

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РС(Я)
ГБПОУ РС(Я) «ЯКУТСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»



ЛЕБЕДЕВА ГЛАФИРА АРКАДИЕВНА
ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРИ
Выпускная квалификационная работа
По специальности 31.02.03.Лабораторная диагностика

Студентка отделения «Лабораторная диагностика»

Группы ФЛ-19-1

Лебедева Г.А

Руководитель – преподаватель

Иларова Вера Иннокентьевна

Якутск – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. История возникновения кори	4
1.1. Общая характеристика кори.....	4
1.2. Клиническая картина кори.....	7
1.3. Лабораторная диагностика кори.....	10
Глава 2. Методы исследования кори.....	13
2.1 Сравнение коревой заболеваемости в Республике Саха (Якутия).....	26
2.2 Результаты исследования.....	28
Вывод	29
Заключение.....	31
Список использованной литературы.....	32

Введение

Корь – острое, высококонтагиозное, антропонозное вирусное заболевание, распространяющимся воздушно-капельным путем и проявляющееся общей интоксикацией, характерной макуло-папулезной сыпью на коже, катаром верхних дыхательных путей и конъюнктив.

Для лабораторной диагностики коревой вирусной инфекции практическое применение находят следующие методы: цитологическое исследование окрашенных мазков носового отделяемого; выделение вируса в культуре ткани; исследование сыворотки больного на наличие антител (нейтрализующих, комплементсвязывающих и подавляющих гемагглютинацию).

Актуальность: Корь, по мнению многих специалистов, является распространённым заболеванием в мире. Это объясняется высококонтагиозностью данного заболевания в условиях закрытого учреждения (детский сад, школа, интернат), загрязнением окружающей среды, неправильным образом жизни, нерациональным питанием. В большинстве случаев, вирус кори поражает детский организм, поэтому корь у детей встречается чаще всего.

Цель: Изучить общую характеристику кори, методы лабораторного исследования кори.

Задачи:

1. Изучить понятие, причину и общую характеристику кори
2. Выявить основные лабораторные исследования кори
3. Составить статистику и сравнить заболеваемость с другими регионами дальнего востока

Глава 1

1. История возникновения кори

Корь известна с древних времен. В IX веке н. э. описана арабским врачом Разесом, который считал ее легкой формой натуральной оспы. Поэтому она получила название morbilli — малая болезнь, в отличие от morbus — оспа (большая болезнь). В XVII веке подробное описание клиники кори в Англии дал Сиденхем (Т. Sydenham) и Мортон (Th. Morton) во Франции. Вирусную этиологию кори в 1911 г. доказали Андерсон (Т. Anderson) и Голдбергер (J. Goldberger) путем заражения обезьян фильтратом крови и носоглоточной слизи больных людей, но культура возбудителя была выделена только в 1954 г. Эндерсом (J. Enders).

Корь в средние века и в начале XX века была одной из самых распространенных детских инфекционных болезней, которая характеризовалась тяжелым течением и летальностью среди детей до трех лет до 40%. При заносе кори на изолированные территории (Фарерские острова, Фиджи) переболело до 80% населения. Снижение летальности было достигнуто благодаря разработке метода серопротекции в 1916–1921 гг. Николем (Ch. Nikolle), Консейлом (E. Conseil) и Дедквитцем (R. Dedkwitz). Широкое применение противокоревой вакцины привело к резкому снижению заболеваемости и даже ее ликвидации в ряде стран. Однако в последние годы наблюдаются случаи заболевания среди вакцинированных. По данным ВОЗ в мире регистрируется ежегодно до 30 млн случаев кори, из которых около 50 тыс. заканчиваются летально.

1.1 Общая характеристика кори

Корь — острое, высококонтагиозное, антропозное вирусное заболевание, распространяющееся воздушно — капельным путем и

проявляющееся общей интоксикацией, характерной макуло – папулезной сыпью на коже, катаром верхних дыхательных путей и конъюнктив.

Таксономическое положение. Возбудитель кори (measles morbillivirus – MeV) относится к РНК – содержащим вирусам порядка Mononegavirales семейства Paramyxoviridae рода Morbillivirus. В состав этого рода включено 7 видов, из которых патогенным для человека является только возбудитель кори, остальные представители этого рода поражают животных.

