

Возможности ПЦР-анализа в диагностике пневмоний, гриппа и ОРЗ

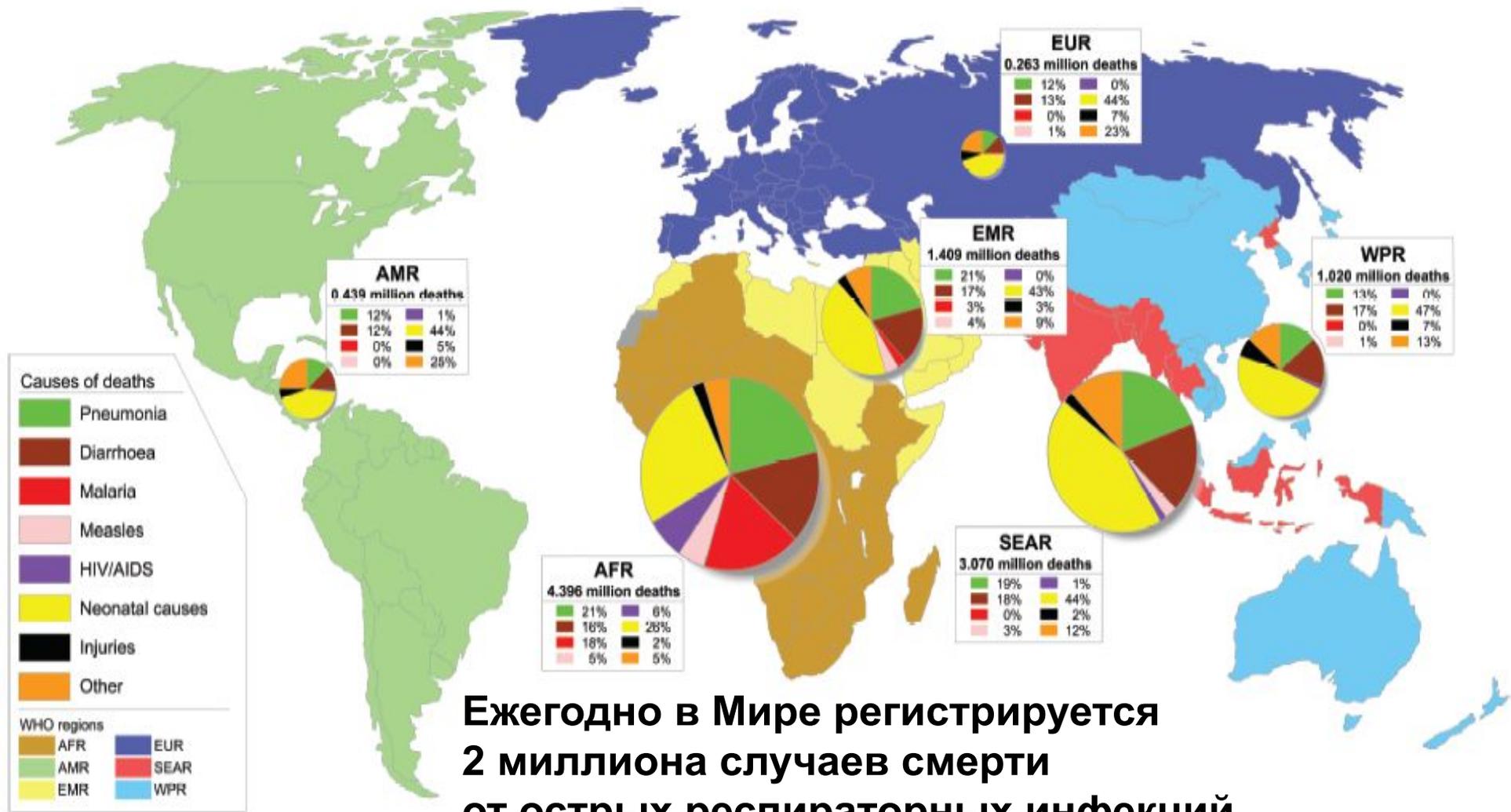


Пневмонии

- Заболеваемость пневмониями в развитых странах составляет 3,6 - 16 на 1000 человек
- Пневмонии занимают 4 – 5-е место в структуре причин смерти после сердечно-сосудистой патологии, онкологических заболеваний, цереброваскулярной патологии и хронических обструктивных заболеваний легких
- Среди инфекционных болезней – 1-е место
- Заболеваемость в возрастной группе старше 60 лет: 20 - 44 на 1000 населения в год. Летальность от пневмоний у данной категории больных - 10 – 33%
- Высокая летальность от пневмонии среди новорожденных и маленьких детей и достигает 25% у детей младше 5 лет
- Уровень смертности детей до 1 года в нашей стране в 2 – 4 раза выше (25,1 на 1000 населения), чем в других экономически развитых странах

Смертность детей до 5 лет от пневмонии

Fig. 2. Distribution of deaths from pneumonia and other causes in children aged less than 5 years, by WHO region



**Ежегодно в Мире регистрируется
2 миллиона случаев смерти
от острых респираторных инфекций**

Пневмонии у взрослых

Частота в %	Возбудители
15-60	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3-10	<i>Haemophilus influenzae</i>
1-30	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
5-20	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
1-3	<i>Chlamydomphila psittaci</i>
2-15	<i>Legionella spp.</i>
3-5	<i>Staphylococcus aureus</i>
1-2	<i>Moraxella catarrhalis</i>
3-10	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2-15	Вирусы

Причины неудач в установлении этиологии пневмоний

- Отсутствие микробного исследования
- Неправильный сбор материала
- Возбудитель неизвестен
- Предшествующее лечение антибиотиками (до взятия материала)
- Неопределенное клиническое значение выделенного возбудителя
- Использование неадекватного метода лечения

Классификации пневмоний

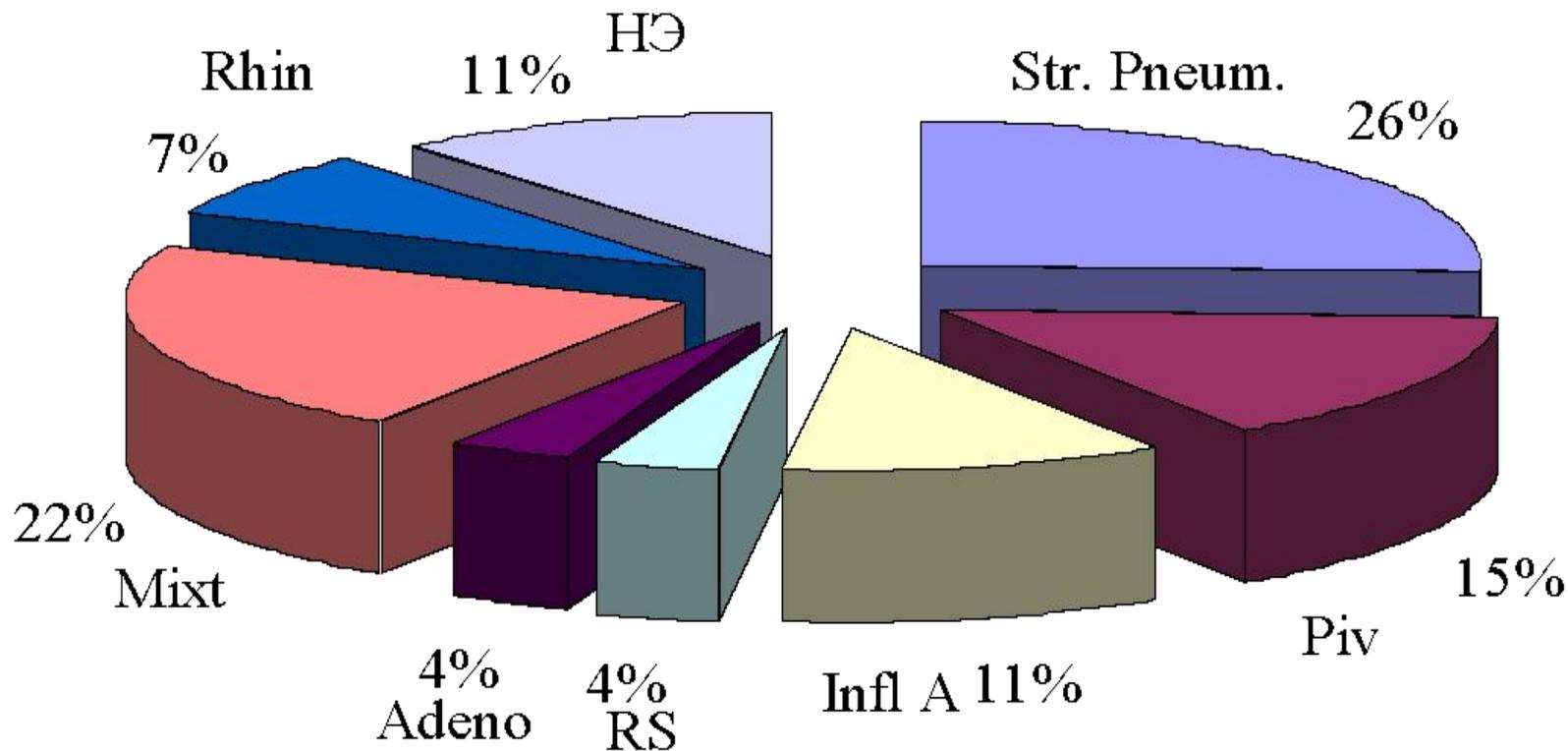
- *По характеру приобретения:*
 - внебольничная пневмония (ВП)
 - нозокомиальная (внутрибольничная) пневмония
- *Классификация ВП, учитывающая состояние иммунологической реактивности организма пациента:*
 - типичная ВП (у пациентов с отсутствием выраженных нарушений иммунитета)
 - ВП у пациентов с выраженными нарушениями иммунитета (СПИД, онкогематологические заболевания и др.)

Возбудители пневмонии у детей

	Бактериальные возбудители	Вирусные возбудители
Врожденные	Аntenатальное инфицирование	<i>CMV</i> , <i>HSV</i> , <i>Rubella</i>
	Интранатальное инфицирование	
Внебольничные	2 недели -2 месяца	<i>Staph.aureus</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>E.coli</i>
	2 месяца - 4 года	<i>Str. pneumoniae</i> (35-40%), <i>H. influenzae b</i> и нетипир. (10%), <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>Staph. aureus</i> (2-5%), <i>Strept. pyogenes</i> (2-5%)
	5-7 лет	<i>Str. pneumoniae</i> (35-40%), <i>M. pneumoniae</i> , <i>Hib</i> и нетипир. (10%), <i>C.pneumoniae</i>
	Старше 7 лет	<i>M. pneumoniae</i> (40-50%), <i>Str. pneumoniae</i> (35-40%), <i>Hib</i> и нетипир., <i>C. pneumoniae</i> (7-10%)

Этиологическая структура пневмоний

февраль - апрель 2006г Хабаровск (дети n=27, аспираты из трахеи)



Пневмококк – 26%

вирусная этиология – 45%

вирусно-бактериальные ассоциации – 18%

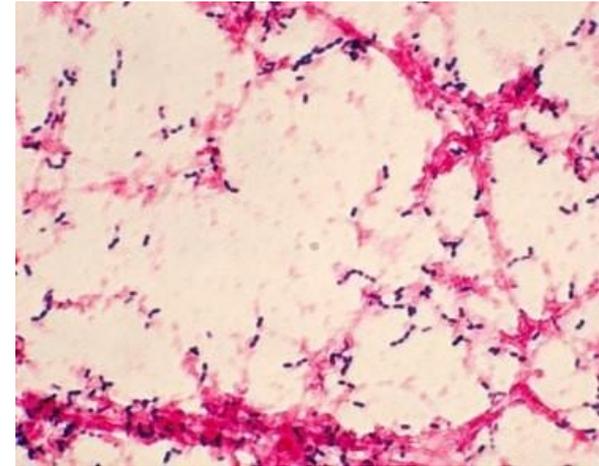
Не уточнённая этиология – 11%

Госпитальные пневмонии

Отделение	Возбудители
ОРИТ, хирургия	<i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>E.coli</i>, <i>Klebsiella</i> spp., <i>Acinetobacter</i>, <i>Candida</i>
Онкогематология	Вирусы, <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Pneumocistis carinii</i>
Терапевтические отделения	<i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>Klebsiella</i> spp.
ИВЛ- ассоциированные пневмонии	<i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>, <i>E.coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Candida</i>, <i>Legionella pneumophila</i>

