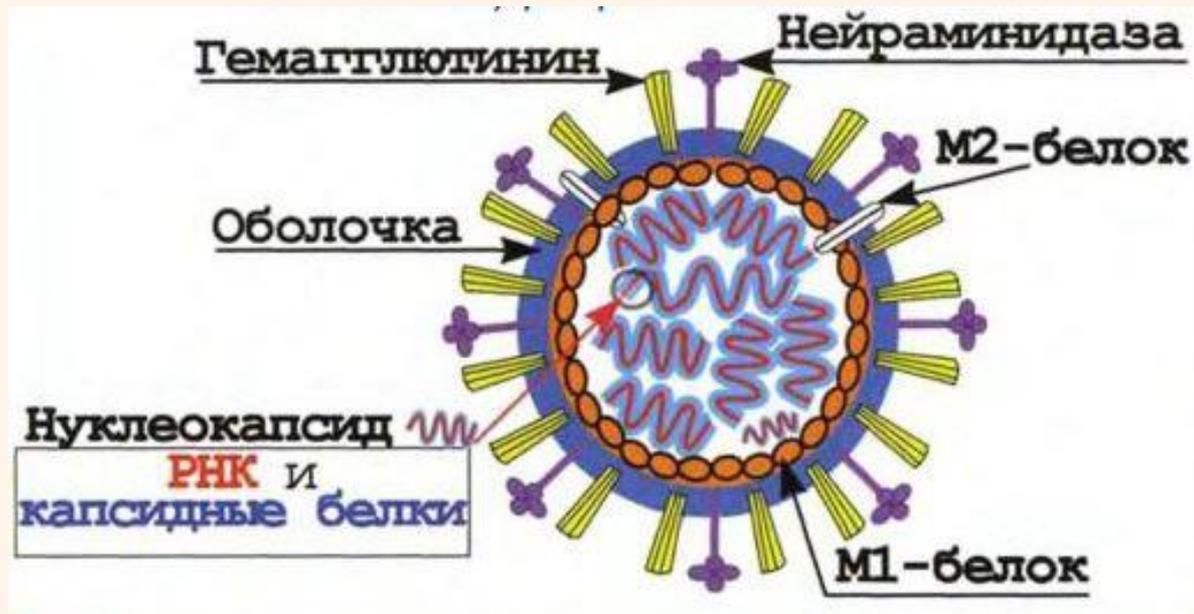
- в 1918 г. - так называемая испанка, возбудителем был вирус гриппа А (H1N1), погибли более 20 млн человек;

- в 1957 г. - азиатский грипп, возбудителем стал вирус гриппа А (H2N2), болели 1,5-2 млрд человек;

- в 1968 г. - гонконгский грипп, пандемическим штаммом стал вирус гриппа А (H3N2), болели около 1 млрд человек.

Год	Серотип	Распространение
■ 1918—1919 (Испанский грипп)	H1N1	Тяжёлая пандемия
■ 1933—1935	H1N1	Средняя эпидемия
■ 1946—1947	H1N1	Средняя эпидемия
■ 1957—1958	H2N2	Тяжёлая пандемия
■ 1968—1969	H3N2	Умеренная пандемия
■ 1977—1978	H1N1	Средняя пандемия
■ 1995—1996	H1N1, H3N2	Тяжёлая пандемия

3. Вирион имеет сферическую форму, могут встречаться нитевидные формы значительной длины. Диаметр вирусной частицы 80-120 нм. Вирион представляет собой нуклеокапсид (имеющий спиральный тип симметрии), покрытый липопротеиновой оболочкой. Вирион имеет сферическую форму, могут встречаться нитевидные формы значительной длины. Диаметр вирусной частицы 80-120 нм. Вирион представляет собой нуклеокапсид (имеющий спиральный тип симметрии), покрытый липопротеиновой оболочкой.



Нуклеокапсид у вирусов гриппа окружен слоем белков М1, которые составляют внутренний слой липопротеиновой оболочки. Липопротеиновая оболочка (суперкапсид) имеет клеточное происхождение. Суперкапсид включает в себя вирусные трансмембранные белки (такие, как М2, NB, VM2, SM2) и несет на своей поверхности шипики, образованные двумя сложными белками-гликопротеинами - гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА). Шипики - это выросты длиной около 10 нм.

Антигенная структура. Вирусы гриппа имеют внутренние и поверхностные антигены. Внутренние типоспецифические антигены представлены нуклеопротеином (NP-белком) и М-белками. Поверхностные антигены - это гемагглютинин и нейраминидаза.



Резистентность. В окружающей среде устойчивость вирусов средняя. Вирусы гриппа чувствительны к высоким температурам (выше 60 С), УФ-облучению, жирорастворителям, но могут некоторое время сохраняться при низких температурах - в течение недели не погибают при температуре около 4 С. Вирусы чувствительны к табельным дезинфектантам.

- II. **Эпидемиология.** Грипп - антропонозная инфекция. Основной механизм передачи - аэрогенный, путь передачи воздушно-капельный (при кашле, чиханье и т.п.). Также возможна контактная передача (например, при прикосновении к слизистой оболочке носа пальцами, загрязненными вирусом). Грипп - высококонтагиозное заболевание и часто протекает в виде эпидемий и даже пандемий, восприимчивость людей очень высокая.



III. Краткая характеристика заболевания

Патогенез. Обычно входные ворота инфекции - это верхние дыхательные пути, но вирус может проникнуть сразу в альвеолы, что вызывает развитие пневмонии. Первичная репродукция вирусов происходит в клетках эпителия респираторного тракта.

Инфицированные клетки начинают вырабатывать интерферон, оказывающий неспецифическое противовирусное действие.

Развиваются воспаление, отек, набухание базальной мембраны, происходит десквамация клеток поверхностного эпителия. Через поврежденные эпителиальные барьеры вирус гриппа А проникает в кровоток и вызывает виремию. Всасывание продуктов распада клеток также оказывает токсическое и сенсибилизирующее действие на организм. Вирус активирует систему протеолиза и вызывает повреждение эндотелия капилляров. Это повышает проницаемость сосудов и серозных оболочек, что вызывает геморрагии и нарушение гемодинамики с расстройствами микроциркуляции. При гриппе также развивается транзиторный вторичный иммунодефицит, что предрасполагает к развитию вторичной бактериальной инфекции.



Клиническая картина.

Инкубационный период 1-2 дня. Клинические проявления в течение 3-7 дней, реконвалесценция - 7-10 дней.