Вирус кори имеет один серотип и более 20 генотипов. При персистировании вируса кори в ЦНС человека он вызывает развитие подострого склерозирующего панэнцефалита (ПСПЭ).

Структура вируса. Морфология вируса кори типична для парамиксовирусов: вирион сферической формы, диаметр вириона составляет 150-250 нм, снаружи вирион покрыт липопротеиновым суперкапсидом с шипами длиной до 8 нм.

Геном вируса кори представляет собой одноцепочную нефрагментированную молекулу минус-РНК. В геноме вируса закодирована информация о 6 структурных белках: N, P, M, F, H, и L.

Снаружи вирусная частица имеет суперкапсид – липидный бислой. В состав суперкапсида включены белки H (гемагглютинин) и F (белок слияния), образующие на поверхности оболочки шипы. Изнутри к суперкапсиду прилегает матриксный белок M. В центре вирусной частицы располагается нуклеокапсид спирального типа симметрии. В состав нуклеокапсида входит нуклеопротеин (белок N), фосфопротеин (P-белок) и L-белок. Белки P и L ассоциированы с РНК-зависимой РНК-полимеразой. Вирус кори обладает гемагглютинирующей и гемолитической активностью. Нейраминидаза отсутствует.

Возбудитель кори относится к роду morbillivirus, семейства парамиксовирусов, имеет сферическую форму, диаметр 120–250 нм, одноцепочечную РНК. Вирион окружен двухслойной липопротеиновой оболочкой. Вирус имеет три основных антигена — гемагглютинин, протеин F и нуклеокапсидный белок, причем антитела к гемагглютинину и протеину F обладают цитотоксическим действием в отношении инфицированных вирусом клеток. Возбудитель кори является индуктором интерферона, антигенно однороден. Некоторые варианты вируса способны к длительной персистенции в организме человека. Вирус кори неустойчив во внешней среде и быстро погибает под воздействием солнечного света и УФ-облучения. При низких температурах может сохраняться в течение нескольких недель, при температуре более 60 °С погибает мгновенно. При комнатной температуре вирус сохраняется в течение 3–4 часов

Эпидемиология. Вирус попадает от больного человека воздушно – капельным путем при чихании и кашле. После непродолжительного размножения вируса в слизистой оболочке ворот инфекции происходит первичная кратковременная виремия – вирус попадает в кровь.

С током крови вирус попадает в лимфоидную ткань и там активно размножается, особенно в моноцитах. После этого наступает вторичная виремия, совпадающая с продромальным периодом и широкой десиминацией вируса – в это время вирус можно обнаружить практически во всех тканях тела, в слизи, крови и в моче.

Это примерно 9 – 10 день заболевания, сыпи еще в это время нет. Сыпь появляется примерно в 14 день от заражения, к этому времени процессы репродукции вируса снижается, и к 16 суткам вирус определить сложно. По данным отечественных авторов (П.Г.Сергиев, И.Г.Шройт, Н.Е. Рязанцева, 1963) вирусы исчезают из крови после высыпания через 4 – 5 дней.

С этого времени в лёгкой форме заболевание проходит, но в случае присоединения вторичной бактериальной инфекции через короткий светлый промежуток наступает ухудшение. Вирус кори резко расслабляет защитные силы организма приводя к состоянию гипоэргии с понижением общего местного иммунитета открывая путь для бактериальной инфекции.

1.2 Клиническая картина кори

Инкубационный период кори продолжается 1-2 недели, в случаях введения иммуноглобулина удлиняется до 3-4 недель. Типичное течение кори происходит с последовательной сменой трех стадий: катаральной, высыпаний и реконвалесценции. Катаральный период начинается с подъема температуры и развития признаков общей интоксикации. Лихорадка может достигать крайне высоких цифр, больные жалуются на интенсивную головную боль, бессоницу, озноб, выраженную слабость. У детей симптоматика интоксикации в значительной степени сглажена.

На фоне интоксикационного синдрома в первые же дни появляется сухой кашель, отмечается слизисто-гнойная ринорея, конъюнктивит (сопровождается интенсивным отеком век) с гнойным отделяемым, светобоязнь. У детей выражена гиперемия зева, зернистость задней стенки глотки, лицо одутловатое. У взрослых катаральные признаки слабее выражены, но может иметь место регионарный лимфаденит (поражаются в основном шейные лимфоузлы). Аускультация легких отмечает жесткое дыхание и сухие хрипы. Иногда заболевание сопровождается послаблением кишечной деятельности, тошнота, рвота, изжога, отрыжка.

