

ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

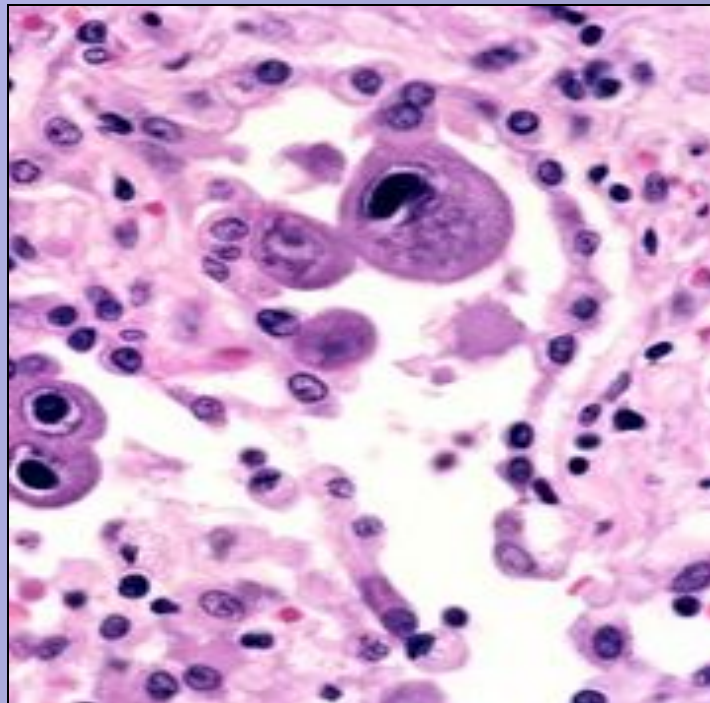
МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

- ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
- ЭКСПРЕСС МЕТОДЫ
- ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД
- СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Исследуются материалы аутопсии, биопсии, мазки, которые после соответствующей обработки окрашиваются и анализируются под микроскопом.

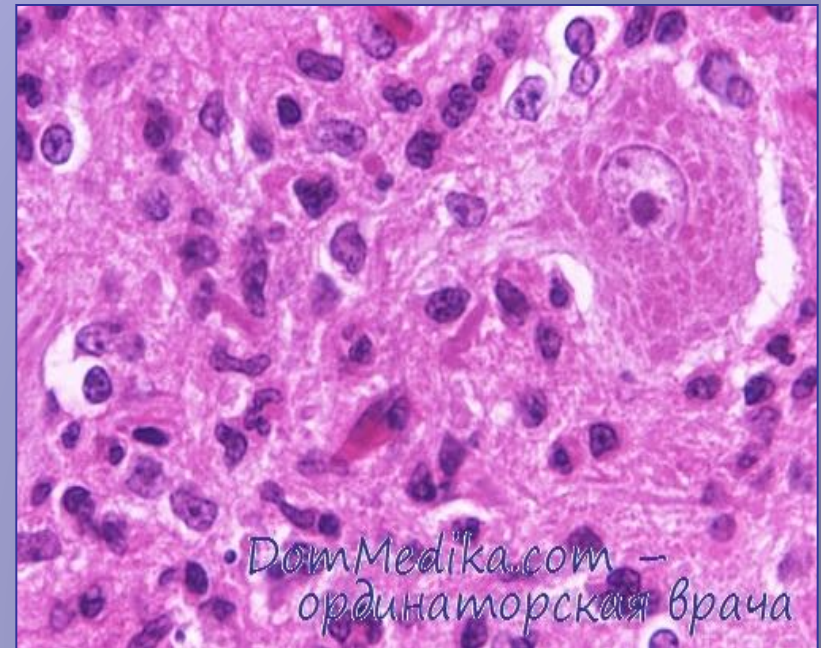
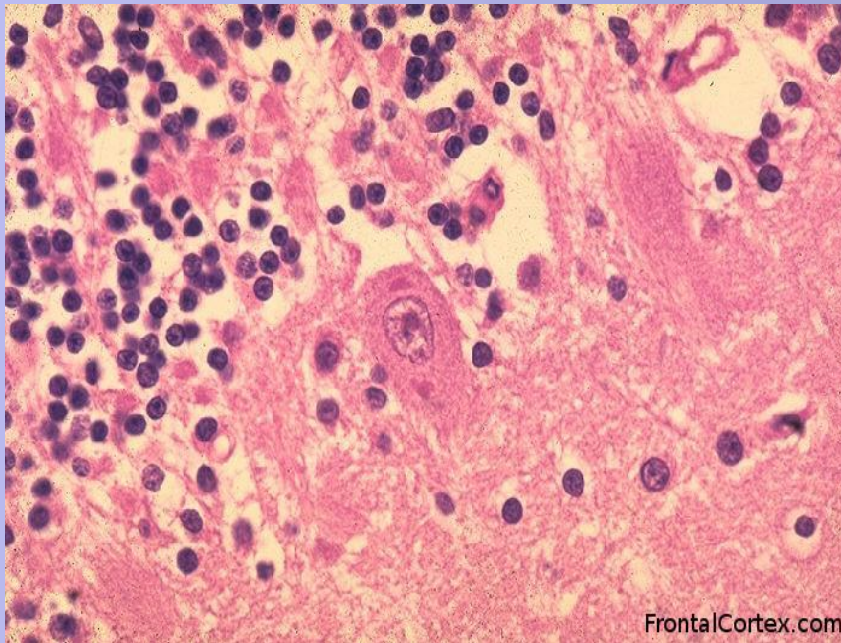
- **цитомегаловирусная инфекция** (семейство герпесвирусы) - в срезах ткани или в моче обнаруживаются характерные гигантские клетки- «совиные глаза»
- **вирус бешенства** (семейство рабдовирусы) - включения в цитоплазме клеток (тельца Бабеша-Негри).



«совиные глаза»

Тельца Бабеша-Негри в окрашенных гистологических срезах, мазках или отпечатках мозга обнаруживаются в цитоплазме нервных клеток в виде округлых, овальных, сферических, амебовидных или веретенообразных включений.

Хорошо видимые под световым микроскопом тельца Бабеша-Негри состоят из гомогенной основной субстанции, содержащей зерна, и отделены от цитоплазмы клетки неокрашенным, светлым ободком. Зерен величиной от 0,2 до 1 мкм может быть 1-15.



I. ЭКСПРЕСС МЕТОДЫ

Обнаружение вирусного АГ или НК в исследуемом (клиническом материале) с помощью:

- **РИФ**
- **ИФА**
- **РИА**
- **ПЦР**
- **Метод электронной микроскопии и иммунной электронной микроскопии**

РИФ - Реакция иммунофлюоресценции

Метод основан на использовании антител, связанных с красителем.

- применяется для быстрой расшифровки этиологии острых респираторных вирусных инфекций.
- требует содержания в клиническом материале достаточно большого числа инфицированных клеток.

ИФА - Иммуноферментный анализ

Метод основан на мечении антител ферментами

- позволяет измерять растворимые антигены.
- могут использоваться различные виды клинического материала.

РИА - Радиоиммунный анализ

Метод основан на метке антител радиоизотопами,.

- высокая чувствительность в определении вирусного антигена.
- недостаток - работа с радиоактивными веществами и использование дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

метод ПЦР - полимеразной цепной реакции

Метод заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирусспецифической последовательности ДНК. В основе – способность вирусной ДНК гибридизироваться с меченой комплементарной ДНК.