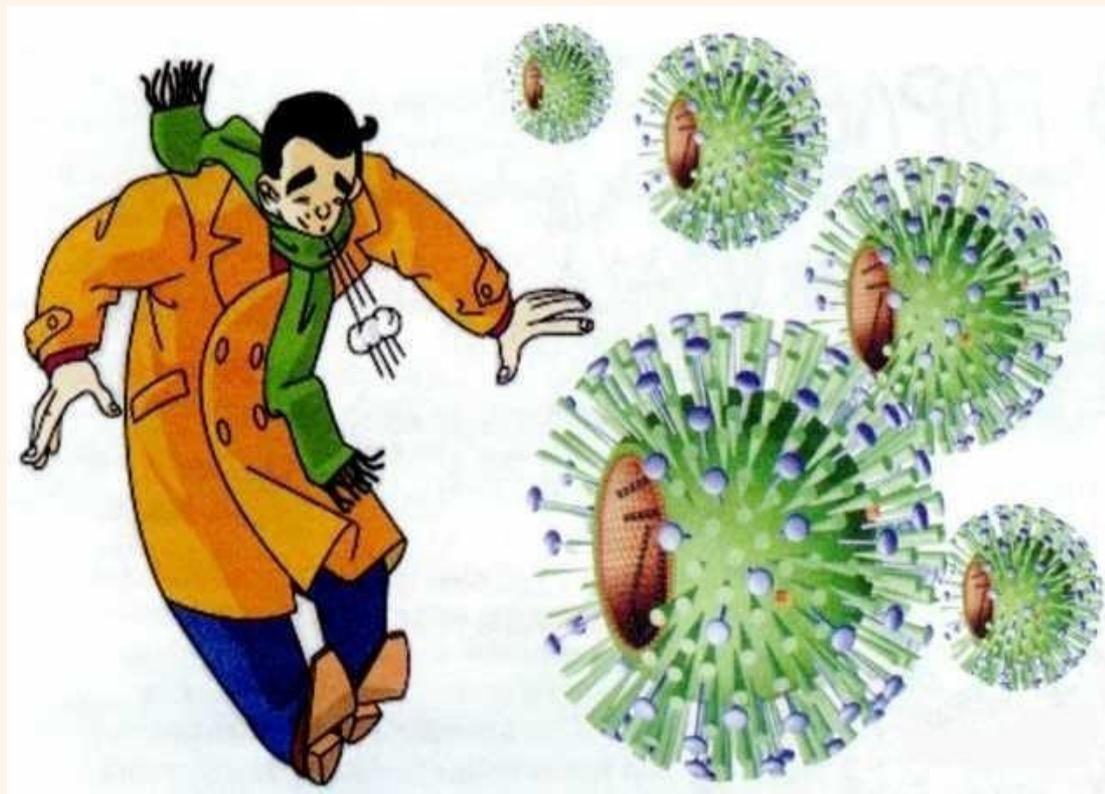
При гриппе А начало болезни острое, у больного обычно наблюдается интоксикация (высокая лихорадка с ознобом, суставные и мышечные боли, сильная головная боль). Развивается катар верхних дыхательных путей (саднящий сухой кашель, боли за грудиной, нарушение фонации, ринит и ринорея). Характерен геморрагический синдром - кровоизлияния в кожу, серозные и слизистые оболочки и внутренние органы, повышенная кровоточивость. Опасное осложнение - геморрагическая пневмония и отек легких. Грипп А также может осложняться нарушениями функций нервной, сердечнососудистой систем, печени, почек и др.



Иммунитет.

Постинфекционный иммунитет достаточно напряженный и продолжительный, но имеет выраженный типоспецифический характер.

Главная роль в формировании приобретенного иммунитета принадлежит вируснейтрализующим антителам, блокирующим гемагглютинин и нейраминидазу, а также секреторным иммуноглобулинам IgAs



СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

IV. Микробиологическая диагностика.

Если целью диагностики является обнаружение возбудителя, то материалом для исследования служит носоглоточное отделяемое, мазки-отпечатки со слизистой оболочки носа. Если цель диагностики заключается в поиске вирусспецифических антител, то материалом для исследования являются парные сыворотки больного.

Экспресс-диагностика. Обнаруживают вирусные антигены в исследуемом материале с помощью РИФ, ИФА. Можно обнаружить в носовых смывах вирусную РНК с помощью ПЦР.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ



МАЗОК
ИЗ НОСОГЛОТКИ

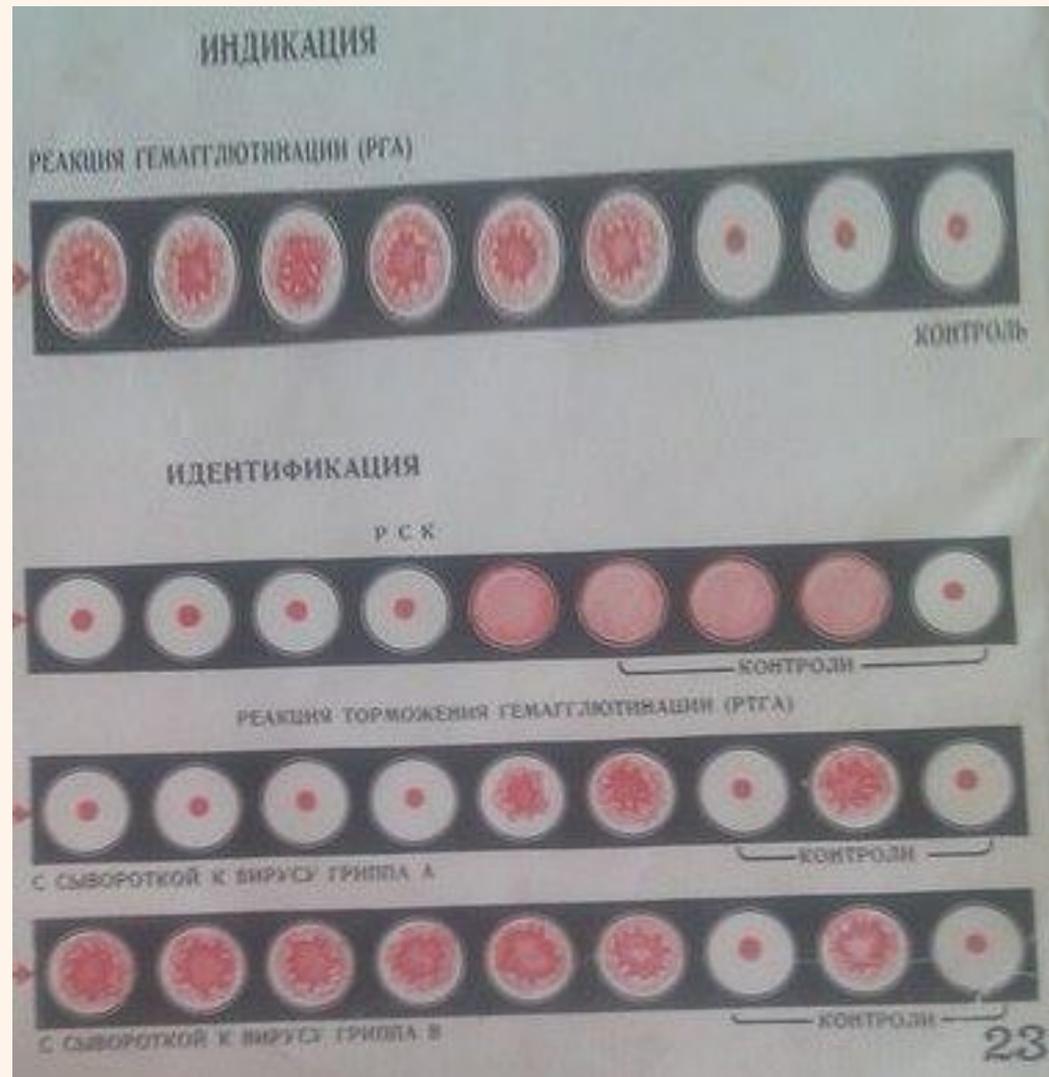
Вирусологический метод.