Первая лихорадочная волна обычно составляет 3-5 дней, после чего температура тела снижается. На следующий день вновь происходит подъем температуры и усугубление интоксикации и катаральных явлений, а на слизистой оболочке щек отмечаются пятна Филатова-Коплика-Вельского –

специфический клинический признак кори. Пятна располагаются на внутренней поверхности щек напротив малых коренных зубов (иногда переходя на слизистую десен), представляют собой немного приподнятые над поверхностью белые участки, окруженные тонкой полоской гиперемизированной слизистой (вид «манной каши»). Как правило, при появлении сыпи эти пятна исчезают, у взрослых могут сохраняться в течение первых дней периода высыпаний. Одновременно или чуть ранее, чем пятна Филатова-Коплика-Вельского, на мягком и, частично, твердом нёбе появляется энантема, представляющая собой красные пятна с булавочную головку неправильной формы. Спустя 1-2 дня они сливаются и перестают выделяться на фоне общей гиперемии слизистой.

Общая продолжительность катарального периода составляет 3-5 дней у детей и около недели у взрослых. После чего наступает период высыпания. Сыпь при кори первоначально образуется на волосистой части головы и за ушами, распространяется на лицо и шею. Ко второму дню высыпания покрывают туловище и плечи. На третьи сутки сыпь покрывает конечности и начинает бледнеть на лице. Такая последовательность высыпаний характерна для кори, является значимым для дифференциальной диагностики признаком.

Коревая сыпь представляет собой яркую пятнисто-папулезную экзантему, склонную к формированию сливных фигурных групп с промежутками неизменных кожных покровов. Сыпь у взрослых более выражена, чем у детей, при тяжелом течении может приобретать геморрагический характер. В периоде высыпаний усиливается катаральная симптоматика и усугубляется лихорадка и интоксикация.

Период реконвалесценции наступает спустя 7-10 дней после начала заболевания (у взрослых продолжительность кори больше), клиническая симптоматика стихает, температура тела нормализуется, элементы сыпи регрессируют (аналогично порядку появления), оставляя после себя светло-коричневые участки повышенной пигментации, исчезающие спустя 5-7 дней.

На месте пигментации некоторое время остается отрубевидное шелушение (в особенности на лице). В периоде реконвалесценции имеет место снижение иммунных факторов защиты организма.

Митигированная корь представляет собой атипичную клиническую форму инфекции, встречающуюся у пассивно или активно иммунизированных лиц, либо ранее переболевших корью. Отличается более продолжительным инкубационным периодом, слабовыраженной или отсутствующей симптоматикой интоксикации и укороченным периодом катаральных проявлений. Отмечается типичная для кори экзантема, но высыпаниям могут появляться сразу на всех участках тела либо в обратной (восходящей от конечностей к лицу) последовательности. Часто не выявляются пятна Филатова-Коплика-Вельского.

Еще одной атипичной формой является abortивная корь – начало ее такое же, как и в обычных случаях, но спустя 1-2 дня симптоматика стихает, сыпь распространяется на лице и туловище, после чего регрессирует. Лихорадка при abortивной форме обычно имеет место только в первый день высыпаний. Иногда с помощью серологических методик выявляются субклинические формы кори.

Корь чаще всего осложняется вторичной бактериальной пневмонией. У детей раннего возраста возникающие воспаления гортани и бронхов иногда приводят к развитию ложного крупа, угрожающего асфикцией. Иногда отмечаются стоматиты.

У взрослых корь может способствовать развитию менингитов и менингоэнцефалитов, а также полиневритов. Редкое, но довольно опасное осложнение – коревой энцефалит. В настоящее время имеет место теория развития аутоиммунных заболеваний, согласно которой, вирус кори может принимать участие в патогенезе этих состояний.

1.3 Лабораторная диагностика кори

Исследуемым материалом для диагностики служат смыв с носоглотки, соскобы с элементов сыпи, кровь, моча.