Пневмококковая пневмония

- *Streptococcus pneumoniae* является самым частым бактериальным возбудителем ВП
- Пневмококковые пневмонии регистрируются у пациентов любого возраста, чаще регистрируется среди пациентов с хроническими заболеваниями
- Как правило, характерно острое начало, высокая лихорадка, боли в грудной клетке
- Клинико-лабораторные и рентгенологические проявления ВП, вызванной *S. pneumoniae*, недостаточно специфичны



Культуральный метод в диагностике пневмококковой пневмонии

- Материал для исследования: мокрота, венозная кровь, инвазивные респираторные образцы, плевральная жидкость
- Необходимость оценки качества доставленного образца
- Критерии пригодности мокроты для бактериологического исследования: >25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в п/з
- Обнаружение грамположительных кокков (чаще - ланцетовидные диплококки) $d=0,5 - 1,25$ мкм, не имеющих спор и жгутиков

Культуральный метод в диагностике пневмококковой пневмонии

- Чаще используют питательные среды:
 - обогащенные дефибринированной кровью животных (5 %)
 - обогащенные дефибринированной кровью человека
 - шоколадный агар
- Инкубация в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 (*S. pneumoniae* - факультативный анаэроб)
- Вероятность выделения увеличивается при использовании селективных сред, ингибирующих рост сапрофитных и грамотрицательных микроорганизмов (колистин, гентамицин)
- Ключевой тест дифференциации пневмококков от других α -гемолитических стрептококков - чувствительность к оптохину
- Информативность культурального исследования зависит от соблюдения общепринятых правил их сбора, хранения и транспортирования



Иммунохроматографический тест

- Выявление пневмококкового клеточного полисахаридного антигена в моче
- Возможность использования «у постели больного»
- Пневмококковый экспресс-тест демонстрирует приемлемую чувствительность (50 - 80 %) и достаточно высокую специфичность (> 90 %)
- Возможность получения ложноположительных результатов при пневмококковом носительстве



ПЦР в диагностике

ПНЕВМОКОККОВОЙ ПНЕВМОНИИ

- В качестве мишеней для амплификации используются гены, кодирующие факторы патогенности:
 - аутолизин (*lytA*)
 - пневмококковый поверхностный антиген (*psaA*)
 - пневмолизин (*ply*)
 - пневмококковый поверхностный протеин А (PspA)
 - марганец-зависимая супероксид-дисмутаза (*sodA*)
 - поверхностный пенициллин-связывающий белок 2b (Pbp2b)
 - Spn9802 и Spn9828
- Данные методы пока не получили распространения в клинической практике
- Возможность использования мультиплексной ПЦР

Пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*

- Периодичность эпидемий с интервалами от 3 до 7 лет
- Распространению инфекции способствует частота и длительность контактов среди лиц, пребывающих в закрытых и полужакрытых коллективах
- Только в 3 - 10 % случаев микоплазменной инфекции рентгенологически диагностируется пневмония
- Диагностика микоплазменной пневмонии только на основании клинических или рентгенологических данных невозможна - не имеет патогномонических черт
- Необходимость лабораторной этиологической диагностики

Диагностика микоплазменной пневмонии

- обнаружение ДНК *M. pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
- выявление антигена микоплазм в реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ)
- серологические исследования по обнаружению специфических антител класса IgM и IgG к *M. pneumoniae* в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа (ИФА)
- Культуральный метод не рекомендован

Диагностика пневмонии, вызванной *Chlamydomphila pneumoniae*

- *C. pneumoniae* - патогенная для человека грамотрицательная бактерия с облигатным внутриклеточным типом паразитирования
- Вызывает пневмонии различной тяжести, длительно протекающие бронхиты, фарингиты, синуситы
- Пневмония, вызванная *C. pneumoniae*, обычно имеет благоприятное течение
- Микст-инфекция осложняет течение заболевания и увеличивает риск летального исхода
- Частота заболеваемости хламидийной пневмонией выше у детей школьного возраста
- Эпидемические вспышки происходят каждые 4 - 10 лет
- Ни один из известных в настоящее время методов диагностики хламидийной пневмонии не обеспечивает 100 %-ю надежность выявления возбудителя

- **Культуральный метод:**
 - Длительность и трудоемкость процесса
 - Низкая чувствительность
 - Доступность только специализированным лабораториям
 - Но в случае выделения жизнеспособного возбудителя диагноз может быть поставлен с наибольшей достоверностью без необходимости применения подтверждающих тестов
 - При персистентной инфекции возбудитель переходит в некультивируемое состояние
- **Серологический метод:**
 - применяют для ретроспективной диагностики и ретроспективного анализа природы эпидемических вспышек
 - Для обнаружения специфических IgM-, и IgG-антител используют метод иммуноферментного анализа (ИФА) или реакцию иммунофлюоресценции (РИФ)

ПЦР-диагностика *Chlamydomorphila pneumoniae*

- Наиболее специфичный и чувствительный метод выявления возбудителя
- Но метод не дает возможность дифференцировать острую и хроническую инфекцию
- Рекомендован биологический материал, полученный из нижних дыхательных путей

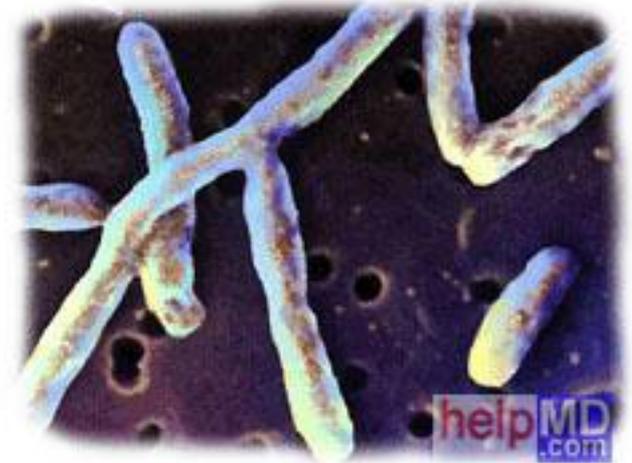
Проблемы диагностики инфекций, вызванных *Chlamydomphila pneumoniae*

- Доказано носительство у доноров (459) в лейкоцитах крови:
 - Elisa – 47,7%
 - Иммуно-флуоресцентная микроскопия – 24,6 %
 - Культуральные исследования с ПИФ – 24,8 %
- Наблюдается носительство в респираторном тракте:
 - у взрослых без симптомов ОРЗ (1–2%)
 - у детей без симптомов ОРЗ (4–6%)

Infection · 2003 · 31 No. 6

S.M. Schmidt et al. *C. pneumoniae* Carriage and Infection in Hospitalized Children

Болезнь легионеров



- Род *Legionella* включает 49 видов
- Для 22 видов доказана роль в инфекционной патологии человека
- Более 90% легионеллезов - *L.pneumophila* (16 серогрупп):
 - 80% - 1 серогруппа
 - 5-10 % - 4 и 6 серогруппы
- Другие виды, наиболее часто вызывающие заболевания людей:
L.micdadei, *L.longbeachae*, *L.dumofii*, *L.bozemanii*
(при нарушениях иммунитета, после трансплантации, при получении иммуносупрессивной терапии)

Основные источники легионеллезной инфекции:

- Система водоснабжения;
- Системы генерирующие аэрозоль:
 1. централизованные системы кондиционирования воздуха
 2. бассейны, ванны с циркулирующей под давлением водой (типа джакузи)
 3. другие (увлажнители воздуха, фонтаны; любое оборудование, распыляющее водный аэрозоль)

Эпидемии легионеллеза (70-е годы XX века)

Год	Город, страна	Количество заболевших (умерших)
1976	Филадельфия (США)	221 (34)
1977	Вашингтон (США)	69 (15)
1977	Бендорм (Испания)	10 (4)
1978	Вестерос (Швеция)	63

Клинические формы

- Болезнь легионеров (пневмония)
 - ✓ 2–6% от общего числа пневмоний
 - ✓ 10–15% от атипичных пневмоний
 - ✓ Инкубационный период – 2-10 дней
 - ✓ Лихорадка, боли в груди, острая дыхательная недостаточность, малопродуктивный кашель, головная боль
 - ✓ Смертность – 6- 15%
- лихорадка Понтиак (гриппоподобное заболевание)
 - ✓ 1-2 дневное повышение температуры, сухой кашель, катаральные явления в носоглотке, головные и мышечные боли
 - ✓ летальные исходы не зарегистрированы
 - ✓ носительство и персистенция легионелл в организме человека не отмечают

1986 году создана Европейская экспертная рабочая группа 37 стран

Подтверждение болезни легионеров

- выделение культуры микроорганизма (из образцов респираторного тракта, лёгких или крови)

или

- обнаружение в моче фильтрующегося антигена

или

- подъём в 4 раза титра антител специфичных для *Legionella pneumophila* I серогруппы

! В случае получения положительного результата методом ПЦР диагноз считать предположительно установленным

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Методические указания МУ 3.1.2.2412-08

диагноз

легионеллеза в случае острой инфекции нижних дыхательных путей (клинически и рентгенологически подтвержденной) считается установленным:

5.2.1.1. при выделении культуры легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани;

5.2.1.2. при 4-кратном или более нарастании титра специфических антител к Legionella pneumophila серогруппа 1 в реакции непрямо́й иммунофлюоресценции;

5.2.1.3. при определении растворимого антигена Legionella pneumophila серогруппа 1 в моче иммуноферментным или иммунохроматографическим методом.

5.2.2. При отсутствии сыворотки крови, взятой в ранние сроки болезни, выявление достоверно высокого уровня антител к Legionella pneumophila серогруппа 1 (1: 128 и выше) в одиночной сыворотке методом непрямо́й иммунофлюоресценции позволяет считать диагноз легионеллеза предположительно установленным. Аналогичным образом интерпретируются результаты, полученные на основании выявления возбудителя или его ДНК в респираторном секрете или легочной ткани с помощью прямой иммунофлюоресценции или ПЦР.