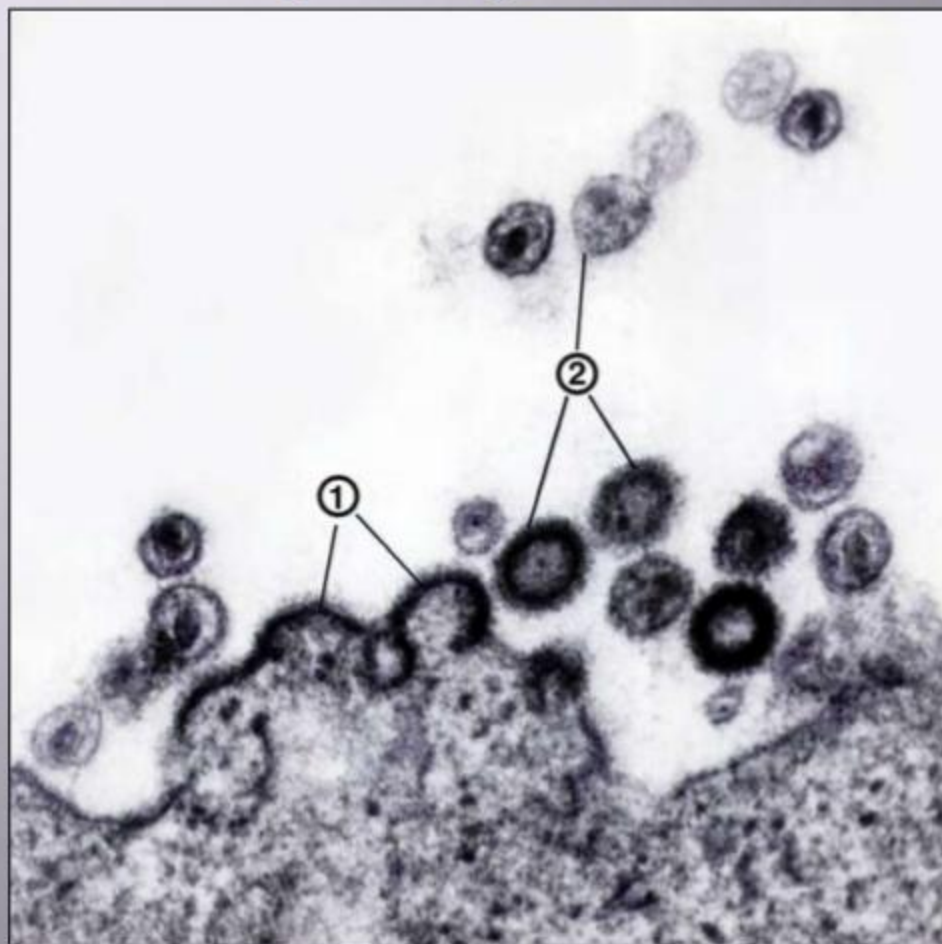
- позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК в исследуемом материале.

Электронный микроскоп



С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Для успешного определения вируса необходима его высокая концентрация в пробе (~ миллион частиц/мл)

Электроннограмма ВИЧ



Иммунная электронная микроскопия (ИЭМ)

- электронная микроскопия вирусов, обработанных соответствующими антителами, меченными атомами металлов.

Вокруг вирионов образуется "венчик" из антител, поэтому одновременно происходит обнаружение вируса и его идентификация.

II. Вирусологический метод

1-ый этап – накопление вирусов

**2-ой этап – обнаружение (индикация)
вирусов**

3-ий этап – идентификация вирусов

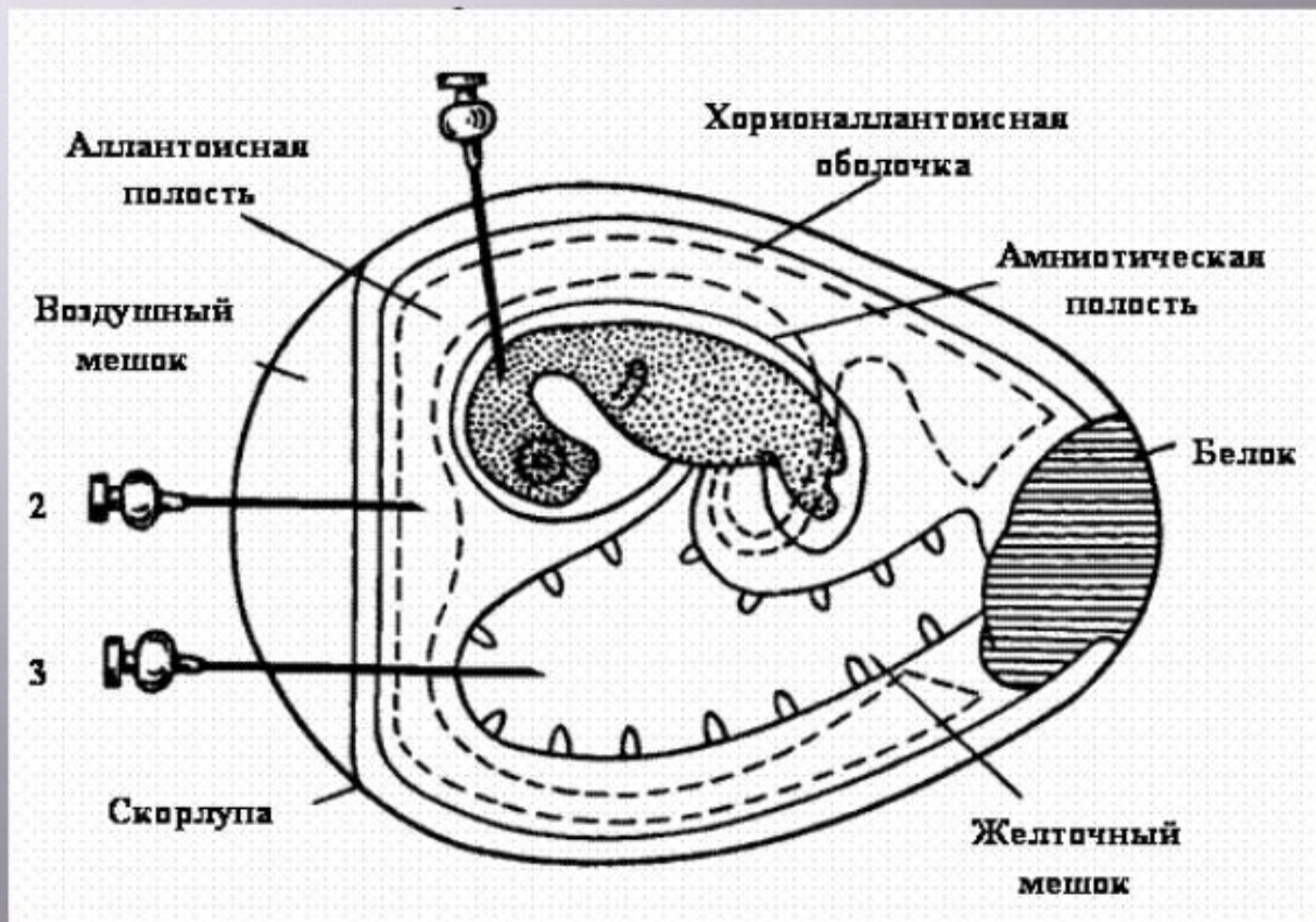
1-ый этап – накопление вирусов

- 1. В организме чувствительных лабораторных животных**
- 2. В куриных (реже – утиных) эмбрионах**
- 3. В клеточных культурах - основной метод**