Смыв из носоглотки используется главным образом для выделения вирусов при энтеровирусной инфекции, гриппе, парагриппе и других вирусных инфекциях. Производятся они в первые дни болезни, когда возбудитель интенсивно размножается в эпителиальных клетках дыхательных путей. Больному предлагают прополоскать горло стерильным физиологическим раствором. Процедуру повторяют трижды, используя при этом каждый раз по 10-15 мл жидкости. Смывы собирают широкогорлую стерильную банку, кусочками стерильной ваты, захваченной пинцетом, протирают заднюю стенку глотки и носовые ходы. Ватные тампоны также опускают в банку со смывом. Материал направляют в лабораторию для последующего изучения (вирусологический, иммунофлюоресцентный и другие методы исследования)

Соскобы с элементов сыпи. Необходимый участок кожи фиксируется пальцами, наносится на кожу масло. По направлению роста волос врач скоблит лезвием. Образцы выкладываются на стекло. Все взятые образцы (чешуйки, папулы, гнойные выделения, везикулы) помещают на стекло с несколькими каплями раствора глицерина, закрывают покровным стеклом и направляют в лабораторию.

Для забора образца биоматериала выбирают вены предплечья – в этой части кровеносные сосуды расположены поверхностно, видны под кожными покровами и малоподвижны. Кровь чаще всего отбирают из локтевой, лучевой, срединной и наружной поверхностной вен. При выполнении процедуры медицинская сестра соблюдает строгий алгоритм действий:

1. Надевает перчатки.
2. Выбирает место укола.
3. Накладывает жгут.

4. Просит пациента совершить движения кистью – это необходимо для наполнения вен кровью.

5. Тщательно пальпирует вену, из которой будет отбирать пробу на анализ.

6. Место укола обрабатывает ватным тампоном, смоченным 70% спиртом.

7. Вводит иглу косым срезом вверх под углом 45° к кожным покровам на $1/3$ в просвет кровеносного сосуда.

8. После изъятия достаточного количества биологической жидкости, снимает жгут, вынимает иглу и прикладывает к месту укола антисептическое средство.

9. Просит пациента согнуть руку в локте и прижать место инъекции.

Для общего анализа мочи, как правило, собирают первую утреннюю порцию мочи. Сначала выпускают небольшое количество мочи в унитаз, затем, не прерывая мочеиспускания, подставляют емкость и собирают примерно 50 мл мочи. При этом необходимо следить, чтобы контейнер не касался кожи и слизистых.

После сбора мочи нужно плотно закрыть контейнер завинчивающейся крышкой.

Для лабораторной диагностики коревой вирусной инфекции практическое применение находят следующие методы:

1. Вирусологический метод – выделение возбудителя из носоглотки за 3 дня до появления симптомов и по 1 дню сыпи.
2. Серологический метод – направлены на обнаружение антител к вирусу и его антигенных компонентов.
3. ИФА (иммуноферментный анализ) – обнаружение специфических иммуноглобулинов IgM (указывают на острый коревой процесс) и IgG (указывают на перенесенное раннее заболевание и сохранившийся иммунитет)

4. РТГА (реакция торможение гемагглютинации) – сначала берут кровь в катаральном периоде или в 1-ые 3 дня с момента появления сыпи, и повторно берут кровь через 14 дней – результаты сравнивают и смотрят на нарастание титра антител.

Глава 2.

2. Метод исследования кори

1. Вирусологическое исследование – выделение чистых культур вирусов с использованием культур клеток или куриных эмбрионов, с последующим их типированием.

Использование куриных эмбрионов

В вирусологической практике куриные эмбрионы нашли широкое применение для выделения вируса из патологического материала. Существенное преимущество этого метода – высокая бактериологическая чистота получаемых вирусных суспензий, так как замкнутая полость яйца служит надёжной защитой от различной микрофлоры. Куриные эмбрионы пригодны для культивирования многих вирусов, патогенных для человека и животных. Они дешёвы, удобны и доступны для работы большинства практических лабораторий.

Для вирусологических исследований используют яйца, полученные из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням птиц. Для инкубации яйца помещают в специальные инкубаторы с температурой 37,5-38 С и относительной влажностью воздуха 40-70%. Продолжительность инкубирования куриных эмбрионов определяется избранным методом введения вирусосодержащего материала. Чаще всего в работе используются 7-12-дневные куриные эмбрионы.