Диагностика

1. Выделение культуры возбудителя:
 - мокрота – чувствительность - 10-80%, специфичность – 100%
 - биоптаты– 90-99%, специфичность – 100%
 - кровь– 10-30%, специфичность – 100%
2. Определение уровня антител:
 - чувствительность 75%, специфичность 95-99%
3. Определение растворимого антигена в моче:
 - чувствительность 90-99%, специфичность 99-100%
4. Прямая иммунофлюоресценция:
 - мокрота – чувствительность - 25-75%, специфичность – 95-99%
 - биоптаты– 80-90%, специфичность – 99%
5. ПЦР:
 - чувствительность – 85%, специфичность – 99%

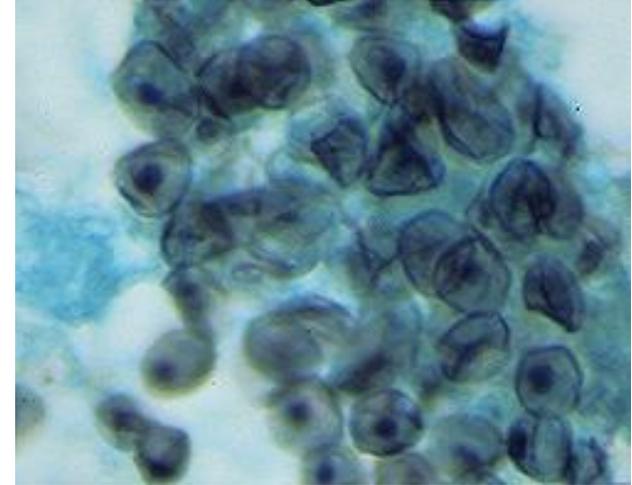
Преимущества ПЦР-анализа

- Быстрота (от 5 до 8 часов)
- Специфичность (зависит от мишени, характеристик тест-системы и способа детекции)
- Большая чувствительность по сравнению с бактериологическим анализом
- Возможность быстрой идентификации *L.pneumophila* с обнаружением всех серогрупп (зависит от характеристик т/с)

Легионеллез - область применения ПЦР-анализа

- Мониторинг объектов окружающей среды с последующим бактериологическим исследованием положительных образцов с высокой нагрузкой ДНК
- Исследование объектов окружающей среды (быстрое расследование источника вспышки)
- Подтверждение случаев смертельного исхода от пневмонии невыясненной этиологии
- Диагностика пневмоний у лиц со сниженным иммунным статусом (*L.pneumophila* различных серогрупп)
- Идентификация культур, подозрительных на *L.pneumophila*
- Молекулярно-эпидемиологическое расследование (ПЦР+секвенирование ДНК)

Диагностика пневмоцистоза

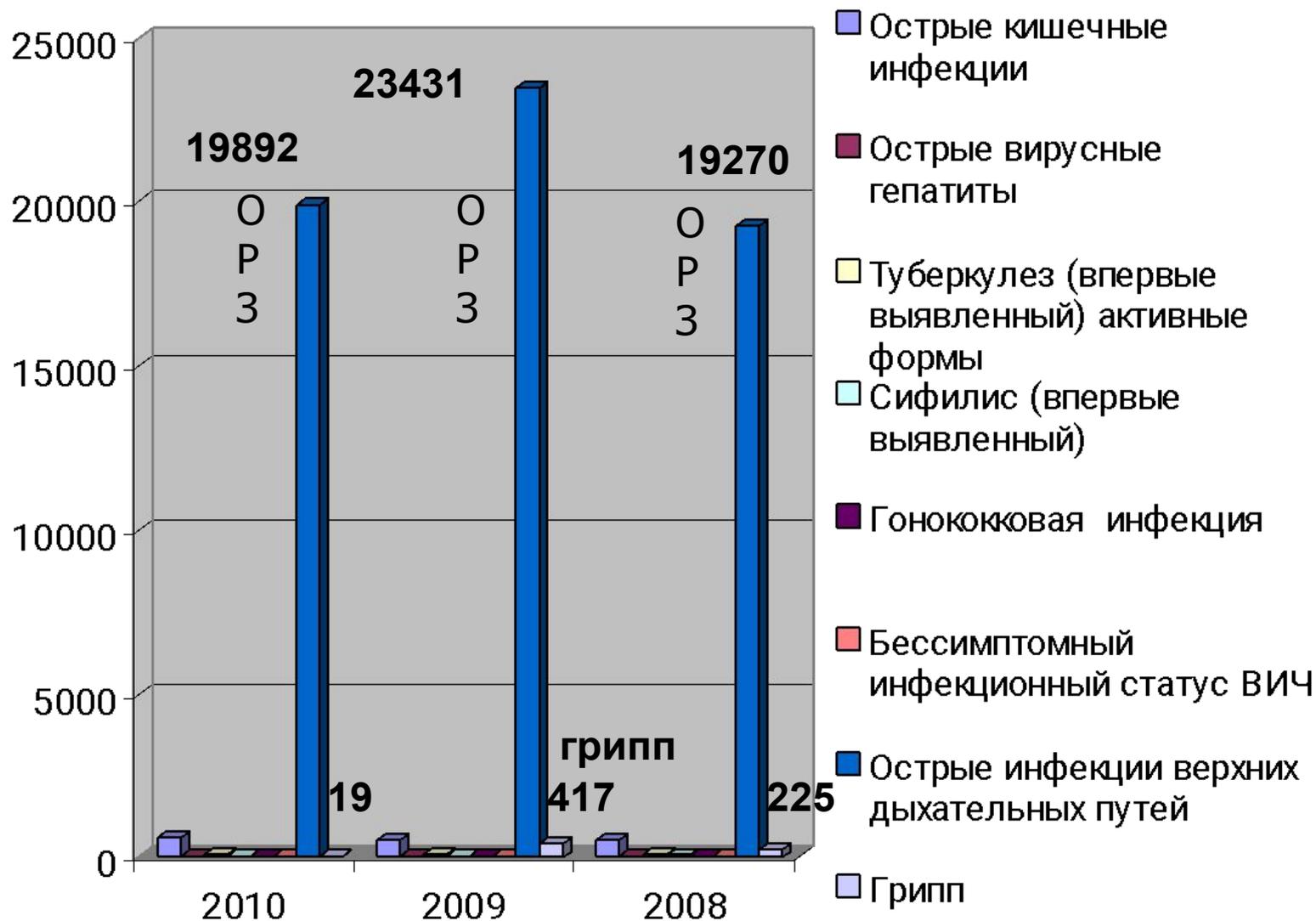


- Возбудитель - *Pneumocystis jiroveci*
- Пневмоцисты тропны исключительно к легочной ткани
- Группами риска в отношении инфицированности *Pneumocystis jiroveci* являются:
 - дети недоношенные, ослабленные новорожденные и дети раннего возраста с гипогаммаглобулинемией, гипотрофией и рахитом
 - больные лейкозом, онкологические больные, реципиенты органов, получающие иммунодепрессанты
 - больные туберкулезом, цитомегалией и другими инфекциями
 - ВИЧ-инфицированные

Диагностика пневмоцистоза

- **Паразитологический метод** (импрегнация метенамин-серебряным нитратом по Гомори, окраска толуидиновым синим, гематоксилином и эозином, по Грамму и раствором Шиффа, методом Романовского-Гимза)
- **Иммунологический метод** (иммунофлюоресцентный метод (РИФ) для выявления цист и трофозоитов, выявление специфических антител классов IgG и IgM (ИФА))
- **ПЦР-диагностика**

Заболеваемость инфекционными болезнями в РФ (01.01.2008 – 31.12.2010)*



*Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях за январь - декабрь 2008, январь - декабрь 2009, январь - декабрь 2010

http://www.rosпотребнадзор.ru/directions_of_activity/profilaktika/stats/

Регистрируемые в РФ формы ОРЗ и потенциальные возбудители

Регистрируемые в РФ формы ОРЗ

Потенциальные возбудители

Грипп



Influenza virus (A, B, C)

Острые инфекции верхних дыхательных путей множественной или неуточненной локализации



Условно-патогенные бактерии
Mycoplasma pneumoniae
Chlamydia pneumoniae
Legionella pneumophila

Острые инфекции нижних дыхательных путей



ОРВИ (90-97 % ОРЗ)

Paramyxoviridae

Respirovirus

– Parainfluenza virus 1,3

Rubulavirus

– Parainfluenza virus 2,4

Pneumovirus – RS virus

Metapneumovirus

Picornaviridae

Rhinovirus, Enterovirus,

Parechovirus

Adenoviridae

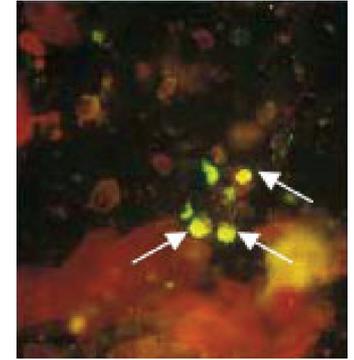
Coronaviridae

Reoviridae

Herpesviridae – Human herpesvirus 3

Parvoviridae – Human bocavirus

Методы диагностики ОРВИ, применяемые на территории РФ



1. Реакции прямой / непрямой иммунофлуоресценции
(наиболее широко применяемый метод как в условиях стационаров, так и в службе Госсанэпиднадзора)
2. Вирусологические исследования ~ 3%*

Получение культуры возможно для:

Influenza A and B viruses, RSV, parainfluenza virus types 1, 2, 3, metapneumovirus, adenovirus

*доклад ФЦГиЭ

«Основные направления деятельности вирусологических лабораторий»

Современное состояние этиологической диагностики ОРЗ

- В амбулаторной практике этиология ОРЗ верхних дыхательных путей и нижних дыхательных путей не уточняется
- При госпитализации этиологию удается уточнить в 15 - 30 % случаев

Проблемы этиологической диагностики ОРЗ

- ✓ Трудоемкость культуральной диагностики ОРВИ
- ✓ Низкая специфичность и чувствительность ПИФ
- ✓ Бессимптомное носительство условно-патогенных бактерий в носо/ротоглотке
- ✓ Нестабильность *Str. pneumoniae* (аутолиз) при хранении и транспортировке клинического материала
- ✓ Конкуренция в бактериальных ассоциациях при культивировании мокроты
- ✓ Плохая высеваемость бактерий из крови
- ✓ Низкая специфичность ИФА для диагностики ОРЗ, вызванных *Mycoplasma pneumoniae*

Условия успешного проведения лабораторной диагностики

1. Использование информативного клинического материала:

- ✓ тип клинического материала, адекватный нозологии
- ✓ сроки отбора материала в соответствии с этапом инфекционного процесса – наибольшая вероятность обнаружения возбудителя
- ✓ отбор материала до антибактериальной терапии

2. Высокое качество клинического материала

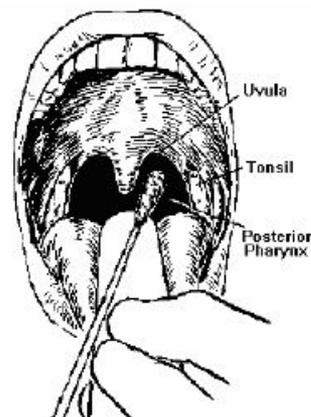
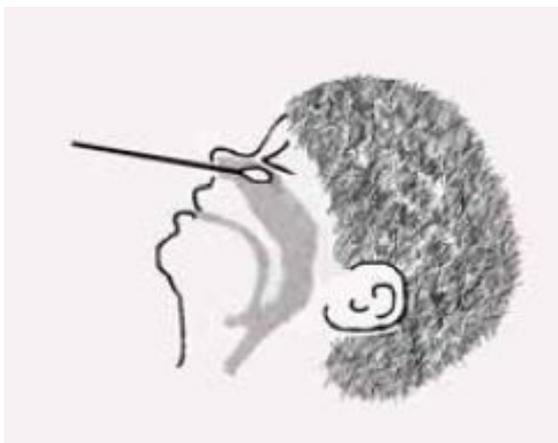
(техника получения материала, репрезентативная мокрота)

3. Обеспечение сохранности клинического материала

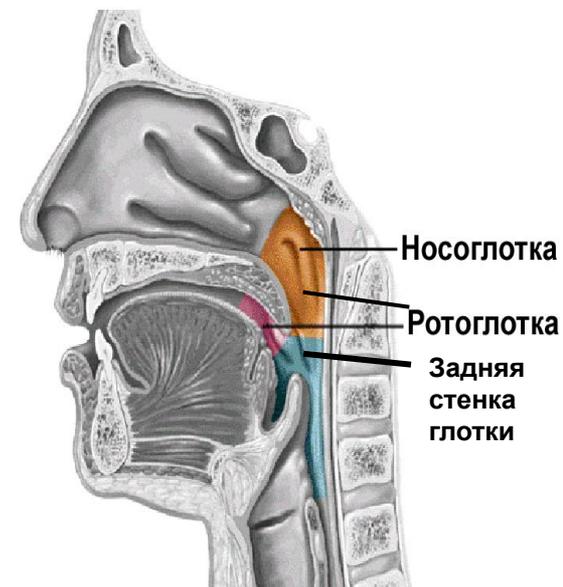
Рекомендуется брать материал как можно раньше от момента появления симптомов, при госпитализации - в первые сутки

Объединенный образец:

- Мазок из верхнего или нижнего носового хода глубина 3-5 см
- Мазок с задней стенки глотки, и миндалин



дужек



Зонды для взятия мазков из верхних дыхательных путей

Зонды для мазков из ротоглотки
Полистирол + вискоза



Зонд-тампон ПС+Виск,
1шт/уп. индивидуальная упаковка,
Стерильный, ИЛС Кат. № 300202

✓ Не использовать зонды на
деревянной основе

✓ Не использовать зонды
с хлопковыми тампонами

10 см



503CS01



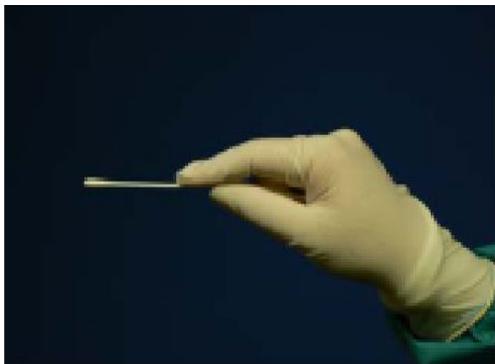
516CS01

Назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе
(503CS01, COPAN, Италия)

Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом
аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия)

Как правильно держать зонды

НЕ правильно
возможна травматизация
пациента !