Вирусы гриппа можно *выделять* в курином эмбрионе, культуре клеток (например, в культуре клеток почек обезьян, почек собак-*MDCK* и т.п.), а также в организме лабораторных животных.

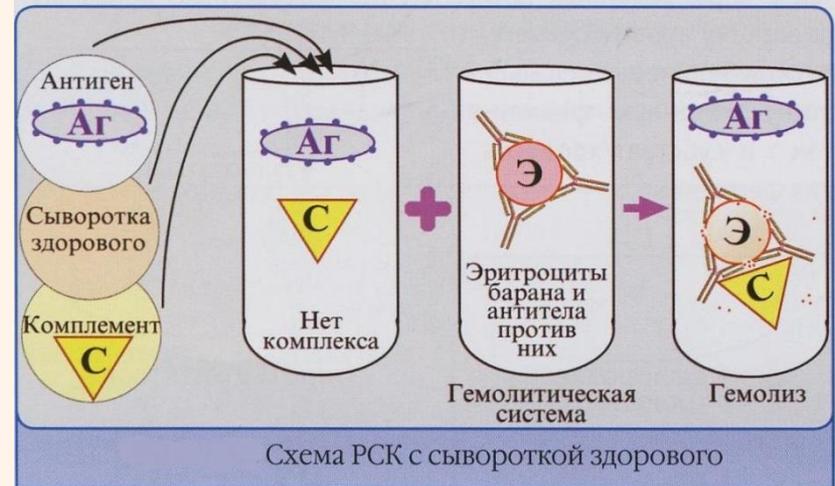
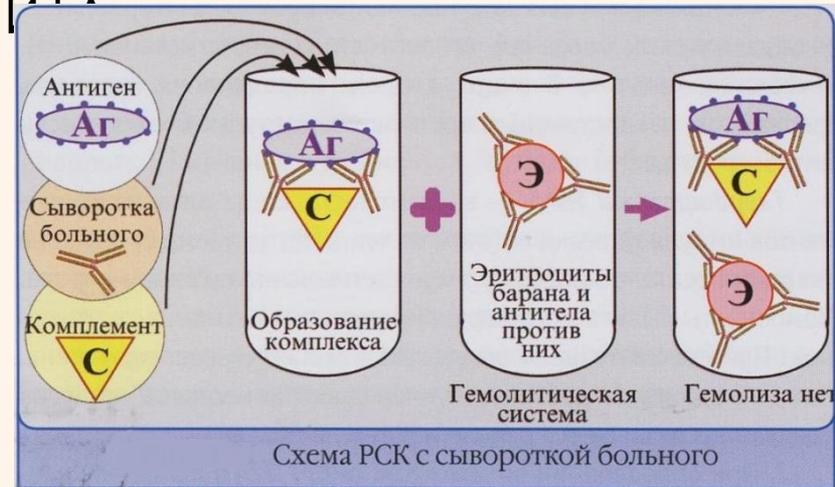
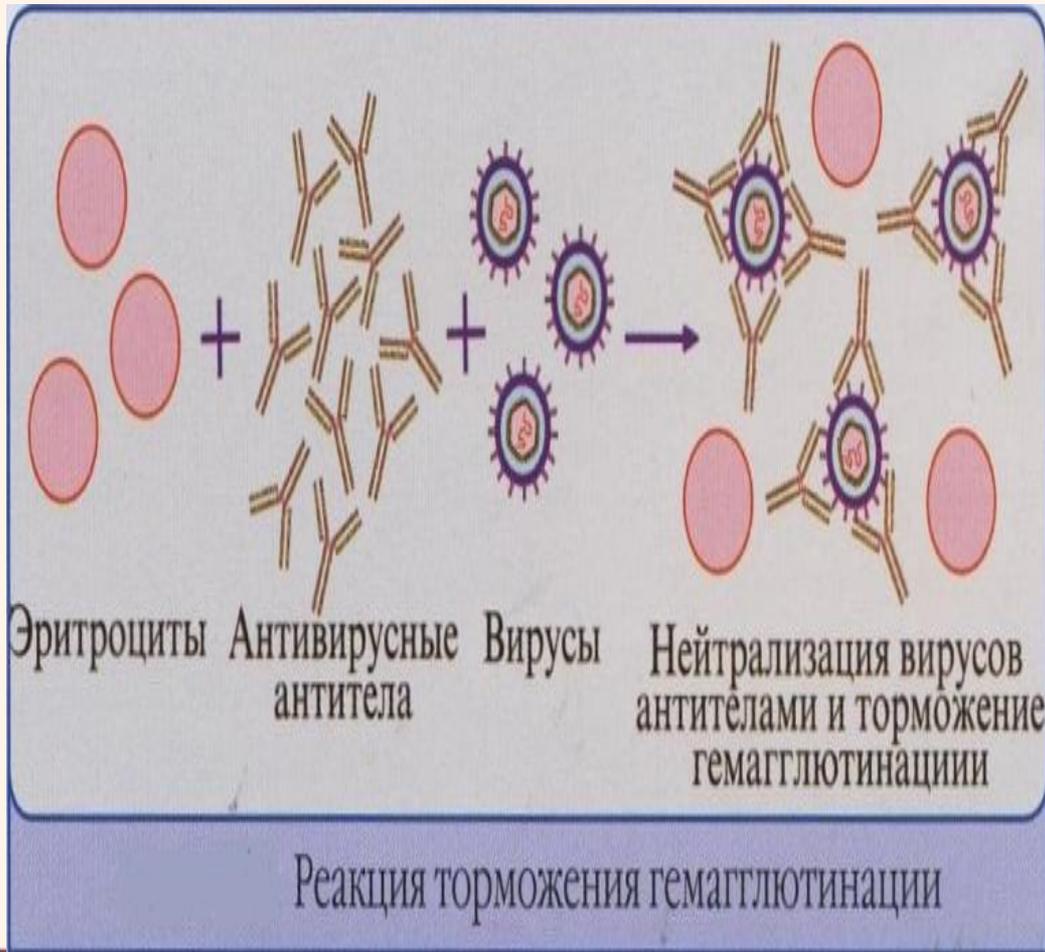
Индикацию вирусов проводят в зависимости от лабораторной модели (цпд, образованию бляшек, цветовой пробе, РГА и гемадсорбции).

Идентифицируют вирусы по антигенной структуре.

Применяют РСК, РТГА, РПГА, ИФА, реакцию биологической нейтрализации вирусов и др.



Серологический метод. Диагноз подтверждают при четырехкратном увеличении титра антител в парных сыворотках от больного, полученных с интервалом 10-14 дней. Применяют РТГА, РСК, ИФА.