Лабораторные животные: белые мыши, кролики, обезьяны



Куриный эмбрион

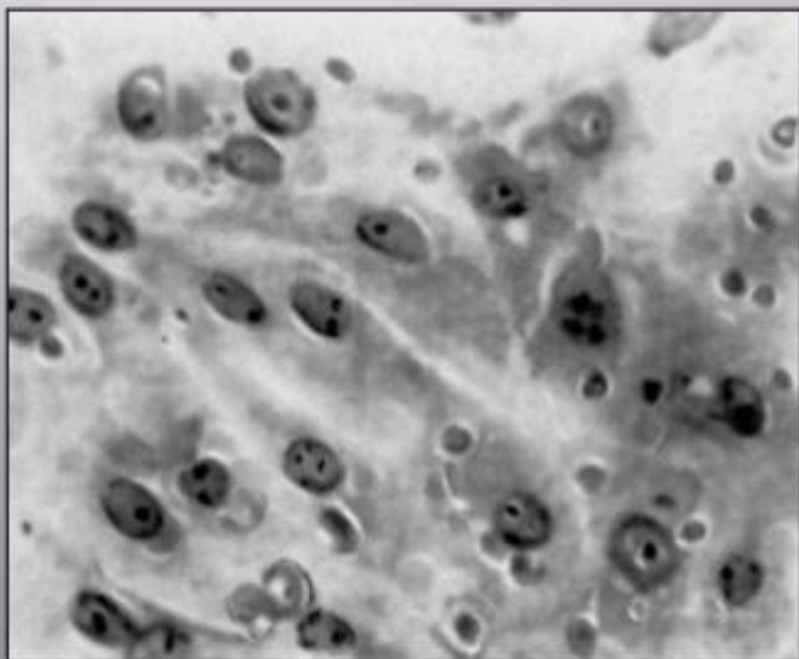


Типы однослойных клеточных культур

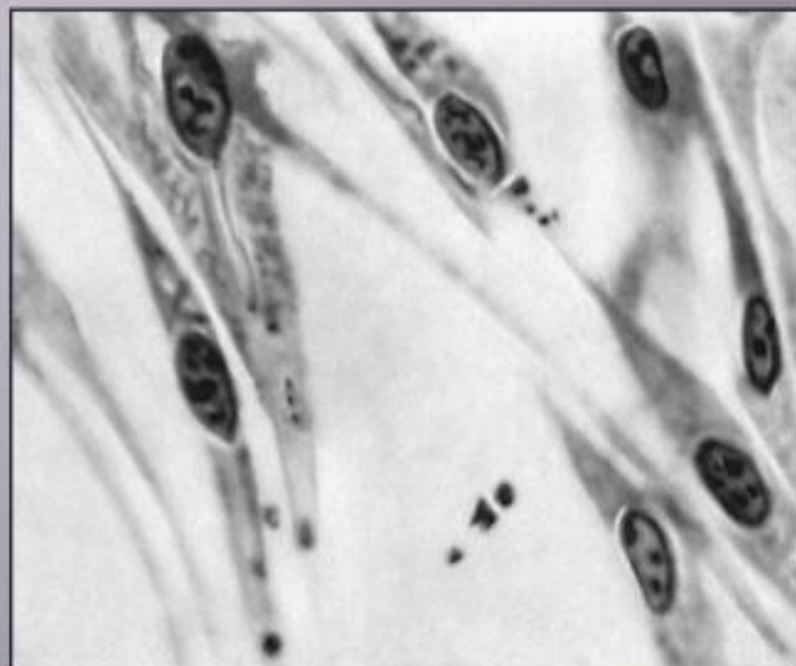
1. Первично-трипсинизированные (неперевиваемые)

получают из клеток различных тканей путем размельчения и трипсинизации. Используют однократно.

Например, фибробласты эмбриона курицы (ФЭК), человека (ФЭЧ), клетки почки различных животных.



Культура клеток почек



Культура фибробластов

Типы однослойных клеточных культур

2. Полуперевиваемые

культуры диплоидных клеток. Пригодны к повторному диспергированию и росту, выдерживают, как правило, не более 20 - 40 пассажей (теряют исходные свойства).

3. Перевиваемые

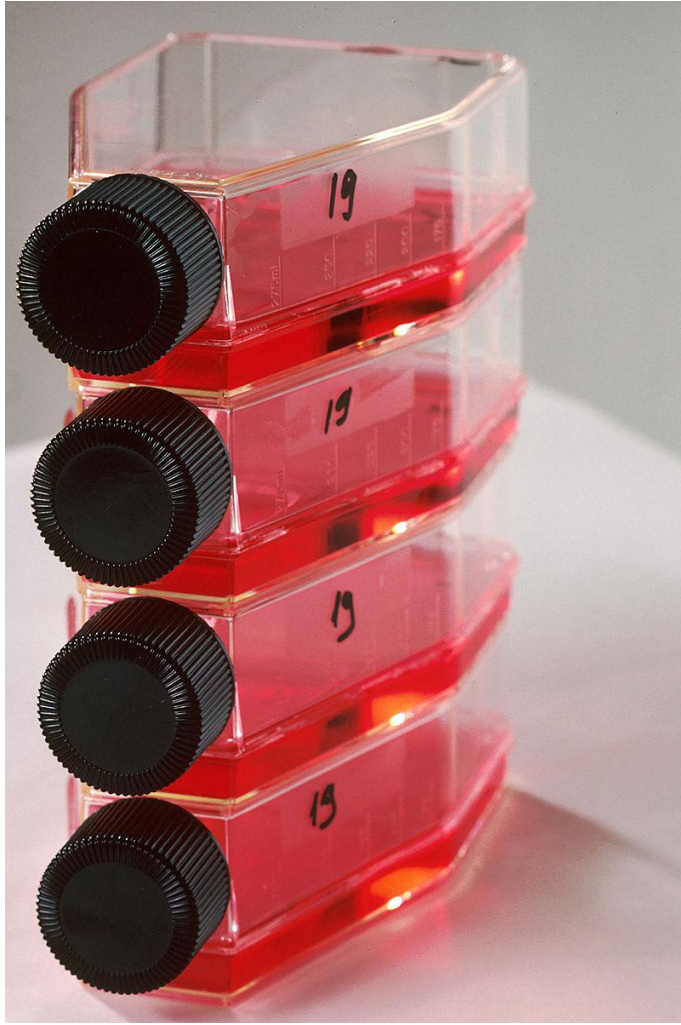
способны к многократному диспергированию и перевиванию, т.е. к многократным пассажам. Чаще всего получают из опухолевых клеток.