Правильно



Мазки из носоглотки

1. Мазки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами
2. Зонд с тампоном вводят легким движением по наружной стенке полости носа на глубину 2-3 см до нижней носовой раковины
3. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, и удаляют вдоль наружной стенки полости носа, производя вращательные движения
4. Рабочую часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, раствора фосфатного буфера или коммерческой транспортной среды
5. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки
6. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают ⁴¹

Мазки из ротоглотки

1. Мазки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности небных дужек, миндалин и задней стенки ротоглотки
2. Рабочую часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, раствора фосфатного буфера или коммерческой транспортной среды
3. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки
4. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают

При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке и исследовать как один образец

Хранение и транспортирование образцов

Условия хранения /транспортировки	Мазки и смывы в транспортной среде для ПЦР	Мазки из носа в транспортной среде для МФА	Отделяемое и носоглотки для выделения вируса в ВТС	Секционный материал
-70°С сухой лед, жидкий азот	Предпочт для длительн хранения	Не Рекоменд	Предпочт	Предпочт
-20°С	Допустимо	Нельзя	Нельзя	Допустимо до 4 дней
+4°С	Допустимо до 3 дней	Допустимо	Допустимо до 3 дней	Не Рекоменд
Комнатная температура	Не Рекоменд	Не Рекоменд	Нельзя	Нельзя

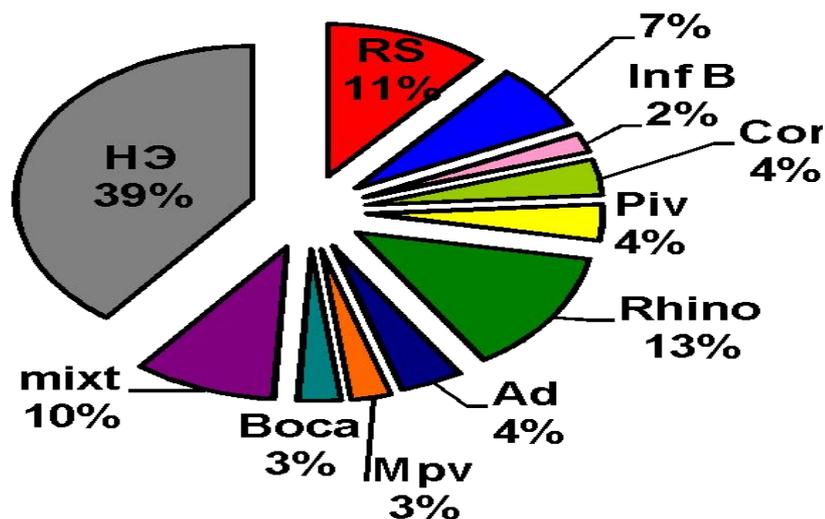
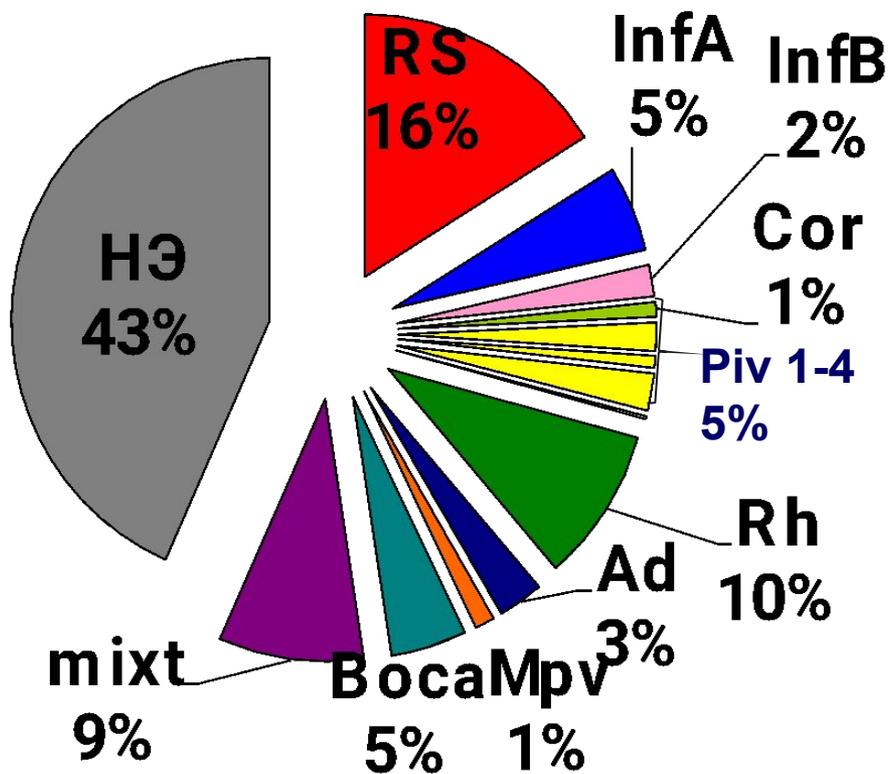
Предобработка материала (в лаборатории):

- мокрота и аспираты из трахеи для снижения вязкости обрабатываются препаратом муколизин (по инструкции к препарату)
- для мазков предобработка не требуется - пробирку с зондами перемешать на вортексе, не открывая крышек, кратковременно ЦФ и отобрать нужный объем для исследования

Этиологическая расшифровка ОРЗ методом ПЦР (Москва, ФГУН ЦНИИЭ)

2005-2006, N=566

2006-2007, N=419



Сравнение результатов ПЦР и МФА

ПЦР	Серология	МФА	Кол-во проб
Мус. рп.	Мус. рп.	Адено+гриппВ	1
Мус. рп.	Мус. рп.	Адено+РС	1
Мус. рп. +Ev	Мус. рп.	Рiv	1
РС		Адено	2
РС		отр	1
Мрv		Адено+РС	1
Мрv		Адено	1
Мрv		Грипп А	1
Rhino		Адено	1
Адено, Грипп А		Адено	1
Мус. рп.+ Адено	Мус. рп.	Адено	1
Адено		Адено	1
Мус. рп.	Мус. рп.	отр	4
отр		отр	1

по МФА 9 образцов положительны на аденовирус (только 3 совпали с ПЦР) ⁴⁵

Возможности ПЦР - диагностики

- Высокоэффективна для этиологической диагностики ОРЗ спорадического и вспышечного характера
- Использование ПЦР позволит уточнить долю типичных бактериальных возбудителей в этиологической структуре пневмоний и изучать роль вирусных агентов и вирусно-бактериальных ассоциаций в патогенезе ОРЗ
- Внедрение ПЦР позволит избежать часто необоснованного применения антибиотиков при ОРВИ, и своевременно назначать специфическую терапию при инфицировании бактериальными возбудителями ОРЗ
- Перспективы изучения этиологии хронических заболеваний дыхательных путей (бронхиальной астмы, ХОБ, ХОБЛ)

ПЦР тест-системы, производимые в ЦНИИЭ

АмплиСенс®

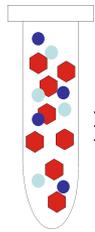
1. «Influenza virus A/B» - вирусы гриппа А и В
2. «Influenza virus A/H1-swine»
3. «Influenza virus А-тип»
4. «Influenza virus А H5N1»
5. «hRSV» - респираторно-синцитиальный вирус
6. «Adenovirus» - Аденовирусы (ЭФ)
7. «PIV-FRT» - вирусы парагриппа с типированием
8. «Mycoplasma pneumoniae» (ЭФ)
9. «Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae»
10. «Legionella pneumophila»
11. «ОРВИ-скрин-FL»

«ОРВИ-скрин» - набор для этиологической диагностики ОРВИ

6 пробирок (13 видов вирусов), формат FRT

семейство Paramyxoviridae
п/семейство Pneumovirinae

1



ВКО - FAM

RS - JOE

Mpv - ROX

род Pneumovirus

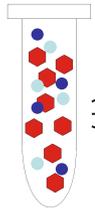
вид Human Respiratory Syncytial virus (RS)

род Metapneumovirus

вид Human Metapneumovirus (Mpv)

п/семейство Paramyxovirinae
род Respirovirus род Rubulavirus

2

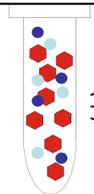


ВКО - FAM

Piv 3 - JOE

Piv 1 - ROX

3



ВКО - FAM

Piv 2 - JOE

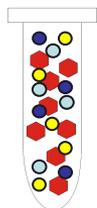
Piv 4 - ROX

Виды: Human Parainfluenza virus 1, 3 Виды: Human Parainfluenza virus 2, 4 48
(вирусы парагриппа)

«ОРВИ-скрин» - набор для этиологической диагностики ОРВИ

семейство Coronaviridae

4

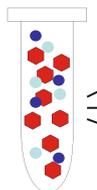


ВКО - FAM
E 229 / NL 63 - JOE
OC 43 / HKU 1 - ROX

Виды:
Human Coronavirus
OC 43, 229E,
HKU1, NL63

семейство Parvoviridae, род Bocavirus
семейство Adenoviridae, , род Mastadenovirus

5



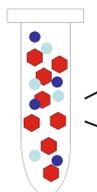
ВКО - FAM
Boca - JOE
Ad - ROX

Вид: Human Bocavirus

Виды: Human adenovirus B, C, E

семейство Picornaviridae, род Rhinovirus

6



ВКО - FAM
Rh - ROX

Вид: Human Rhinovirus
100 серотипов

Характеристика основных возбудителей ОРЗ

Респираторно-синцитиальный вирус

семейство Paramyxoviridae
п/семейство Pneumovirinae
род Pneumovirus
вид Human respiratory syncytial virus (HRSV)



- Геном – о.ц. РНК отрицательной полярности; оболочка – есть
- Поражает как ВДП, так и НДП вызывает значительную деструкцию эпителия
- На HRSV приходится 64 млн случаев ОРЗ в год в мире
- Уровень летальности в мире от HRSV-инфекции составляет 160 тыс в год
- HRSV-инфекция – причина госпитализации 19% детей до 5 лет с ОРЗ НДП В Европейских странах (причина бронхоолитов до 85% и пневмонии до 20%)
- Причина 20% гриппо-подобных болезней у взрослых от 15 до 45 лет
- Иммуитет – нестойкий
- Доказана значимость, как причины развития бронхиальной астмы

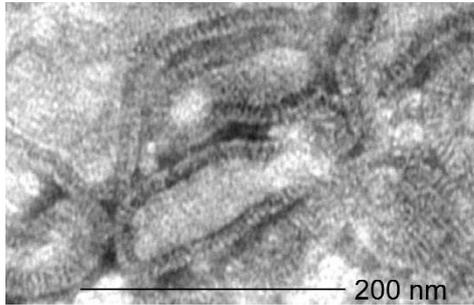
Связь РС-вирусной инфекции с бронхиальной астмой