Строение куриного эмбриона.

Развитие оплодотворенного яйца начинается с образования трёх зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы. Из экто- и мезодермы возникает амниотическая полость. Амниотическая полость заполнена жидкостью (1мл).

Из экто- и мезодермы кроме амниона образуется хорион, который к 10-му дню обволакивает все содержимое яйца, образуя периферическую поверхность хориоаллантаисной оболочки. Внутренняя поверхность аллантаисной оболочки образуется из энтодермы на 3-й день развития эмбриона. Пространство между хориоаллантаисной и аллантаисной оболочкой, покрывающей амнион, заполнено аллантаисной жидкостью. Основным резервуар питательных веществ для зародыша – желточный мешок.

Методы заражения куриных эмбрионов.

Выбор методов заражения куриных эмбрионов зависит от биологических свойств исследуемого вируса. В вирусологической практике широкое применение нашло заражение на хориоаллантаисную оболочку, в аллантаисную полость и в желточный мешок.

Заражение на хориоаллантаисную оболочку.

Используют 10-12 – дневные куриные эмбрионы, инкубированные в горизонтальном положении. Поверхность яйца дезинфицируют спиртом, 2% раствором йода, прожигают. На скорлупе выпиливают треугольник (5-6мм). Иглой надрывают подскорлупную оболочку. На обнажённую хориоаллантаисную оболочку пастеровской пипеткой наносят 0,1 мл вирусосодержащего материала. Отверстия на скорлупе закрывают парафином.

Заражение в аллантаисную полость.

Используют 9-11 – дневные эмбрионы, когда аллантаисной жидкости содержится больше всего. Скорлупу дезинфицируют спиртом, 2% раствором йода, прожигают. Яйцо помещают вертикально тупым концом вверх. Над центром воздушного мешка делают прокол скорлупы и через него вводят иглу диаметром 0,5 мм и длиной 5 см на глубину 3-5 см. Инокулируют

исследуемый материал в количестве 0,1 мл. Место инъекции закрывают парафином. Яйца инкубируют в вертикальном положении при 35 С 24-72 ч.

Заражение в амниотическую полость.

Используют 10-11-дневные эмбрионы, которые близко расположены к воздушному пространству. Заражение производят в затемненном помещении под овоскопом. Тупой конец яйца дезинфицируют, в скорлупе делают отверстие над воздушной камерой. Для заражения используют иглу диаметром 0,6мм. Материал вводят в количестве 0,1 мл. Отверстие закрывают парафином. Зараженные яйца инкубируют при 37С 24-72ч.

Заражение в желточный мешок.

Используют 5-6-дневные эмбрионы, т.к. в этот период желточный мешок имеет самый большой объем. Скорлупу дезинфицируют, делают в ней отверстие. Для заражения используют иглу длиной 5см, которую вводят вертикально до упора. Игла прокалывает хорионаллантоисную оболочку, проходит через аллантоисную полость и через стенку желточного мешка в желток. Место инъекции закрывают парафином. Яйца инкубируют при 37С 72 ч.

Использование клеточных культур

Культуры клеток – это клетки ткани, выращенные вне организма на специальной питательной среде. Клетки ткани в искусственных условиях сохраняют присущий им обмен и восприимчивость к определенным вирусам.

Для выращивания клеточных культур необходимы среды, которые должны иметь солевой состав, близкий клеткам организма, определенное значение рН, содержать питательные вещества и факторы роста.

В диагностической работе вирусологических лабораторий широко применяются следующие клеточные культуры: первично-трипсинизированные, перевиваемые и полуперевиваемые.

Первично-трипсинизированные культуры клеток.

Первично-трипсинизированные культуры клеток – это растущие однослойные культуры клеток, полученные посредством ферментативной дезагрегации органов и тканей. Первичные культуры получают из клеток различных тканей чаще путем их размельчения и трипсинизации, используют однократно, т.е. постоянно необходимо иметь соответствующие органы или ткани.

Перевиваемые культуры клеток.

Перевиваемые культуры клеток получают из небластических и нормальных тканей и органов человека или животных. Они имеют измененный кариотип и обладают способностью бесконечно перевиваться *in vitro*.