I. Характеристика возбудителя

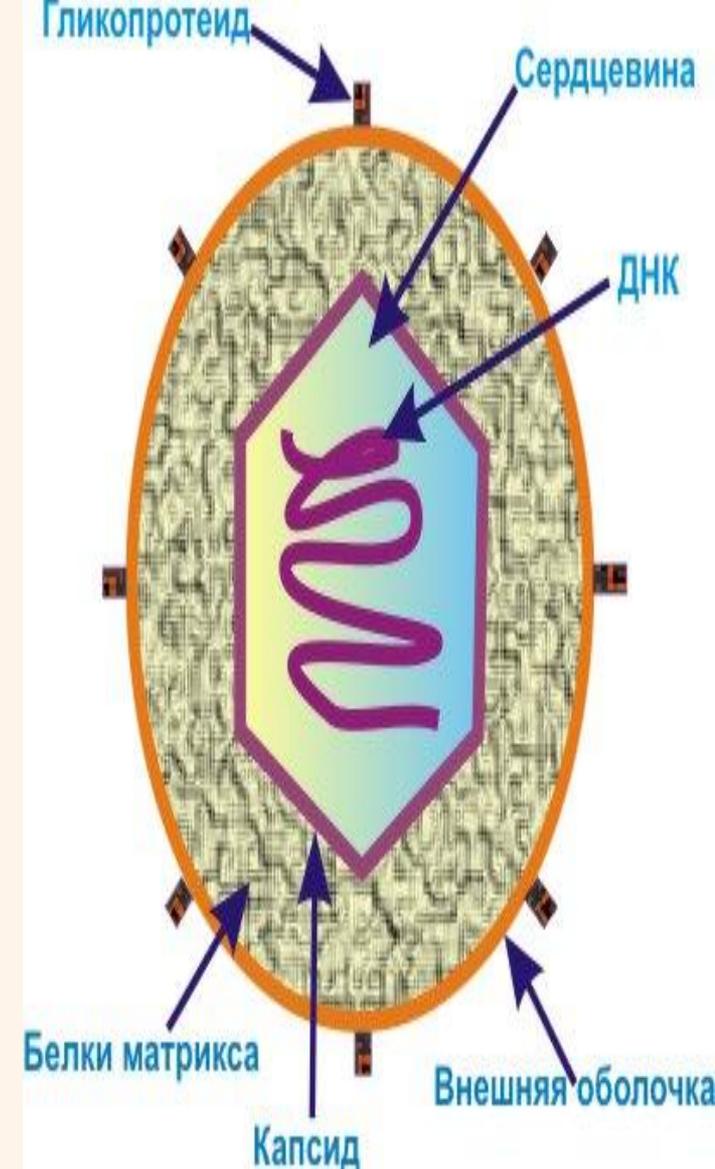
1. Историческая справка

2. **Семейство:** Herpesviridae

Род: Alphaherpesvirus.

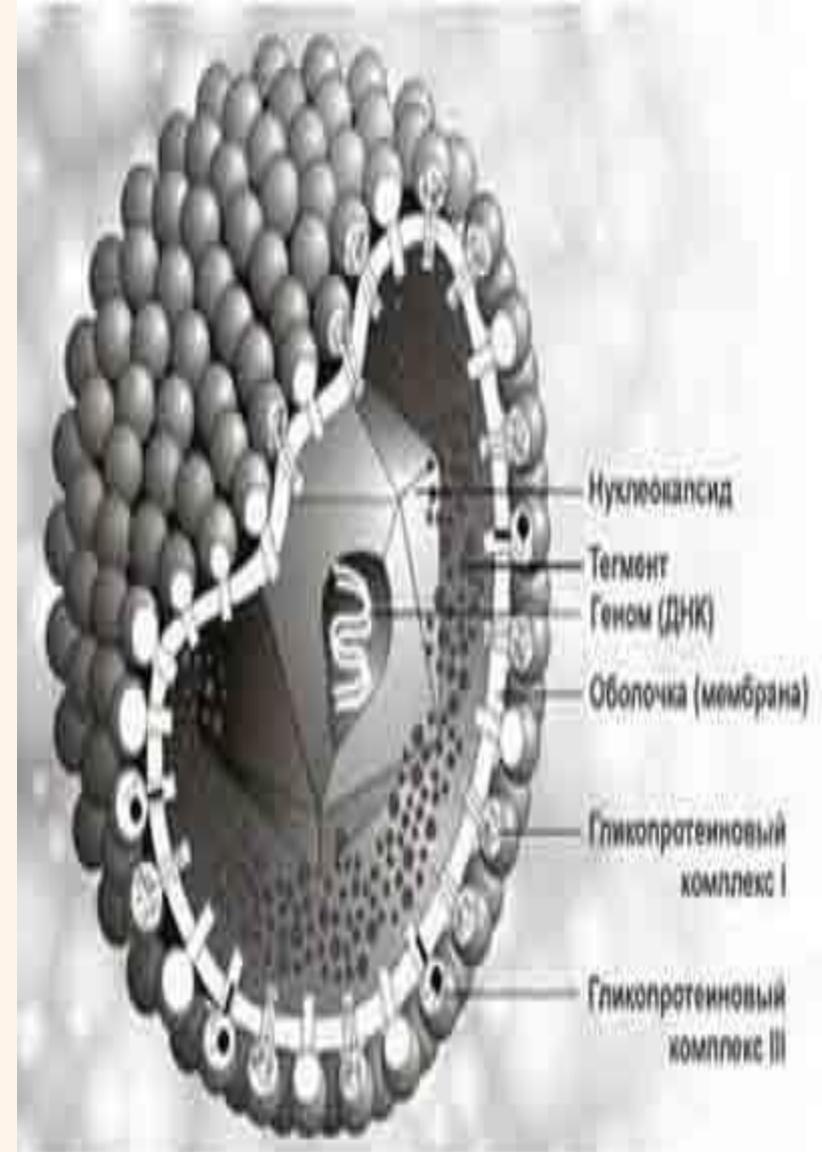
Вид: Virus herpes simplex

3. Вирус имеет овальную форму, диаметр 150-200 нм. Он покрыт оболочкой с гликопротеиновыми шипами, сформированными из внутреннего слоя ядерной мембраны клетки. Вирус содержит ДНК, окруженную икосаэдрическим капсидом, состоящим из 162 капсомеров. Между капсидом и оболочкой находится тегумент, содержащий вирусные белки для инициации репликации. ВПГ сходна с другими герпесвирусами. На поверхности вириона расположены гликопротеины gA, gB, gC, gD, gH, gF.



Резистентность. Вирус погибает через несколько часов на поверхности предметов обихода, чувствителен к солнечным и УФ-лучам, жирорастворителям, детергентам. Длительно сохраняется при низких температурах.

Репродукция и культивирование. ВПГ может инфицировать большинство типов клеток человека, вызывая латентные инфекции фибробластов, эпителиальных клеток и латентные инфекции нейронов. При культивировании на курином эмбрионе на хорионаллантоисной оболочке образуются мелкие плотные бляшки. В культуре клеток ВПГ вызывает цитопатический эффект в виде появления гигантских многоядерных клеток с внутриядерными включениями. В естественных условиях животные не болеют. При экспериментальном заражении кроликов в роговицу глаза ВПГ вызывает кератит, а при введении в мозг - энцефалит.



Трехмерный вид герпеса.