Швеция, проспективное исследование (серология-IgG, IgA)

	Количество детей	Случаи заболевания бронхиальной астмой	
		К 7 годам:	К 13 годам:
Дети, госпитализировавшиеся в первый год жизни (≤ 6 мес) с бронхоолитом, вызванным РС-вирусом	46	30 %	43 %
Дети без случаев заболевания РС-вирусной инфекцией в первый год жизни	92	3 %	7,6 %

N.Sigurs. Am J Respir Crit Care Med Vol 171. pp 137–141, 2005

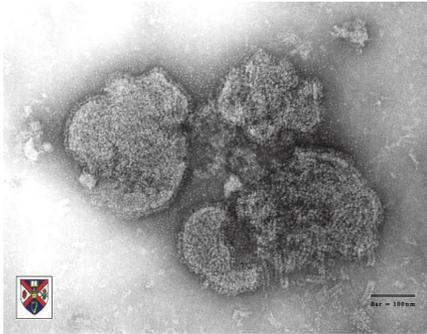
Метапневмовирус



семейство Paramyxoviridae п/семейство Pneumovirinae
род metapneumovirus
вид Human metapneumovirus (HMPV)

- Выделен в 2001 г. из назофарингиальных аспиратов детей с ОРЗ
- Клиника HMPV-инфекции сходна с HRSV (заболевания НДП у детей)
- К 5 годам практически все дети имеют антитела к вирусу
- Часто выявляется вместе с другими вирусами
- Инкубация 3-5 дней
- Противовирусные средства не известны
- Основные клинические проявления — ринит, бронхиолит, круп

Вирусы парагриппа



семейство Paramyxoviridae

п/семейство Paramyxovirinae

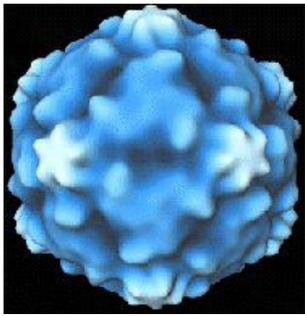
род Respirovirus

виды Human Parainfluenza virus 1,3 (HPIV-1,3)

род Rubulavirus

виды Human Parainfluenza virus 2,4 (HPIV-2,4)

- Геном – о.ц. РНК отрицательной полярности; оболочка – есть
- Поражает как ВДП, так и НДП вызывает значительную деструкцию эпителия
- HPIV-инфекция является второй по частоте причиной госпитализации детей и пожилых людей после HRSV
- Почти все дети к 2 годам хотя бы один раз переболевают HPIV-инфекцией
- В США на HPIV-инфекцию приходится 64% случаев крупов и 22% случаев заболевания нижних дыхательных путей
- HPIV-1-4 (круп и бронхо-обструкция), HPIV-3 (пневмонии и бронхиолиты)
- Инкубация — 2-6 дней, иммунитет не стойкий, повторные инфекции — не редкость
- Противовирусные средства не известны



Риновirusы

семейство Picornaviridae

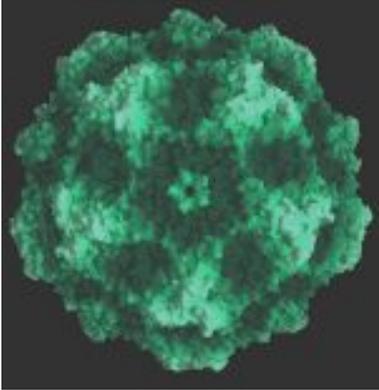
род Rhinovirus

виды Human Rhinovirus (HRV)

более 100 серотипов, выделяют генотипы А, В, С

- Более 100 серотипов, относящихся к пикорнавирусам, заражение от человека к человеку, часто через загрязненные вирусом руки
- Геном – о.ц. РНК положительной полярности
- Оболочки – нет
- Отличие от Энтеровирусов – кислото-неустойчивость
- Поражает преимущественно ВДП, не вызывает деструкции эпителия, но доказана возможность репликации в бронхиолах
- HRV второй по частоте случаев ОРЗ после РС у детей и первый -у взрослых
- У детей вызывают обструкцию дыхательных путей, бронхиты, бронхиолиты, пневмонию, синуситы, отиты; у взрослых – заболевания верхних дыхательных путей
- Дискутируется значимость, как причины обострений бронхиальной астмы
- Длительность выделения вируса – до 3-х недель
- Иммуитет – серотип-специфичный IgA, нестойкий

Бокавирус человека

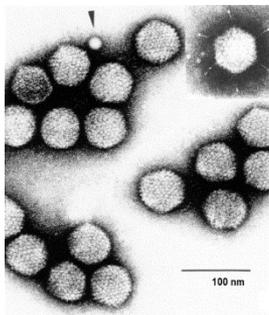


семейство Parvoviridae
п/сем Parvovirinae
род Bocavirus
вид human Bocavirus (HBoV)

Геном – о.ц. ДНК
Оболочки – нет

- Открыт в 2005 году
- Зарегистрирована высокая распространенность (6 годам все дети имеют антитела к бокавирусу человека)
- Доказательство инфекционности:
 - зарегистрировано выявление ДНК возбудителя в назофарингеальных мазках и в крови с одновременным повышением титра антител > 10 раз у пациентов с ОРЗ нижних отделов респираторного тракта
- Вирусная ДНК обнаруживается также в фекалиях, сыворотке, моче

Аденовирусы



семейство Adenoviridae

род Mastadenovirus

виды Human adenovirus A-F (HAdVA, ..F, G)

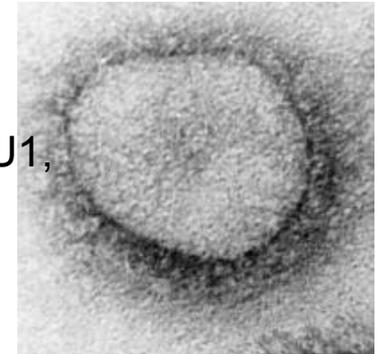
- ДНК-вирусы, имеют более 50 серотипов, составляющие 6 видов (A-F)
- С ОРЗ ассоциированы аденовирусы В, С и Е
- Геном – д.ц. ДНК
- Оболочки – нет
- Очень стабилен в окружающей среде
- Поражает преимущественно ВДП, не вызывает деструкции эпителия (четвертый по частоте у детей)
- Может вызывать крупы, бронхиты, пневмонии

Коронавирусы – возбудители ОРЗ

семейство Coronaviridae

род Coronavirus

виды Human Coronavirus OC 43 (HCoVOC43), 229E (HCoV 229E), HKU1, NL63, Human enteric coronavirus, SARS (SARSCoV)



- Геном – о.ц. РНК положительная
- Оболочка – есть
- HCoV ассоциируют с крупами и ларингитами
- Преимущественно болеют дети до 1 года
- Эти крупные РНК-вирусы делят на 3 группы: в группу 1 входят патогенные для человека 229E и NL63, в группу 2 — OC43 и, возможно, вирус SARS. В группу 3 входят птичьи коронавирусы (вирус бронхита индеек и др.)
- Вирусы человека распространены повсеместно, заболеваемость учащается зимой. Инкубационный период 2-5 дней
- Коронавирус SARS (тяжелый острый респираторный синдром, =пурпурная смерть, =атипичная пневмония) вызвал эпидемию в 2003 г. (заражение от животного, затем активно распространялся от человека к человеку). SARS вызывает тяжелый острый респираторный синдром с поражением легких по типу респираторного дистресс-синдрома взрослого типа
- Специфические лекарственные средства не известны

SARS/ТОРС: хронология событий

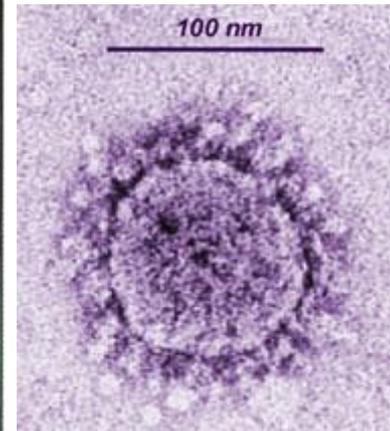
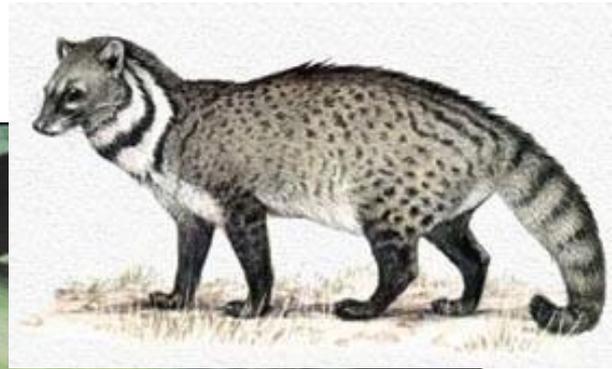
- осень 2002г – Китай, провинция Guandong - регистрация случаев «атипичных пневмоний» с высокой летальностью
- 21 февраля 2003г – Гон Конг - регистрация завозного случая у гражданина Китая и развитие заболевания у 18 контактировавших с ним лиц
- март 2003г – распространение заболевания в 13 стран мира. Общее количество заболевших 1622, погибших – 58
- 10 августа 2003г – Итоги: 8422 заболевших и 916 (11%) погибших пациентов в 32 странах мира

Циветты – источник вируса ТОРС для человека

- Циветты, енотовидные собаки, барсуки:

США, Канада, Европа, Китай, Индия, Япония

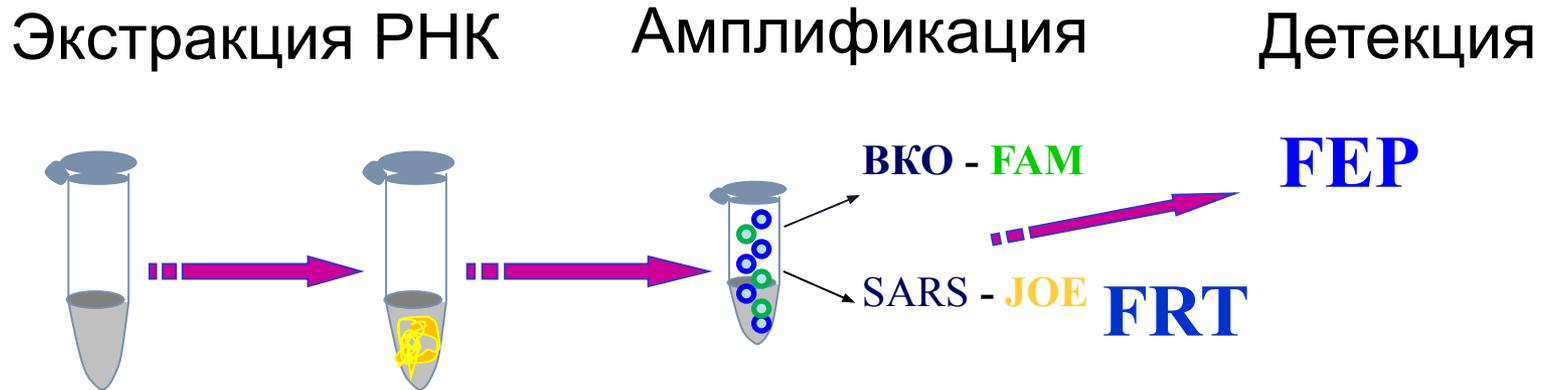
(SARS-CoV)



Лабораторная диагностика ТОРС в РФ

- РТ-ПЦР РНК вируса SARS-CoV (<7 дней)
- Серология ИФА IgM и IgG (≥ 2 недели)
 - специфичность - 95%
 - IgM в ИФА сохраняется более 4 недель

Схема исследования на коронавирус, вызывающий ТОРС (SARS-CoV)