Перевиваемые культуры выращивают в виде суспензии или однослойных культур на поверхности стекла в культурных сосудах.

Получение субкультур или перевивание клеток проводят следующим образом.

Снятие клеточного слоя. Растущие клетки довольно прочно прикрепляются к поверхности стекла под слоем питательной среды. Снять их можно механическим путём (соскоб), или воздействием 0,02% раствора версена, или 0,25% раствором трипсина.

Из сосудов с выросшим клеточным монослоем сливают питательную среду, добавляют в них подогретый до 37С раствор версена (в количестве вдвое меньшем, чем было среды) и выдерживают в термостате 20-30 минут,

при этом сосуд несколько раз покачивают. Версен связывает двухвалентные катионы магния и кальция, в результате ткань разделяется на отдельные клетки и отслаивается от стекла.

Отделение клеток от диспергирующего вещества. Взвесь клеток в диспергирующем веществе (в версене) помещают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 800-1000 об/мин в течение 7-10 минут. Надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток ресуспендируют в небольшом количестве питательной среды. Затем берут 1-2 мл клеточной взвеси и подсчитывают клетки.

Посев клеток. После подсчёта клеток в 1 мл исходную клеточную взвесь разводят питательной средой до нужной концентрации. При этом учитывают добавление к общему объему среды стерильной сыворотки крупного рогатого скота в количестве 10%. Подготовленную взвесь вносят при помешивании в специально подготовленную для культивирования клеток посуду и закрывают резиновыми пробками. Посевная доза клеток в пробирке по 80-100 тыс. в 1 мл; в сосуды с плоской поверхностью – 25-30 тыс. на 1 см полезной площади сосуда.

Засеянные клетки выращивают в термостате при температуре 37С в течение 3-4 суток.

Перевиваемые штаммы клеток обычно пересеваются через каждые 6-7 дней.

Заражение клеточных культур вирусом. Проводят в стерильном боксе. Перед заражением все клеточные культуры микроскопируют и отбирают пробирки или матрацы только с хорошим, типичным монослоем. Культуры с неполным монослоем, с признаками дегенерации клеток или с нетипичным клеточным ростом бракуют.

В качестве вирусосодержащего материала для заражения клеток используют фильтраты (прошедшие через бактериальный фильтр) или свежесвятый (в стерильных условиях) нативный материал с добавлением антибиотиков. Заражать ткани можно пассажным вирусом на культуре ткани. В этом случае используют от культур с типичным для данного вируса цитопатогенным эффектом.

Методика заражения. Из отобранных культур отсасывают или сливают питательную среду. Часть культур (не менее четырёх) оставляют в качестве контроля; в них вносят по 0,1 мл свежей питательной среды без сыворотки. В другие 4-6 пробирок с клеточным монослоем вносят по 0,1 мл вирусосодержащего материала. Все культуры в пробирках (контрольные и опытные) помещают в термостат и выдерживают при температуре 37С 20-30 минут. Затем в них добавляют по 0,9 мл питательной среды без сыворотки, ставят в термостат и ежедневно наблюдают за ними, сравнивая под микроскопом опытные культуры клеток с контрольными.

Необходимо иметь в виду, что при внесении вируса и при последующем его выращивании пробирки выдерживают в термостате под углом так, чтобы клеточный слой был покрыт питательной средой. Поэтому на пробирках принято делать продольные прямые линии цветным карандашом. Пробирки укладывают всегда линией вверх.

Учёт результатов заражения. В контрольных культурах клеток обычно в течение недели морфологических изменения не отмечают. В опытных культурах под воздействием вируса видимые изменения в клетках могут наступить уже через 10-12 часов, или через несколько дней, или заметной деструкции клеток не наступит. Всё это зависит от восприимчивости ткани к данному вирусу, свойств и дозы вируса, условий культивирования и т.д. Кроме того, следует учитывать также, что морфологические клетки могут изменяться под воздействием токсических веществ, содержащихся в исследуемом материале.

Чтобы убедиться в отсутствии действия вируса на клетки или подтвердить специфичность этого действия, а также убедиться в том, что наступившая дегенерация клеток не является результатом действия токсических веществ, из зараженных тканей отсасывают культуральную жидкость и заражают ею свежую культуру ткани, т.е. проводят пассаж. Повторение морфологических изменений в пассажах указывает на наличие и размножение вируса. Если в первом дегенерация клеток наступила, а в пассаже она отсутствует, то предполагают наличие в материале токсических веществ.