Перевиваемые культуры клеток

- ▣ **HeLa** — линия перевиваемых клеток, которая была получена в 1951 году из раковой опухоли шейки матки пациентки по имени Генриетта Лакс (англ. Henrietta Lacks), умершей от этого заболевания
- ▣ **Нер-2** — линия перевиваемых клеток рака гортани человека
- ▣ **Нер-3** — линия перевиваемых клеток лимфоидной карциномы человека
- ▣ **McCoу** — перевиваемая культура синовиальных клеток человека

Флаконы для культур клеток





Питательные среды для культур клеток

включают большой набор различных факторов роста:

- **среда 199** (66 компонентов)
- **среда Игла** (28 компонентов)
- **раствор Хенкса**



Кроме факторов роста в среды добавляют **индикатор (феноловый красный)**, который помогает контролировать жизнеспособность клеток:

живые клетки выделяют кислые продукты метаболизма, поэтому среда закисляется и приобретает **жёлтый цвет**. Это значит, что среду нужно поменять.

Если клетки гибнут, цвет среды остаётся **красным**.

2-ой этап - индикация вирусов

проводится на основе следующих феноменов:

- ▣ **цитопатическое действие (ЦПД) вирусов,**
- ▣ **образование внутриклеточных включений,**
- ▣ **образование бляшек,**
- ▣ **цветная проба Солка,**
- ▣ **реакция гемагглютинации,**
- ▣ **реакция гемадсорбции**

2-ой этап - индикация вирусов

проводится на основе следующих феноменов:

- ▣ **цитопатическое действие (ЦПД) вирусов,**
- ▣ **образование внутриклеточных включений,**
- ▣ **образование бляшек,**
- ▣ **цветная проба Солка,**
- ▣ **реакция гемагглютинации,**
- ▣ **реакция гемадсорбции**

▪ РЕАКЦИЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ВИРУСОВ

Интерференция вирусов – состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки, уже инфицированной вирусом.

Инфицирование одним вирусом полностью блокирует возможность репликации второго вируса в пределах одной клетки.

При индикации можно внести в культуру клеток дополнительный лабораторный штамм вируса, вызывающий характерное ЦПД. После этого ЦПД проявится только в случае отсутствия первоначального внесенного вируса в исследуемом материале.

▣ **Внутриклеточные включения**

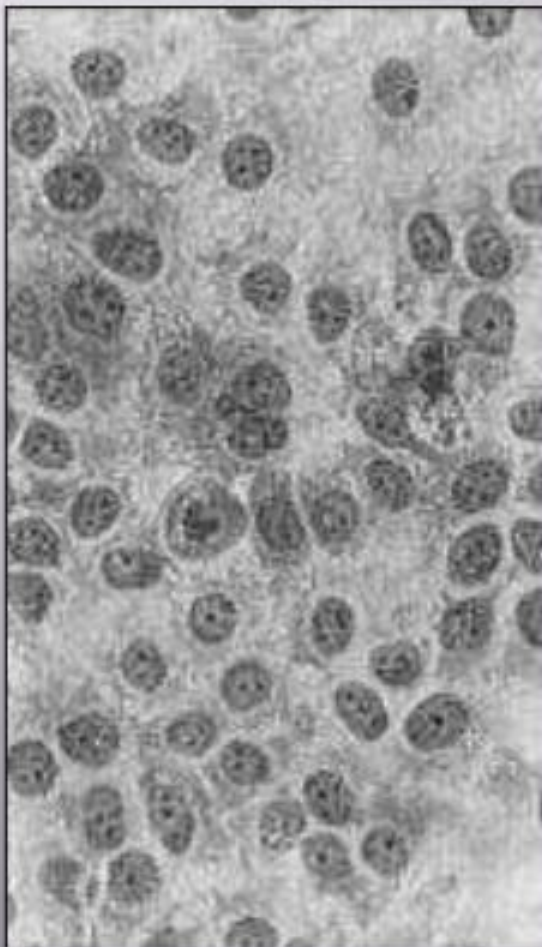
- скопления вирионов или отдельных их компонентов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые при микроскопии после специального окрашивания

▣ **Цитопатическое действие (ЦПД)**

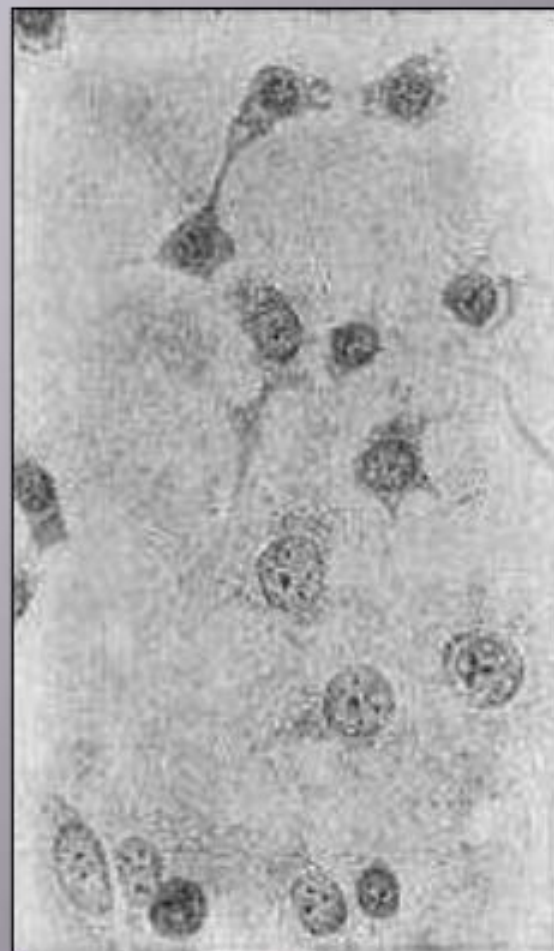
- видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы, изменение формы клеток, образование симпластов или синцития, вплоть до отторжения клеток от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов

ЦПД в культуре клеток HeLa

**ДО ЗАРАЖЕНИЯ
ВИРУСОМ**

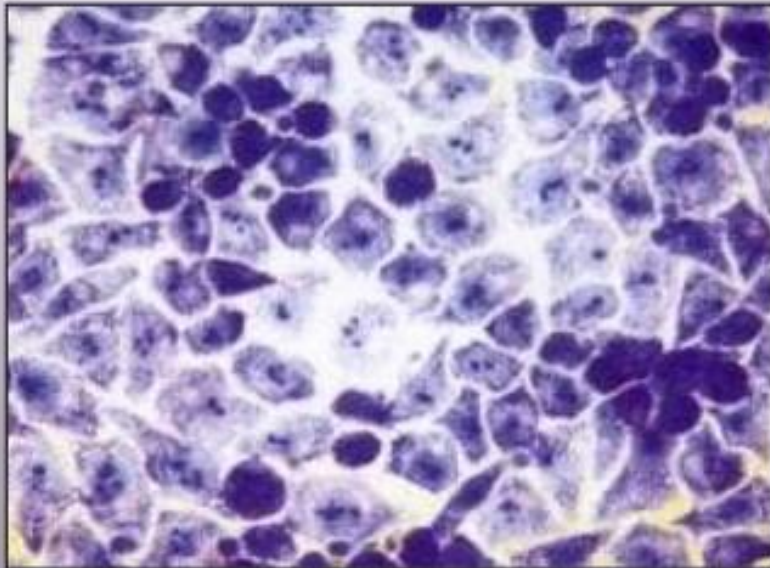


**НА 3-И СУТКИ ПОСЛЕ
ЗАРАЖЕНИЯ**

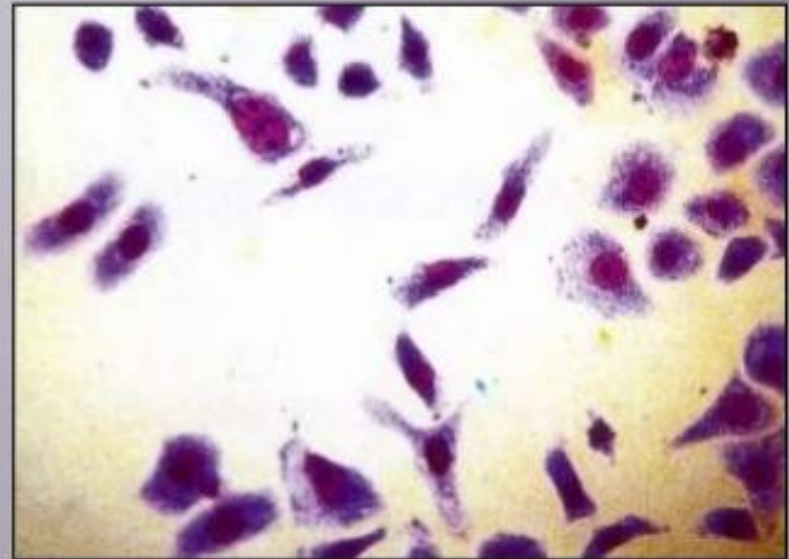


ЦПД в культуре клеток Нер-2

**ДО ЗАРАЖЕНИЯ
ВИРУСОМ**

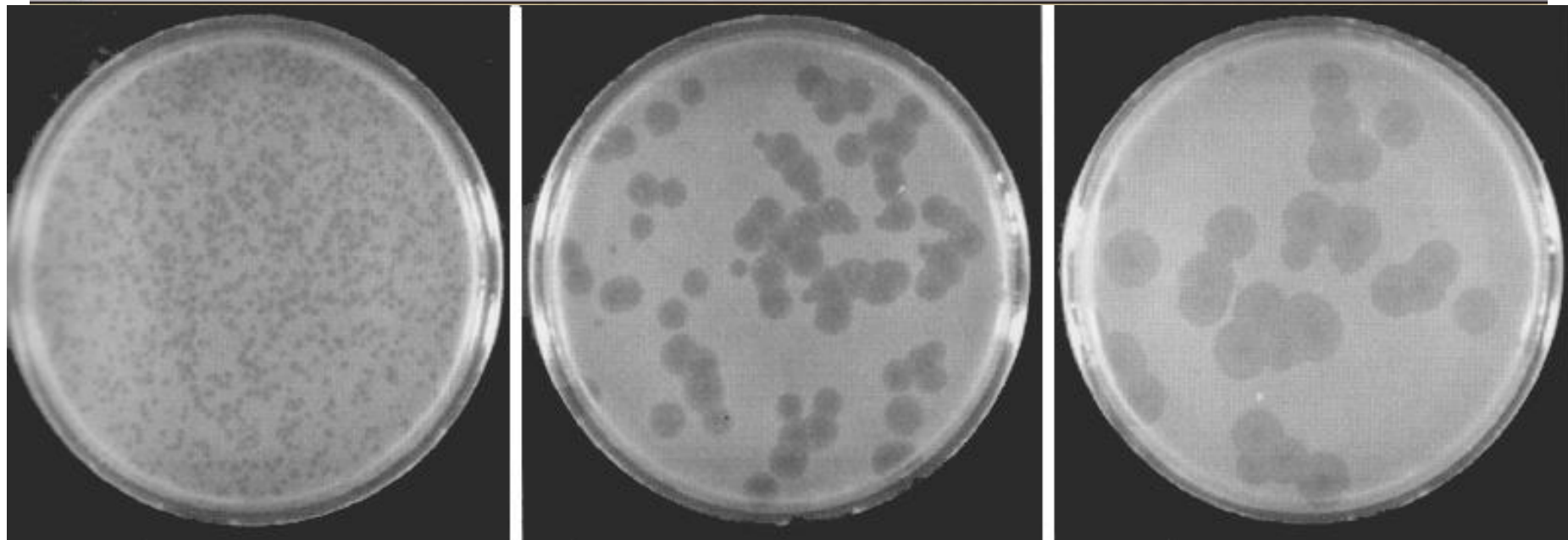


**НА 3-И СУТКИ ПОСЛЕ
ЗАРАЖЕНИЯ**



«Бляшки» или «негативные» колонии

культуру клеток заражают вирусом и покрывают тонким слоем агара. После инкубирования посевов в течение нескольких суток на агаровом покрытии появляются просветленные участки определенной формы (бляшки), представляющие собой участки погибших клеток в сплошном монослое клеточной культуры. Каждая бляшка образуется при размножении одной вирусной частицы и хорошо заметна в виде круглого светлого участка на красном фоне клеток, прижизненно окрашенных нейтральным красным.



«Цветная» проба Солка

оценивается по изменению цвета индикатора (**феноловый красный**), находящегося в питательной среде культивирования.

Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе метаболизма выделяют кислые продукты, что ведет к изменению рН среды и, соответственно, цвета индикатора (среда становится **желтой**).

При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет свой первоначальный цвет (**красный**).

Данная проба подходит к вирусам с коротким периодом репродукции.

ИНДИКАЦИЯ ВИРУСОВ ПО ЦВЕТНОЙ ПРОБЕ



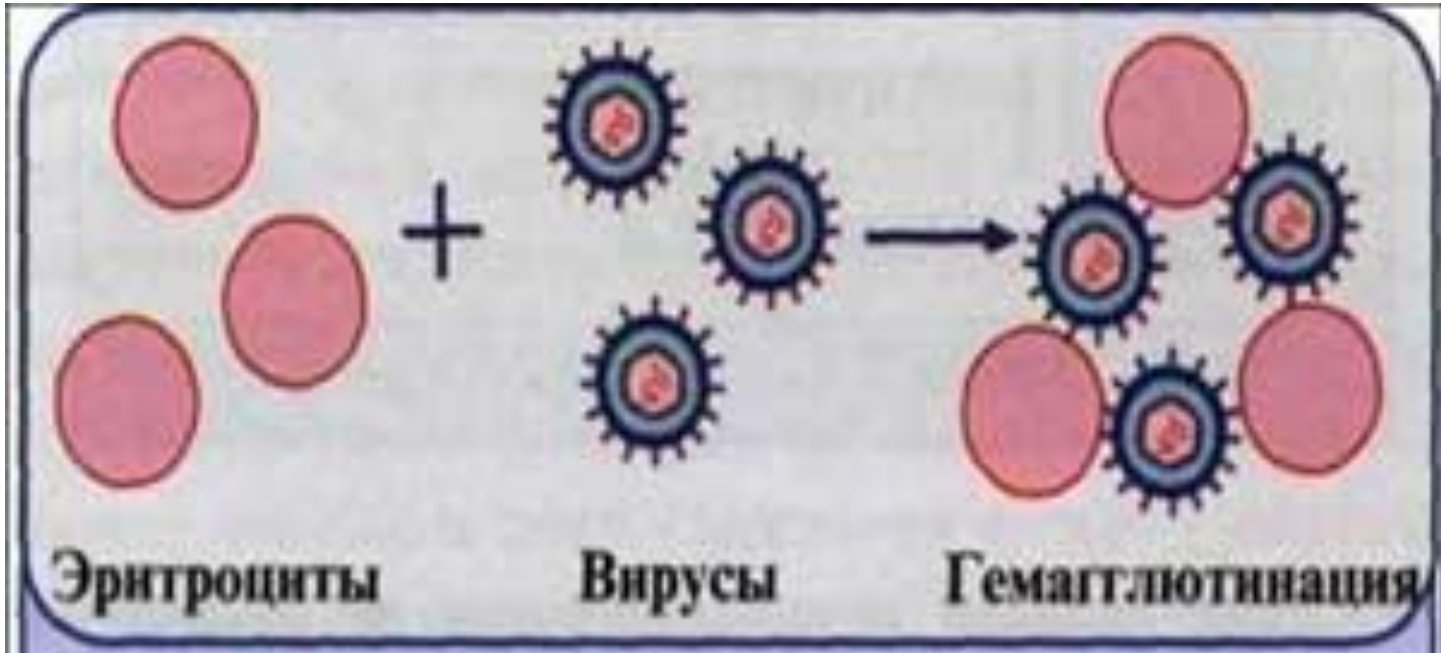
Внешний вид цветной пробы для индикации вирусов в исследуемом материале:

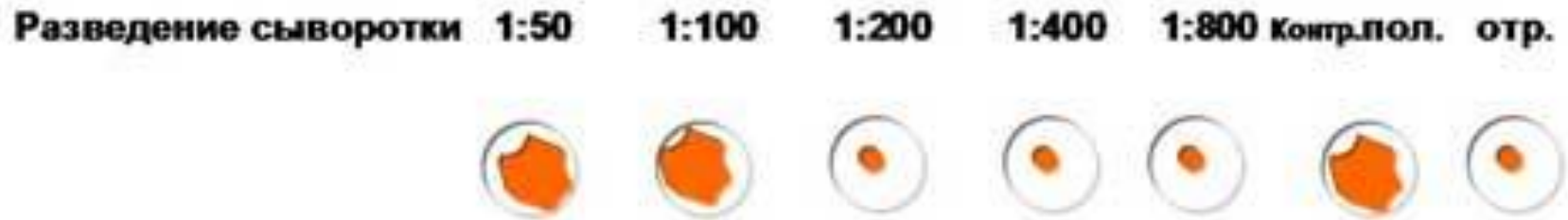
- в образцах 1 и 2 – цветная проба отрицательна, т.е. вирус отсутствует в исследуемом материале.
- в образце 3 – цветная проба положительна, т.е. индикатор показывает щелочную реакцию среды, означающую гибель клеточной культуры из-за репликации вируса

Реакция гемагглютинации (РГА)

- ▣ Используется только для индикации вирусов, содержащих **гемагглютинины**
- ▣ Ставится в лунках планшета
- ▣ Компоненты:
 - **жидкая питательная среда**, в которой культивировали культуру клеток,
 - **взвесь эритроцитов**
- ▣ Учет – по характеру осадка эритроцитов:
 - при наличии вируса с гемагглютинаинами – **“зонтик”**,
 - при отсутствии – **“пуговка”**.
- ▣ Если вирус обнаружен, то жидкость называется **вируссодержащей жидкостью (ВСЖ)**

Реакция гемагглютинации (РГА)





В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый **зонтик**),
в **отрицательном** - эритроциты оседают в виде **пуговки** или колечка.

Реакция гемадсорбции (РГАдс)

- ▣ Используется только для индикации вирусов, содержащих **гемагглютинины**
- ▣ Компоненты:
 - культура клеток
 - **взвесь эритроцитов** (наносится на клетки культуры), инкубация, промывка, окраска.
- ▣ Учёт – световая микроскопия
- ▣ При наличии вируса с гемагглютинаинами на поверхности клеток видны эритроциты, при отсутствии – эритроцитов нет.



3-ий этап – идентификация вирусов

▣ Идентификация вируса проводится по его АГ-ым свойствам – с использованием **специфических противовирусных сывороток.**

▣ Для идентификации используют:

➤ РТГА (только для вирусов с **гемагглютинаинами**)

➤ РСК

➤ ИФА

➤ РН с учётом:

❖ По нейтрализации ЦПД

❖ По нейтрализации инфекционной активности вируса

❖ По цветной пробе Солка

❖ По РТГадс

➤ РИФ

РТГА для идентификации вируса

▣ ставится в лунках планшета

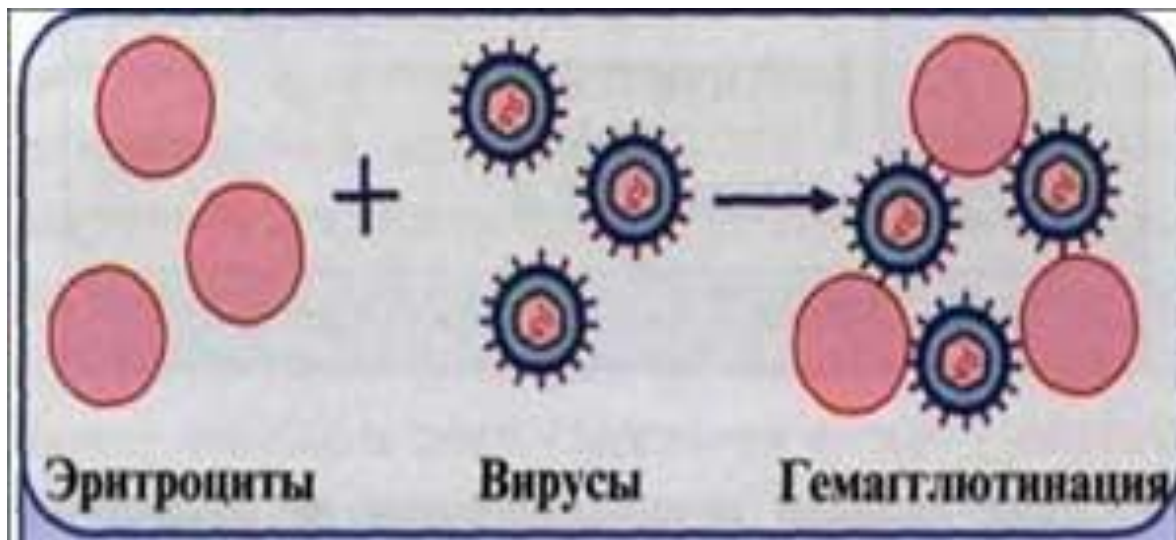
▣ компоненты реакции:

1. ВСЖ
2. специфическая противовирусная сыворотка
3. эритроциты

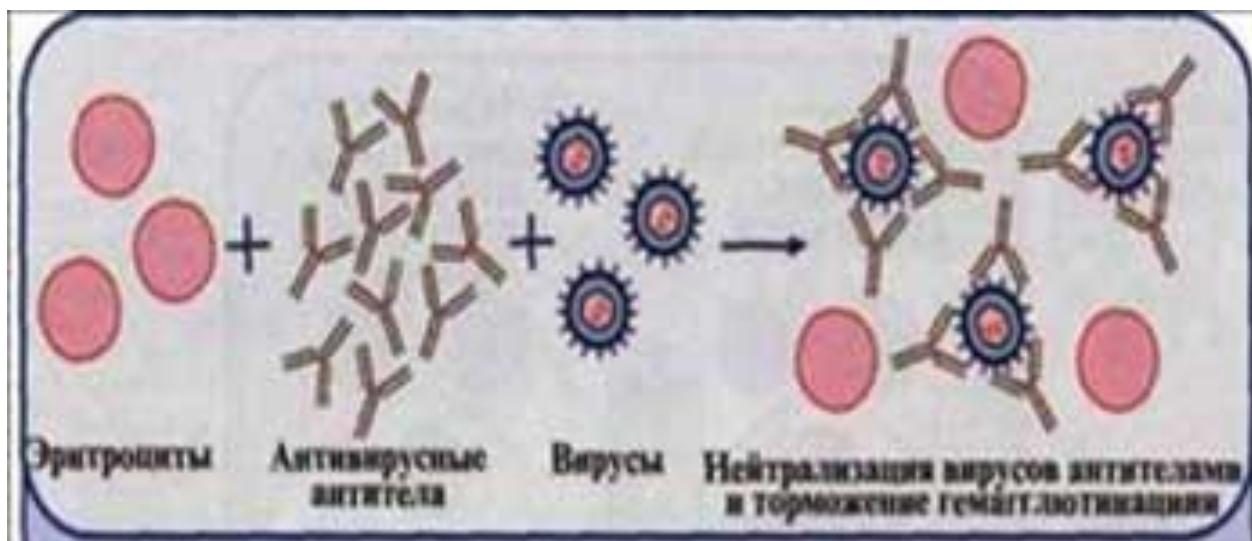
▣ Учет:

если сыворотка подходит к вирусу, то его гемагглютинины блокируются антителами, а значит не вызывают агглютинацию эритроцитов - осадок в виде **“пуговки”** (положительная реакция)

если сыворотка не подходит к вирусу, он агглютинирует эритроциты – осадок в виде **“зонтика”** (отрицательная реакция)



Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)



РСК для идентификации вируса

Комплемент — сложная система сывороточных протеинов.

Нестоек, разрушается при 55 градусах в течение 30 минут. При комнатной температуре комплемент разрушается в течение 2-х часов. Очень чувствителен к продолжительному встряхиванию, к действию кислот и ультрафиолетовых лучей. Но длительно (до шести месяцев) сохраняется в высушенном состоянии при низкой температуре.

Комплемент адсорбируется только на комплексе «антитело – антиген».

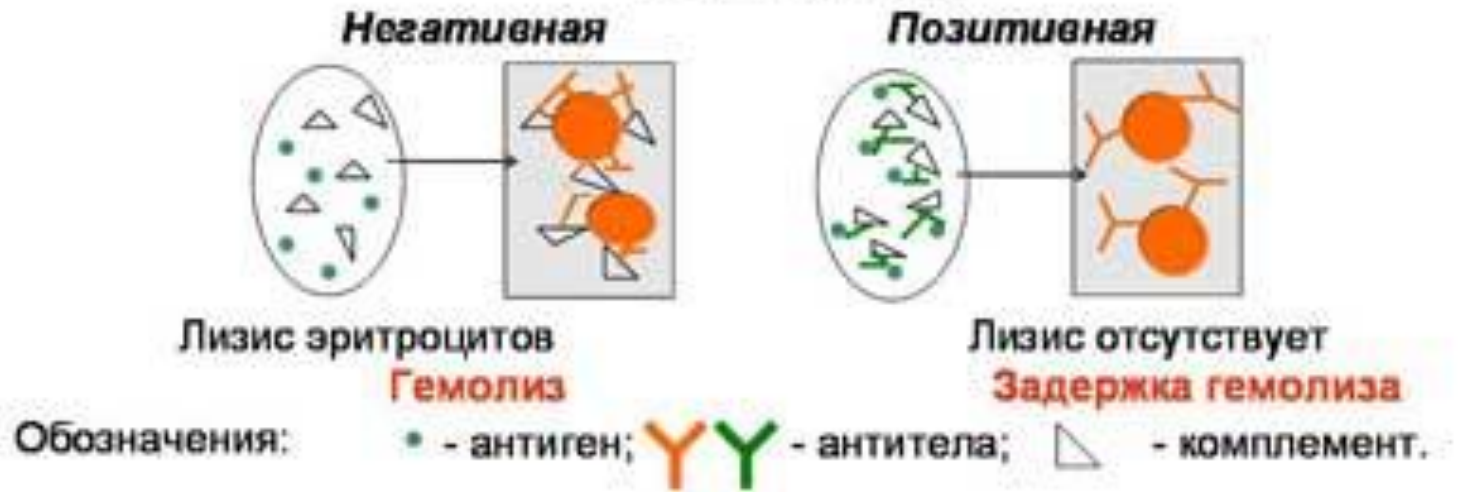
РСК для идентификации вируса

- ▣ ставится в пробирках
- ▣ компоненты реакции:
 1. ВСЖ
 2. специфическая противовирусная сыворотка
 3. комплемент
 4. для учета – индикаторная система: эритроциты барана и гемолитическая сыворотка
- ▣ Учет:

если сыворотка подходит к вирусу, то эритроциты барана выпадают **в осадок (положительная реакция)**;

если сыворотка не подходит к вирусу, то эритроциты барана лизируются (**лаковая кровь**) (**отрицательная реакция**)

РСК (схема)



Если образуется комплекс «антитело – антиген», адсорбирующий на себе комплемент, **реакция связывания комплемента положительна** и лизис эритроцитов в гемолитической (индикаторной) системе не произойдет.

Если комплекс «антиген – антитело» не образуется, то **реакция связывания комплемента отрицательная**, комплемент остается свободным, и при добавлении гемолитической системы наступает лизис эритроцитов.

ИФА для идентификации вируса

▣ ставится в лунках планшета

▣ компоненты реакции:

1. 1-ые АТ к вирусу

2. ВСЖ

3. 2-ые АТ к вирусу, меченные ферментом

4. субстрат, хромоген

▣ Учет:

если АТ подходят к вирусу, то образуется **“сэндвич-комплекс”**, и **меняется цвет раствора** в лунке (**положительная реакция**)

если АТ не подходят к вирусу, то комплекса не образуется, раствор в лунке остаётся **бесцветным** (**отрицательная реакция**)

РН для идентификации вируса

▣ компоненты реакции:

1. ВСЖ
2. специфическая противовирусная сыворотка (АТ)

▣ Учет:

➤ по нейтрализации ЦПД

ВСЖ+АТ добавляют к культуре клеток, инкубируют, микроскопируют.

Если сыворотка подходит к вирусу, то он нейтрализуется и не оказывает ЦПД на клетки (**реакция положительная**);

если сыворотка не подходит к вирусу, он не нейтрализуется и оказывает ЦПД на клетки (**реакция отрицательная**).