Тестируемый материал:

- Плазма крови
- Мазки из полости носа и с задней стенки глотки
- Мокрота
- Фекалии

Вирусы гриппа - классификация

Семейство Orthomyxoviridae

Рода Influenzavirus A

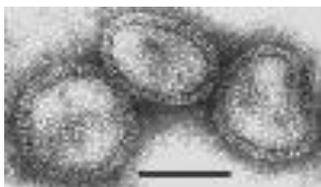
Influenzavirus B

Influenzavirus C

Виды Influenza A virus

Influenza B virus

Influenza C virus



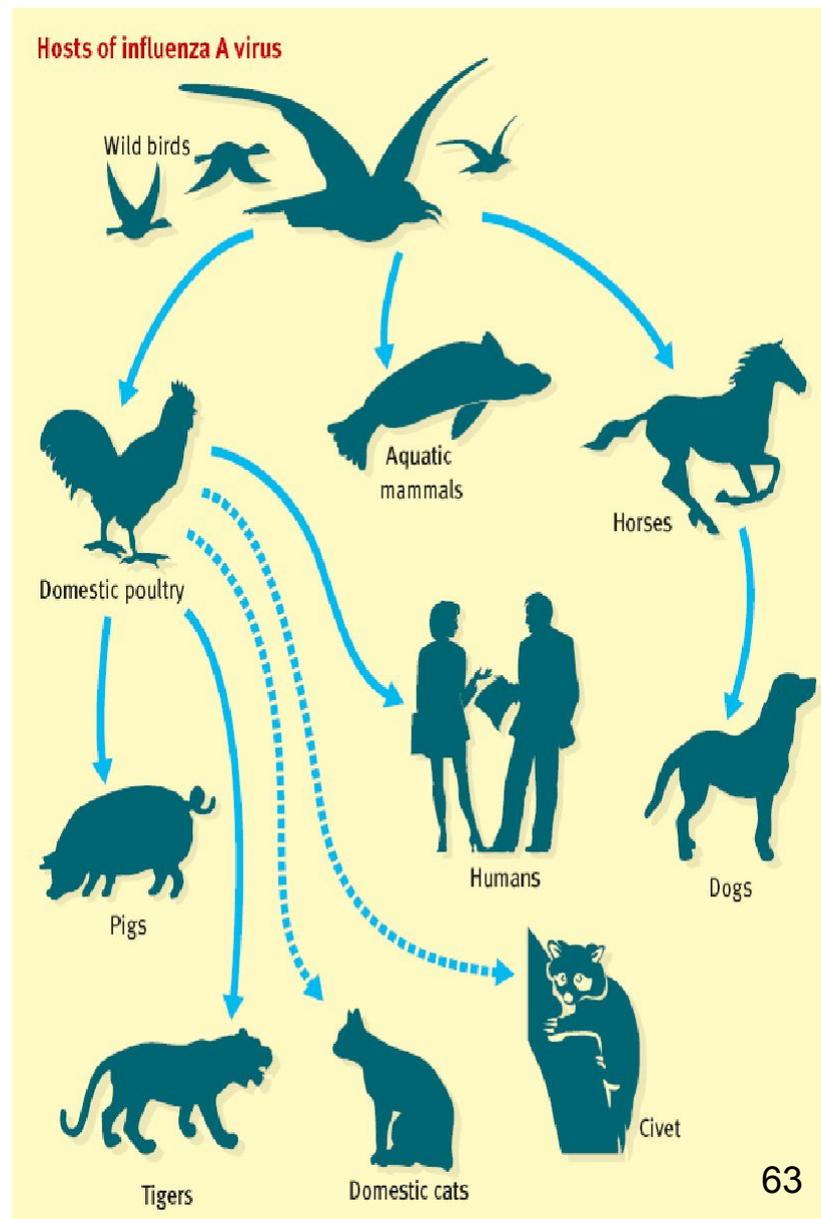
A- люди, птицы, свиньи и лошади, морские млекопитающие

B- только люди

C- люди и свиньи

A B C

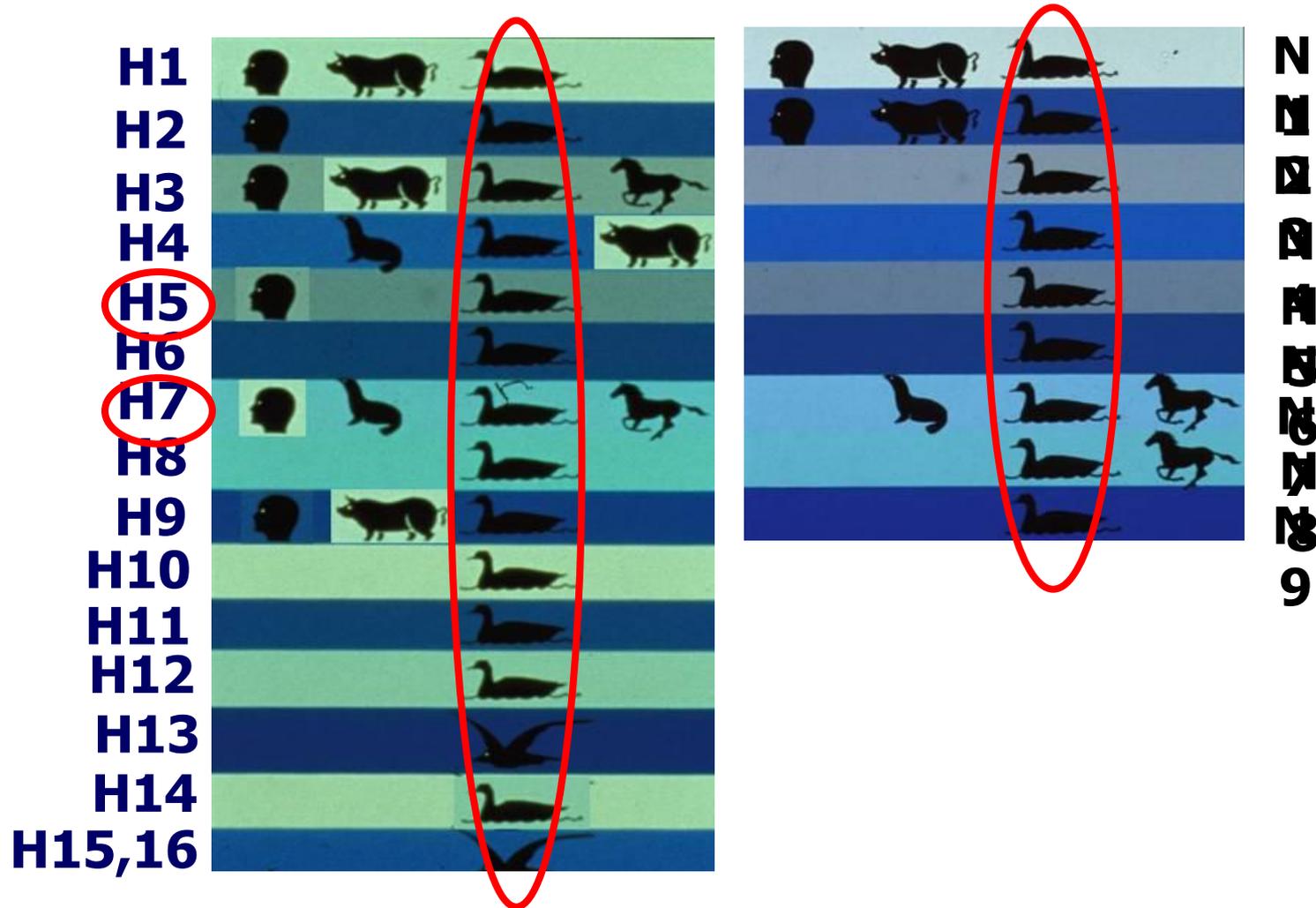
имеют антигенные различия (по особенностям строения нуклео - и матрикс - протеинов)



Грипп А

- Вызывает эпидемии и пандемии, ежегодно в мире:
 - 600 млн случаев заболеваний,
 - 150 - 200тыс случаев госпитализаций,
 - 250-500тыс летальных исходов,
- Субтипы гриппа А отличающиеся по сочетанию двух поверхностных гликопротеинов:
 - Гемагглютинин (НА) = 16 типов
 - Нейраминидаза (NA) = 9 типов
- Все субтипы вируса А циркулируют среди диких птиц
- Сезонный грипп: только субтипы H1N1, H3N2 циркулируют среди людей в настоящее время

Спектр потенциальных хозяев различных субтипов вируса гриппа А



Мутационный процесс вируса гриппа А

Антигенный дрейф

(Незначительные изменения HA/NA)

- Точечные мутации во время репликации, подтип остается тем же

Следствия:

- Постоянные изменения антигенных свойств
- Ежегодные эпидемии
- Необходимость ежегодного обновления вакцин

Антигенный шифт

(Значительные изменения HA/NA)

- Генетическая реассортация или
- Адаптация вируса гриппа птиц или других животных к организму человека

Следствия:

- Появляется новый субтип
- Опасность пандемии

Пандемии гриппа в XX веке и в XXI веке....



1918: “Испанка”
40-50 млн погибших

H1N1



1957: “Азиатский грипп”
1-4 млн погибших

H2N2



1968: “Гонконгский грипп”
> 1 млн погибших

H3N2



2009: “Свиной грипп”
~ 18 тыс. лабораторно
подтвержденных случаев
летального исхода (ВОЗ)

H1N1sw

- Обнаружение и типирование вирусов гриппа - контроль появления новых субтипов с потенциальной пандемической опасностью
- Своевременное применение этиотропной терапии гриппа

Вирус гриппа А/Н5N1

- Вирус может присутствовать у инфицированной птицы во всех органах и частях
- Выживание в фекалиях:
 - 35 дней при 4°C/6 дней при 37°C
- Выживание в птичниках:
 - Несколько недель
- Только тщательная термическая обработка позволяет инактивировать вирус
 - Замораживание/охлаждение неадекватны
- Яйца инфицированной птицы могут быть контаминированы как изнутри так и снаружи скорлупы (кипячение не менее 10 минут)