Отсутствие каких-либо видимых изменений в клетках в первом заражении и пассажах окончательно не исключает наличие вируса в исследуемом материале, т.к. некоторые вирусы не способны вызывать деструкции клеток.

Полуперевиваемые культуры клеток.

Полуперевиваемые культуры клеток – это культуры диплоидных клеток человека и животных. Это морфологически однородная популяция клеток, стабилизированная в процессе культивирования *in vitro*, имеющая ограниченный срок жизни, характеризующаяся тремя фазами (стабилизации, активного роста, старения), сохраняющая в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, свободная от контаминантов. Линии диплоидных клеток пригодны к повторному диспергированию и росту, как правило не более 20 пассажей (теряют исходные свойства).

Культуры диплоидных клеток получают из тканей человека путем серийных пассажей культур клеток, сохраняющих характерную диплоидную конфигурацию хромосом. Преимущество культур диплоидных клеток состоит в высокой чувствительности к различным вирусам.

ИНДИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Обнаружение вируса в культуре клеток называется индикацией и осуществляется следующими методами:

- Выявлением специфической дегенерации клеток (ЦПД – цитопатогенное действие вируса);
- Обнаружением внутриклеточных включений;
- По образованию бляшек;
- По положительной реакции гемагглютинации;

Цитопатогенное действие вируса.

Простейшим признаком, свидетельствующим о размножении вируса, являются дегенеративные изменения в клетках, то есть проявление цитопатогенного действия вируса. Наступившие видимые морфологические изменения в клетке называют цитопатогенным эффектом.

Цитопатические изменения в инфицированных культурах клеток зависят от биологических свойств и дозы исследуемого вируса. Одни вирусы проявляют ЦПД в течение первой недели после заражения, другие – спустя 1-2 недели после заражения.

Характер изменений при инфицировании клеточных культур классифицируется на следующие группы:

- Очаговое мелкозернистое перерождение;
- Мелкозернистое перерождение по всему монослою;
- Очаговое гроздевидное скопление клеток;
- Равномерная зернистость клеток;

- Объединение клеток в гигантские многоядерные клетки и симпласты.

Обнаружение внутриклеточных включений.

При репродукции некоторых вирусов внутри протоплазмы или ядра клетки образуются специфические включения. Для их обнаружения культуры клеток выращивают на специальных стеклянных пластинках, помещенных в стерильные пробирки с 2 мл клеточной суспензии. После образования монослоя клетки заражают вирусом и через определенные сроки в зависимости от свойств исследуемого вируса готовят препараты. Для морфологических исследований культуры клеток окрашивают обычными красителями.

Образование бляшек.

Размножение некоторых вирусов в культуре клеток можно выявить методом бляшек.

В основе метода лежит появление в монослое зараженных клеток под агаровым покрытием обесцвеченных участков (бляшек). Бляшки представляют собой деструктивные клетки, разрушенные вирусом и неспособные окрашиваться в отличие от живых клеток.

Реакция гемагглютинации.

В основе РГА лежит способность некоторых вирусов агглютинировать эритроциты человека, отдельных видов животных и птиц.

В качестве исследуемого материала при гемагглютинации используют аллантоисную и амниотическую жидкость, суспензию хорионаллантоисных оболочек куриного эмбриона, взвеси и экстракты из органов животных, а также культуральную жидкость инфицированных

клеток. Перед постановкой реакции испытуемый материал освобождается от крупных частиц центрифугированием.

Компоненты РГА: вирусосодержащий материал, взвесь эритроцитов человека или животных, физиологический раствор.

Техника постановки РГА. РГА можно ставить двумя методами: капельным методом на стекле и в пробирках или лунках пластин.

Для постановки капельной реакции на чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю 5% взвеси эритроцитов и каплю вирусосодержащего материала, тщательно перемешивают пипеткой. При положительной реакции через 1-2 минуты макроскопически обнаруживают появление агглютинации эритроцитов в виде хлопьев.