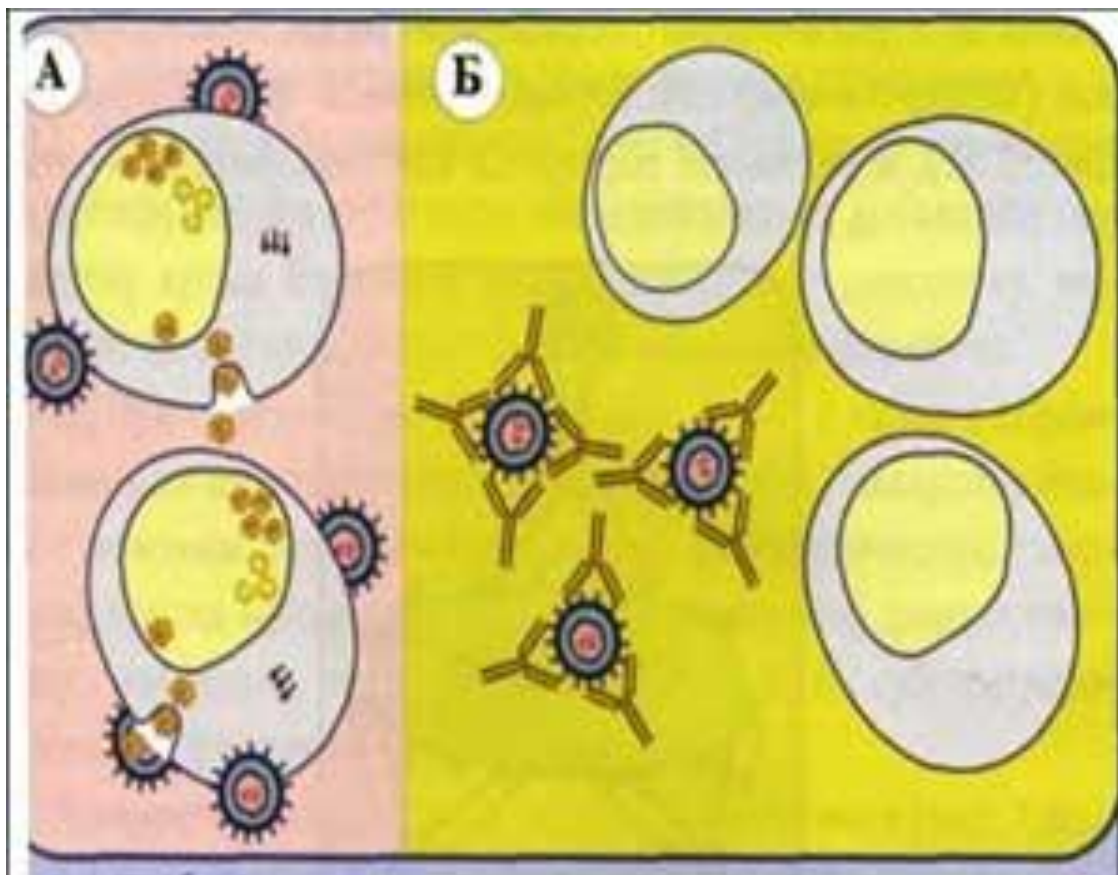
➤ по нейтрализации инфекционной активности вируса

ВСЖ+АТ вводят в организм лабораторного животного.

Если заболевание не развивается, значит сыворотка подходит к вирусу (**реакция положительная**);

если заболевание развивается, значит сыворотка не подходит к вирусу (**реакция отрицательная**).

Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток



А - цитопатогенное действие (ЦПД) в результате размножения вирусов;

Б - ЦПД отсутствует в результате предварительной нейтрализации вирусов антителами.

РИФ для идентификации вируса

▣ компоненты реакции:

1. культура клеток
2. специфическая противовирусная сыворотка, меченная ФИТЦ

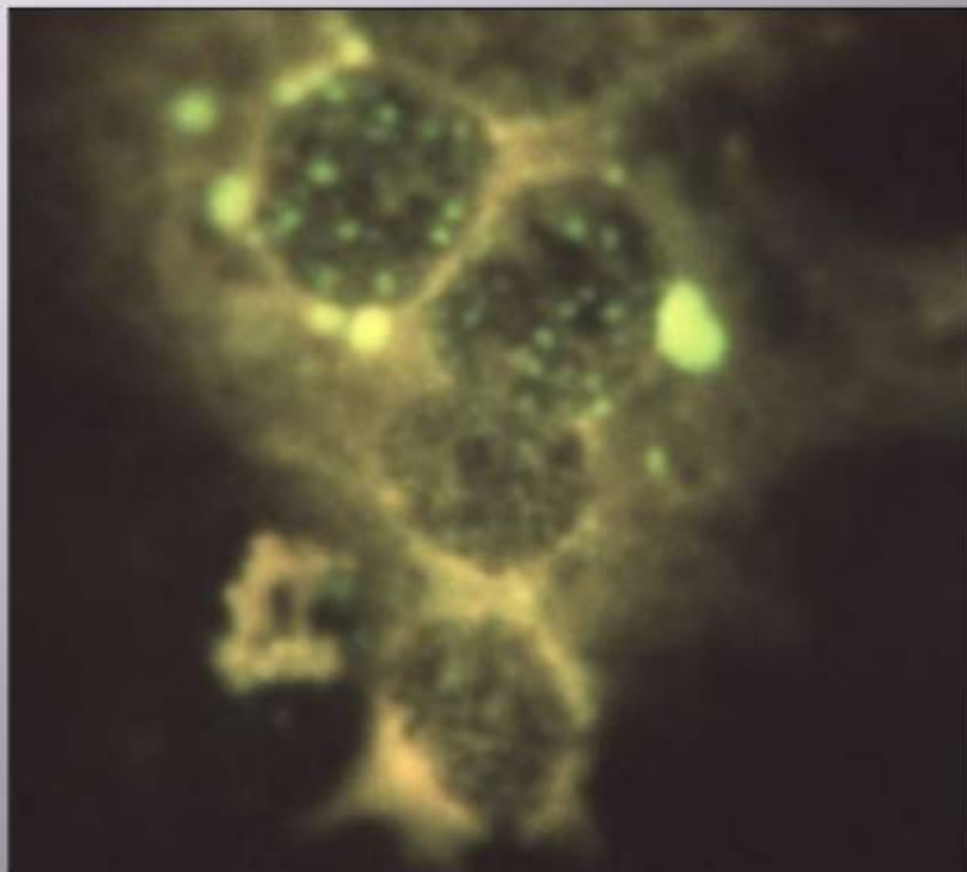
▣ Учет:

Если сыворотка подходит к вирусу, то наблюдается специфическое свечение клеток культуры в люминесцентном микроскопе (**реакция положительная**);

если сыворотка не подходит к вирусу, свечения не наблюдается (**реакция отрицательная**).

- ФИТЦ (изотиоцианат флуоресцеина)
(**зеленое свечение**)
- сульфохлорид родамина
(**красное свечение**)

**Культура клеток амниона человека,
заражённая вирусом кори (РИФ)**



III. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД (СЕРОДИАГНОСТИКА)

Реакции антигенов с антителами называются **серологическими** или гуморальными, т.к. участвующие в них специфические антитела всегда находятся в сыворотке крови. Эти реакции могут быть воспроизведены в лабораторных условиях с диагностической целью.

серотипирование (сероидентификация) антигена в целом с помощью известного антитела (*иммунной диагностической сыворотки*).

серодиагностика - определение природы антитела в сыворотке крови больного при вирусных, реже других инфекционных заболеваниях с помощью известного антигена (*диагностикума*).

Иммунные диагностические сыворотки - препараты, содержащие известные антитела для определения родовой, видовой и типовой принадлежности антигена.

Диагностикумы - препараты, содержащие известный антиген в виде взвеси живых или убитых бактерий, продуктов их расщепления, токсины, вирусы.