Сравнение симптоматики сезонного гриппа и ВПГА (H5) у человека

Кашель

Лихорадка

Боли в горле

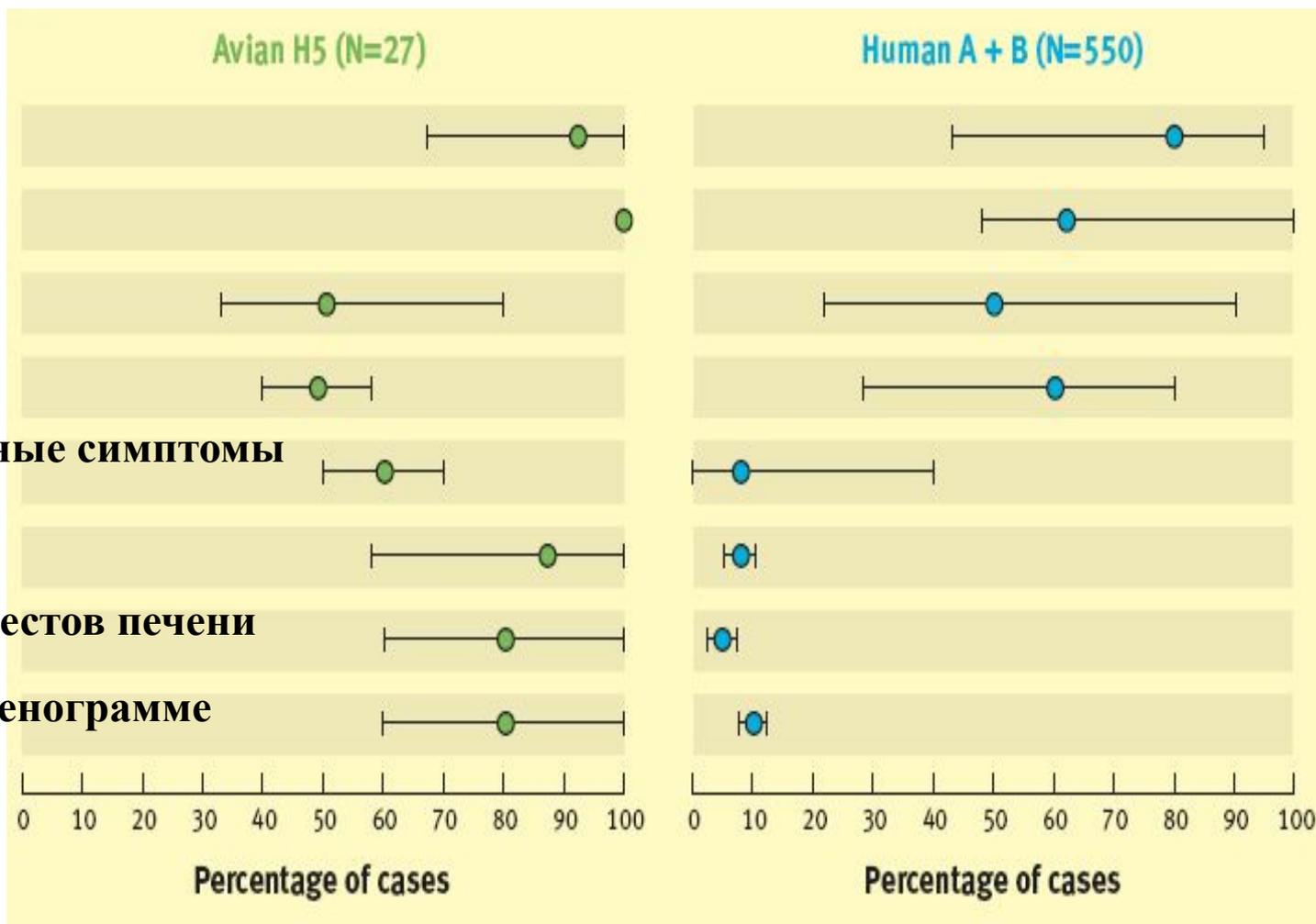
Миалгии

Гастроинтестинальные симптомы

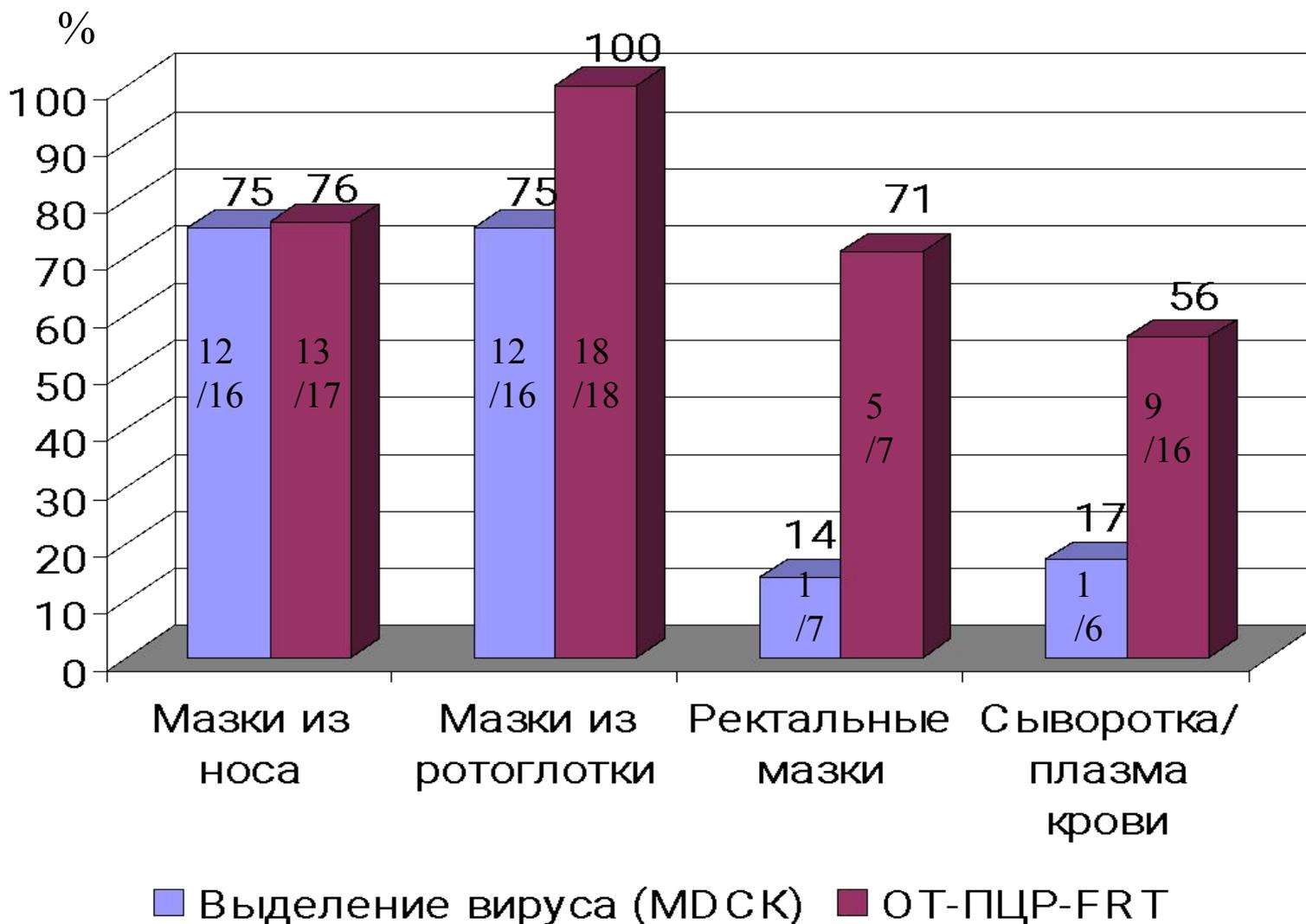
Лимфопения

Изменения функц. тестов печени

Изменения на рентгенограмме



Сопоставление результатов основных методов лабораторной диагностики случаев гриппа А/Н5N1 у людей (Вьетнам 2004-2005гг)



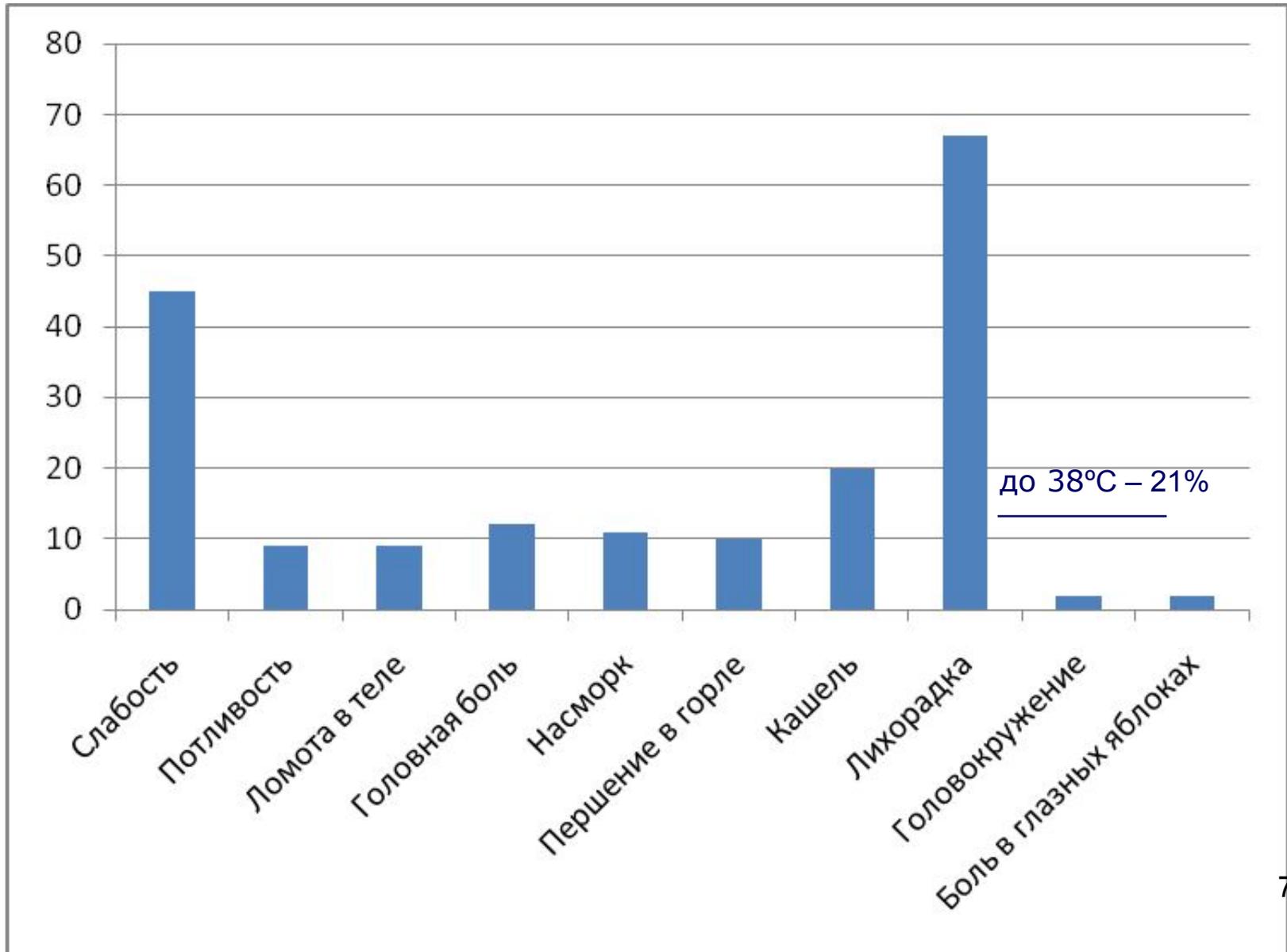
Пандемия гриппа 2009г (А/Н1N1)

С 18 марта в Федеральном округе Мехико в рамках эпиднадзора стали регистрироваться случаи выявления схожей с гриппом болезни (СсГБ или ГПЗ).

В апреле число случаев заболевания устойчиво росло, на 23 апреля в Мехико было зарегистрировано более 854 случаев пневмонии, 59 из которых закончились смертельным исходом. 24 апреля 2009 г. Правительство США сообщило о семи подтвержденных случаях заболевания людей свиным гриппом А/Н1N1 в США (в Калифорнии и Техасе) и девяти подозреваемых случаях заболевания.

В Мексике 18 случаев были лабораторно подтверждены как свиной грипп А/Н1N1, 12 из них были генетически идентичны с вирусами свиного гриппа А/Н1N1 из Калифорнии.