- II. **Эпидемиология.** Источник инфекции - больной или носитель. Оба типа вирусов могут вызывать оральный и генитальный герпес. Вирусы передаются контактным путем (с везикулярной жидкостью, при поцелуях со слюной, при половых контактах с секретами слизистых оболочек, спермой), через предметы обихода, реже воздушно-капельным путем, через плаценту при

Герпесвирусы человека	Обозначение	Основные заболевания, ассоциированные с данным типом герпесвирусов
Вирус простого герпеса 1-го типа	ВПГ-1	Лабильный герпес Герпес кожи и слизистых Офтальмогерпес Генитальный герпес Герпетические энцефалиты Пневмониты
Вирус простого герпеса 2-го типа	ВПГ-2	Генитальный герпес Неонатальный герпес
Вирус Варицелла-Зостер (вирус опоясывающего герпеса)	ВВЗ (ВОГ)	Ветряная оспа Опоясывающий герпес

III. Краткая характеристика заболевания

Патогенез. Основные входные ворота для вируса - кожа и слизистые оболочки. Чаще вирус вызывает бессимптомную или латентную инфекцию. Различают первичный и рецидивирующий простой герпес.

При первичной инфекции инкубационный период составляет 2-12 сут. Обычно появляются везикулы с дегенерацией эпителиальных клеток. Основу везикулы составляют многоядерные клетки. Верхушка везикулы через некоторое время вскрывается, образуется язвочка, которая вскоре покрывается струпом, корочкой. Далее наступает заживление.

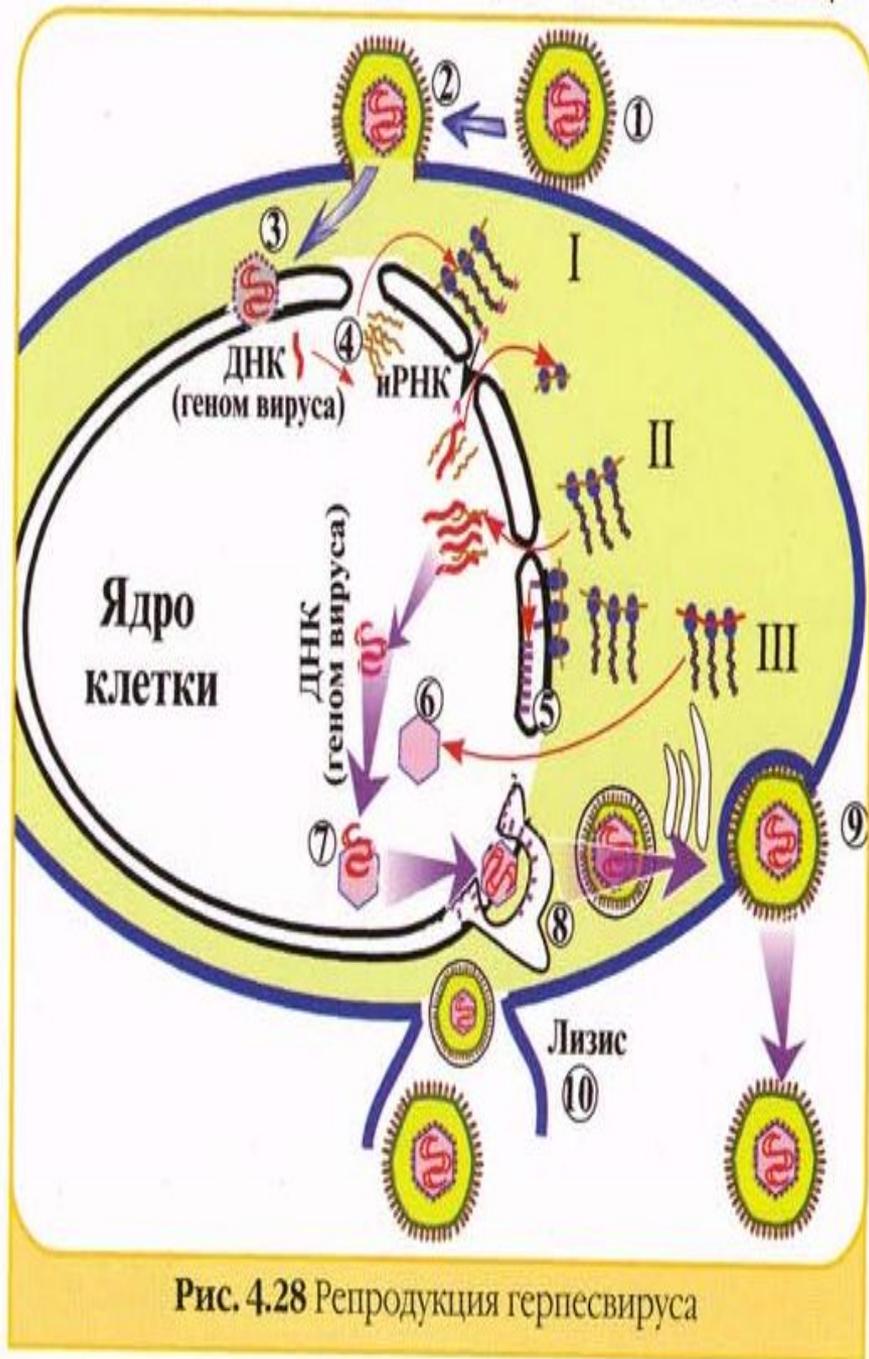


Рис. 4.28 Репродукция герпесвируса

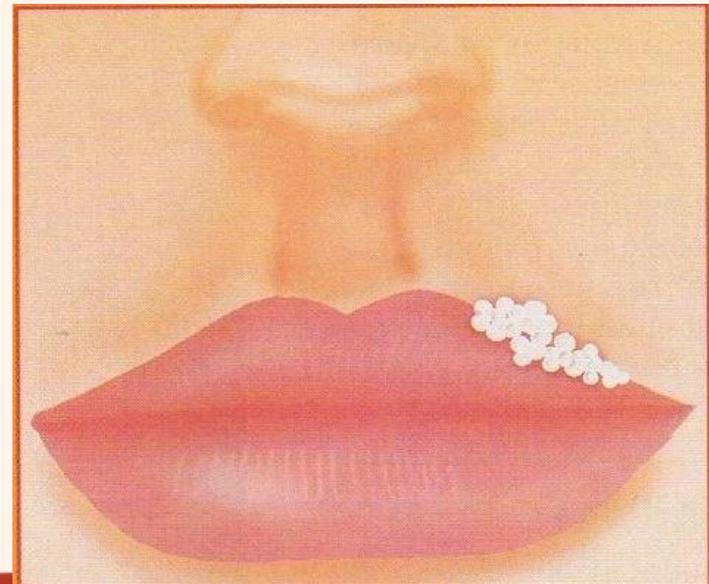
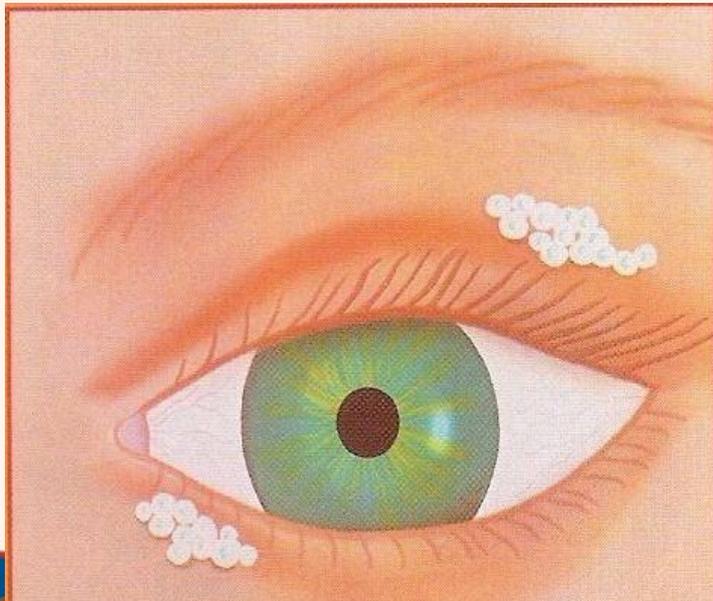
При инфицировании вирусы, минуя входные ворота эпителия, проходят через чувствительные нервные окончания с дальнейшим передвижением нуклеокапсидов вдоль аксона к телу нейрона в чувствительных ганглиях. Репликация вируса в нейроне приводит к его гибели. Некоторые вирусы герпеса вызывают латентную инфекцию, при которой нейроны содержат в себе вирусный геном, но не погибают.