Симптомы, отмечавшиеся в первые дни болезни (лабораторное подтверждение гриппа A/H1N1(sw2009) посмертно)



Динамика заболеваемости и смертности

Количество лабораторно-подтвержденных случаев в мире



Смертность



Смертность средняя – 0,71%

Смертность в Мексике – 1,92%

Смертность в США – 0,15%

Лабораторная диагностика: рекомендации Центра по контролю и профилактике заболеваний CDC США

- ПЦР с использованием валидированных протоколов
- Изоляция вируса в культуре MDCK или на куриных эмбрионах с последующим секвенированием генома (окончательная идентификация)
- Не рекомендуются быстрые тесты по обнаружению антигенов гриппа А: иммунофлуоресценция, иммунохроматография, в связи с низкой чувствительностью (от 40 до 60%) и отсутствием специфичности определения «свиного» штамма

ПЦР - диагностика гриппа

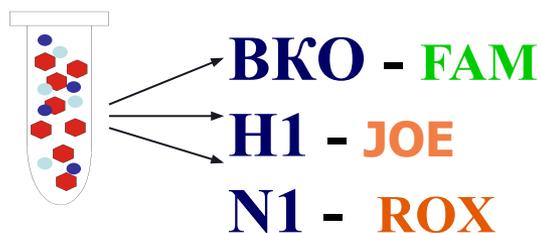
наборы для ПЦР-FRT/FER (ФГУН ЦНИИЭ)

семейство Orthomyxoviridae

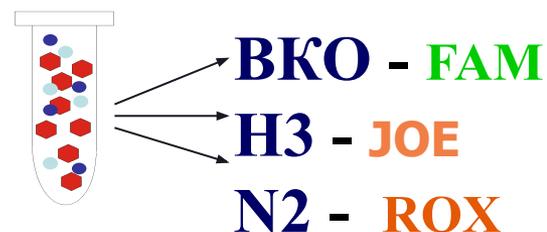


Типирование вирусов гриппа

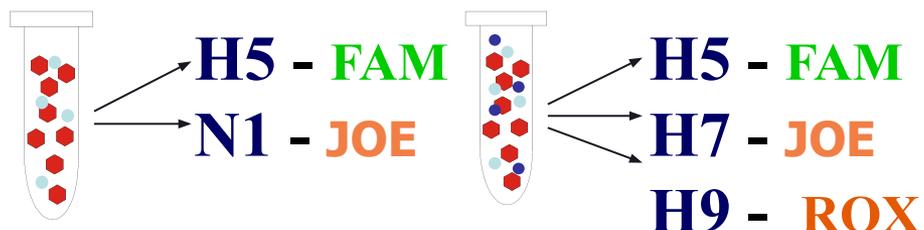
«Influenza virus A-тип-FL»



«Influenza virus A H5/N1»

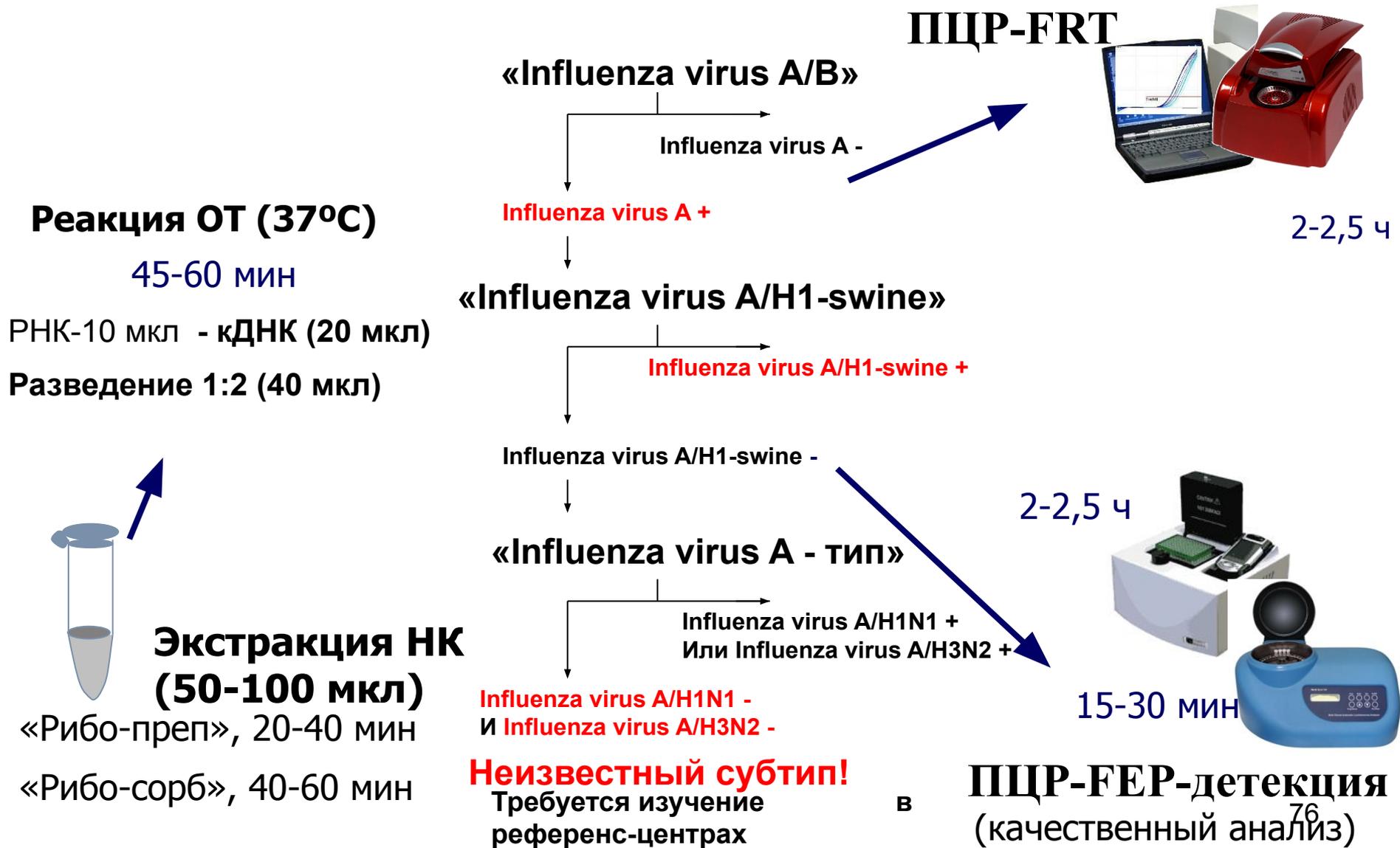


«Influenza virus A/H1-swine»



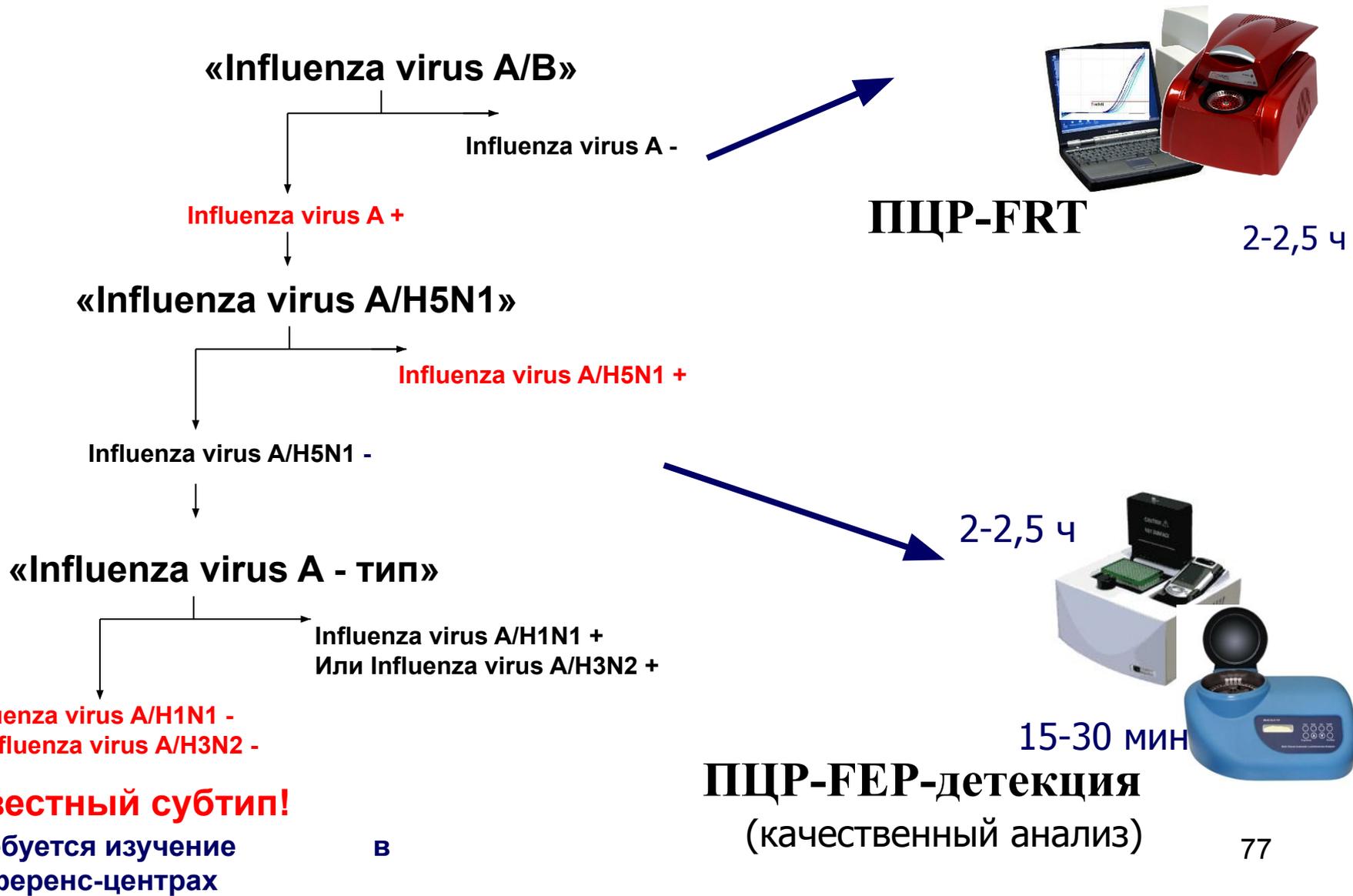
Алгоритм проведения ПЦР-анализа (Грипп)

Наличие эпидпоказаний для тестирования на пандемический грипп



Алгоритм проведения ПЦР-анализа (Грипп)

Наличие эпидпоказаний для тестирования на грипп птиц



Неизвестный субтип!

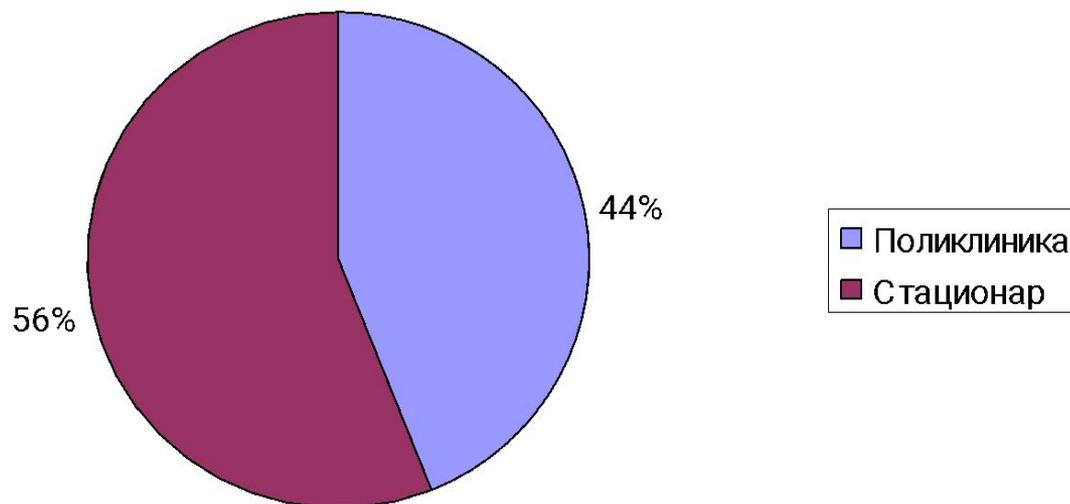
Требуется изучение референс-центрах

В

77

Первичное обращение за медицинской помощью

(лабораторное подтверждение гриппа A/H1N1(sw2009) посмертно)



42% - на 1-2 сутки болезни, 29% - на 3-4 сутки

Этиологическая терапия (преимущественно на 4-5 д.б.):

74%: Тамифлю (34%), Арбидол, Ингавирин

Антибиотики – 100% при поступлении в стационар

Ранняя диагностика – залог своевременной этиотропной терапии гриппа!

Спасибо за внимание!