Латентная инфекция чувствительных нейронов - характерная особенность нейротропных герпесвирусов. Большинство людей (70-90%) являются пожизненными носителями вируса, который сохраняется в ганглиях, вызывая в нейронах латентную персистирующую инфекцию.

Реактивация герпесвирусов и обострение (рецидив) вызываются различными факторами, снижающими иммунитет (переохлаждение, лихорадка, травма, стресс, сопутствующие заболевания, УФоблучение, лечение иммунодепрессантами и др.). В результате геном герпесвирусов проходит обратно по аксону к нервному окончанию, что способствует репликации вируса в эпителиальных клетках.



Клиническая картина. Болезнь начинается с появления на пораженных участках зуда, отека и пузырьков, заполненных жидкостью. При образовании везикулы ощущается жгучая боль. После подсыхания пузырьков и отторжения корочек рубцы не образуются. Вирус простого герпеса поражает кожу (везикулы, экзема), слизистые оболочки рта, глотки (стоматит) и кишечника, печень (гепатиты), глаза (кератит и др.) и ЦНС (энцефалит, менингоэнцефалит). Рецидивирующий герпес обусловлен реактивацией вируса, сохранившегося в ганглиях. Он характеризуется повторными высыпаниями и поражением органов и тканей.



СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Генитальный герпес - результат аутоинокуляции из других пораженных участков тела, но наиболее часто встречается половой путь заражения. Образуются быстро изъязвляющиеся везикулы. У мужчин чаще поражаются головка и тело полового члена, а у женщин - половые губы и вагина, иногда шейка матки. Вирус простого герпеса проникает во время прохождения новорожденного через родовые пути матери, вызывая *неонатальный герпес (герпес новорожденных)*, который обнаруживается на 6-й день после родов, т.е. с момента заражения.

Иммунитет в основном клеточный. Организм человека реагирует на гликопротеины вируса, продуцируя цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$), а также Т-хелперы ($CD4^+$), активирующие В-лимфоциты с последующей продукцией специфических вируснейтрализующих антител. Важную роль в ранней защите играют НК-клетки. Антитела матери, передающиеся через плаценту, смягчают последствия неонатального герпеса.

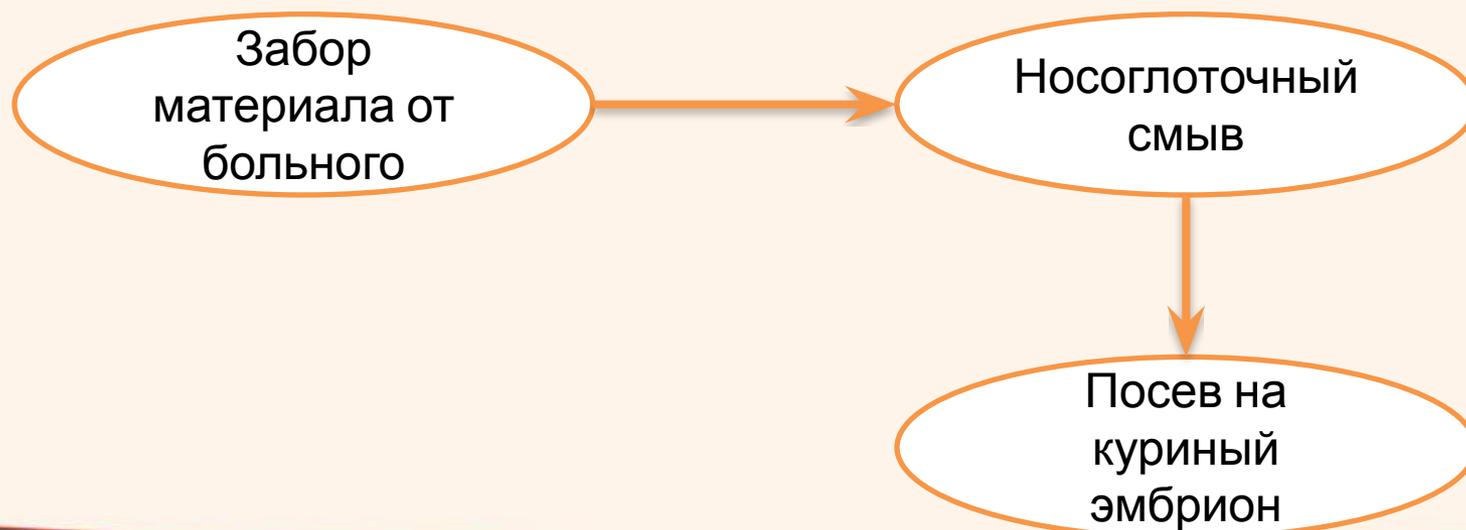
СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Микробиологические методы диагностики. Исследуют содержимое герпетических везикул, слюну, соскобы с роговой оболочки глаз, кровь, спинно-мозговую жидкость и мозг при летальном исходе.

Вирусологический метод. Вирус выделяют, заражая клетки *HeLa*, *Herp-2*, человеческие эмбриональные фибробласты. Цитопатический эффект становится видимым через сутки после заражения: клетки округляются с последующим прогрессирующим поражением всей культуры клеток. Заражают также куриные эмбрионы или мышей-сосунков, у которых после внутримозгового заражения развивается энцефалит. Вирус идентифицируют в РИФ и ИФА с использованием моноклональных антител.



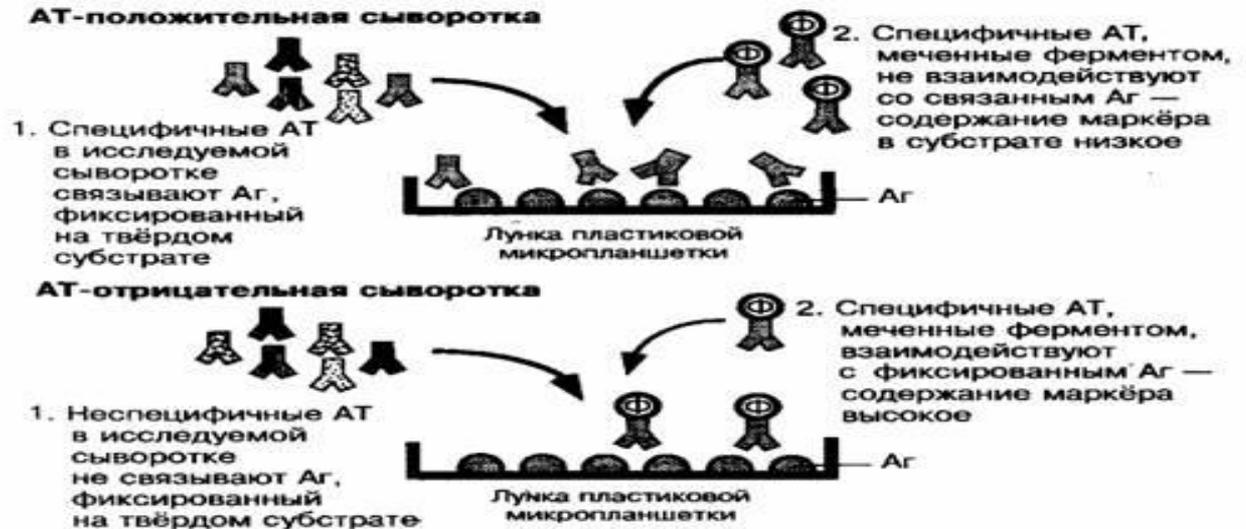
Серологическую диагностику проводят с помощью РСК, РИФ, ИФА и реакции нейтрализации по нарастанию титра антител больного. Возможно применение иммуноблоттинга.

Иммуноферментный анализ

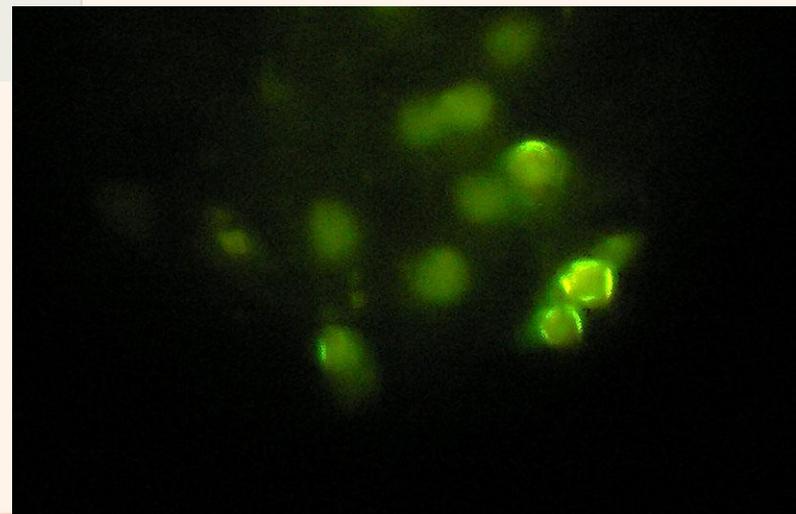
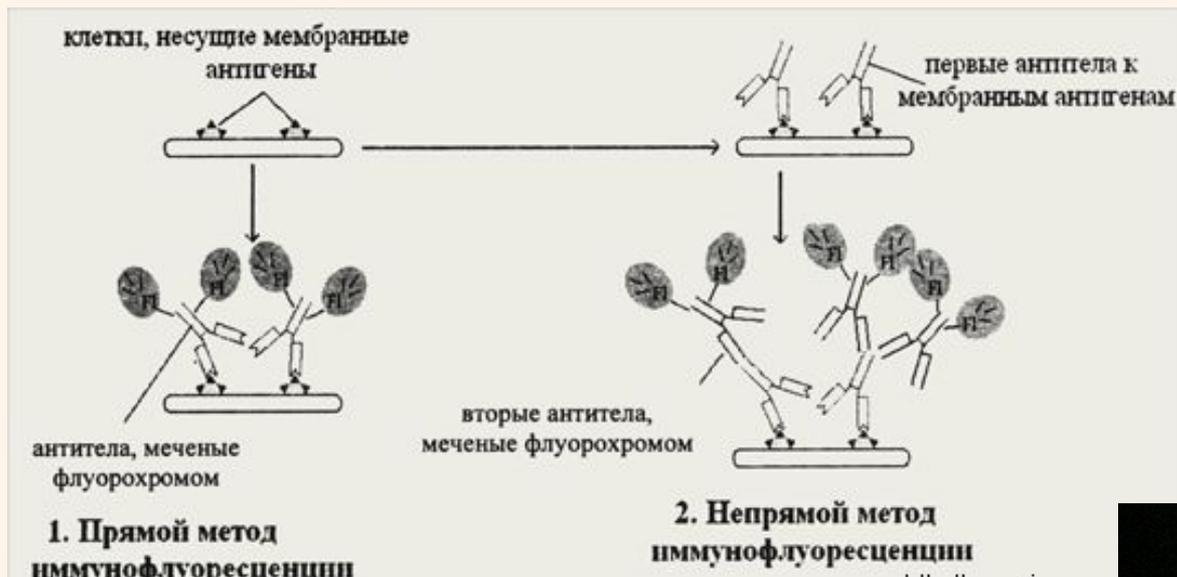
Прямой метод



Непрямой метод



Реакция иммунофлуоресценции



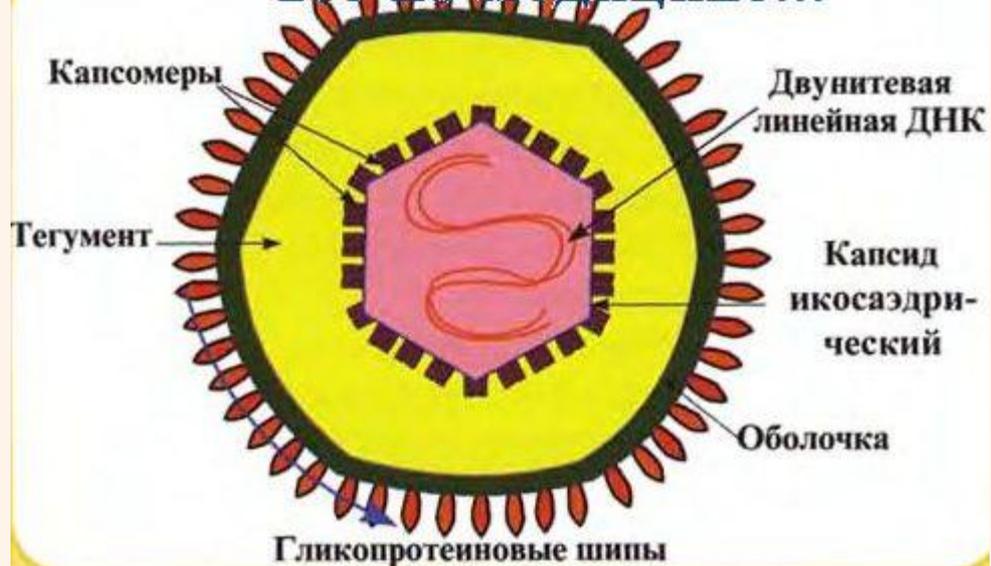
I. Характеристика возбудителя

1. Открыт бразильским врачом
2. Б.Э. Арагао в 1911 году.Т

2. **Семейство:** Herpesviridae

Род: Alphaherpesvirus

Вид: Virus herpes zoster



3. Вирус имеет овальную форму, диаметр 150-200 нм. Он покрыт оболочкой с гликопротеиновыми шипами, сформированными из внутреннего слоя ядерной мембраны клетки. Вирус содержит ДНК, окруженную икосаэдрическим капсидом, состоящим из 162 капсомеров. Между капсидом и оболочкой находится тегумент, содержащий вирусные белки для инициации репликации. ВПГ сходна с другими герпесвирусами.

Резистентность. Вирус малоустойчив в окружающей среде, чувствителен к жирорастворителям и дезинфицирующим средствам; инактивируется при 60 С в течение 30 мин.

СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

II. Эпидемиология. Заболевание относится к антропонозам. Ветряной оспой переболевает большинство населения. Источник инфекции - больной ветряной оспой или вирусоноситель. Чаще болеют дети в возрасте от 2 мес до 10 лет. Период заразительности длится с конца инкубационного периода и в течение 5 дней с момента появления сыпи; больной опоясывающим герпесом иногда бывает заразен. Вирус передается воздушно-капельным путем, через контакт с везикулами кожи, возможна трансплантационная передача. Латентная инфекция обусловлена длительной персистенцией вируса в клетках человека. Опоясывающим герпесом болеют в основном взрослые результате реактивации вируса, персистирующего в организме, т.е. вируса, сохранившегося после перенесенной в детстве ветряной оспы.

II. Краткая характеристика заболевания

Патогенез. Возбудитель проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, накапливается и током крови (вирусемия) заносится главным образом в эпителий кожи и слизистых оболочек. В шиповидном слое эпидермиса формируются везикулы. Сформированные везикулы кожи и слизистых оболочек содержат серозный экссудат и небольшое количество лимфоцитов. Образуются гигантские многоядерные клетки, ядра которых содержат включения. После первичной инфекции вирус сохраняется в заднем корешке или ганглии черепно-мозгового нерва.

Клиническая картина. Инкубационный период при ветряной оспе составляет 11-23 дня. Болезнь характеризуется лихорадкой, появлением папуловезикулярной сыпи на коже лица, шеи, туловища и конечностей, иногда в области половых органов и полости рта. Сыпь похожа на высыпания при натуральной оспе (отсюда произошло название болезни).



Образовавшиеся круглые пузырьки через 1-3 дня лопаются и подсыхают. Через 10-12 сутки корки отпадают. При этом, в отличие от натуральной оспы, рубцы не образуются. У детей в возрасте от 2 мес до 1 года и у взрослых ветряная оспа протекает тяжело, с развитием иммунодефицита; возможны пневмонии, гепатиты, энцефалиты, отиты, пиодермии и другие осложнения.

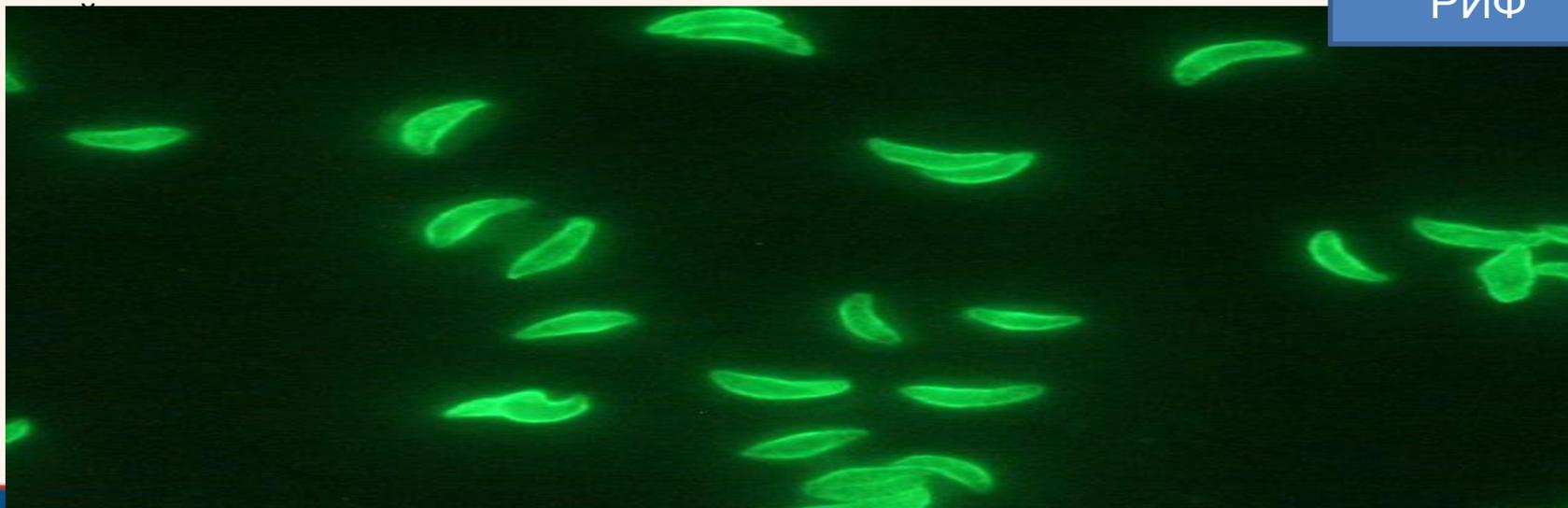
Вирус проникает через кожу и слизистые оболочки, поражая в дальнейшем спинальные и церебральные ганглии, что сопровождается болевым синдромом, характерным для опоясывающего герпеса. Вокруг туловища по ходу пораженных межреберных нервов появляется сыпь в виде обруча; возможны высыпания по ходу тройничного нерва, на ушной раковине, а также гангренозная (некротическая) форма поражения.



Иммунитет. У переболевших формируется пожизненный клеточно-гуморальный иммунитет. Однако это не мешает длительному сохранению вируса в организме и возникновению рецидивов опоясывающего герпеса.

IV. Микробиологические методы диагностики. Исследуют содержимое высыпаний, отделяемое носоглотки и кровь. Вирус можно выявить в мазкахотпечатках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, по образованию синцития и внутриядерных включений (тельца Липшютца). Вирус выделяют при культивировании на культуре клеток эмбриона человека. Идентификация вируса и определение антител в сыворотке крови больных проводят с помощью РИФ, ИФА и ре

РИФ



СТАВРОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ



МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Ag, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Ag

4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ

2. АТ, не связавшие Ag, удаляют многократным промыванием