Постановка РГА в пробирках. В штативе устанавливают 10-12 пробирок, в которых готовят последовательные разведения вируса. Затем во все пробирки вносят по 1 мл 1% взвеси эритроцитов. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют для инкубации. При наличии гемагглютинирующего вируса в исследуемом материале агглютинированные эритроциты оседают на дно пробирки в виде зонтика с неровными зубчатыми краями. При отрицательной РГА эритроциты оседают на дно в виде точки с ровными гладкими краями.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ.

Методы определения типа вирусов (в вирусосодержащем материале) относятся к методам идентификации и основаны на нейтрализации вирусов типоспецифическими сыворотками:

- Нейтрализация ЦПД;
- Реакция торможения гемагглютинации;
- РСК, ИФА, ПЦР, иммуноблотинг.

Реакции нейтрализации.

Реакции нейтрализации основаны на способности специфических гипериммунных сывороток нейтрализовать инфекционное действие гомологичного вируса в культуре клеток, курином эмбрионе, лабораторных животных. Выбор восприимчивой системы определяется свойствами испытуемого вируса. В реакции нейтрализации один из компонентов (вирус или сыворотка) должны быть обязательно известным и применяться в постоянной дозе. Второй (исследуемый) компонент применяется в различных разведениях (титруется).

Постановка реакции нейтрализации в зависимости от цели осуществляется двумя вариантами. Применяют реакцию нейтрализации для выявления и определения титра специфических антител в сыворотках крови переболевших животных. В этом случае реакция нейтрализации ставится с постоянной дозой известного вируса и разными разведениями испытуемых сывороток.

Компоненты реакций нейтрализации: 1) вирус известного вида (типа) для серологической диагностики заболевания или исследуемый вирус для идентификации; 2) сыворотка, специфическая для идентификации выделенного вируса, или исследуемая сыворотка для серологической диагностики заболевания.

Реакция торможения (задержки) гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на свойстве специфических антисывороток подавлять (тормозить) гемагглютинирующую способность вирусов. Реакция используется для идентификации неизвестного вируса (по известной специфической

сыворотке) или для определения специфических антител в сыворотке переболевших животных (по известному вирусному антигену).

Компоненты РТГА: вирус, специфическая гипериммунная сыворотка, 1% взвесь эритроцитов, физиологический раствор.

При использовании РТГА для серологической диагностики вирусных инфекций парные сыворотки больных титруют с несколькими вирусными антигенами. Специфичность последних, равно как и рабочий титр, заранее проверяются посредством эталонных специфических сывороток.

Положительным результатом РТГА считается отсутствие гемагглютинации в пробирке с большой концентрацией сыворотки.

При использовании РТГА для идентификации выделенного вируса испытуемый вирус относится к тому виду (типу), сыворотка которого вызвала его нейтрализацию и торможение реакции гемагглютинации.

2. ИФА (иммуноферментный анализ) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала.

Для определения кори иммунологическим методом используют набор реагентов для иммуноферментного количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G, M к вирусу кори в сыворотке (плазме) крови.

Принцип метода количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу кори:

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением рекомбинантного антигена вируса кори.

Схема поведения ИФА для набора реагентов «ВектоКорь-IgG»

1. Внести *качественный анализ*: по 100 мкл калибровочных образцов 0, 0,15 и 5 МЕ\мл в дублях. *Количественный анализ*: по 100 мкл калибровочных образцов 0; 0,15; 0,5; 1; 2 и 5 МЕ\мл и контрольного образца в дублях.

2. Внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 1 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

3. Инкубировать 30 мин, 37°C.

4. Промыть промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз.

5. Внести по 100 мкл конъюгата.

6. Инкубировать 30 мин, 37°C

7. Промыть промывочным раствором, 400 мкл, 5 раз

8. Внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина

9. Инкубировать 25 мин, 18-25°C, в темноте

10. Внести по 100 мкл стоп-реагента.

11. Измерить оптическую плотность при 450 нм\ референсная длина волны 620-655 нм.

Принцип метода количественного и качественного определения иммуноглобулинов класса М к вирусу кори:

Метод определения IgM к вирусу кори основан на твердофазном иммуноферментном анализе.

Схема поведения ИФА для набора реагентов «ВектоКорь-IgM»

1. Внести по 100 мкл К+, К-; по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов.

2. Инкубировать 30 мин, 37°C

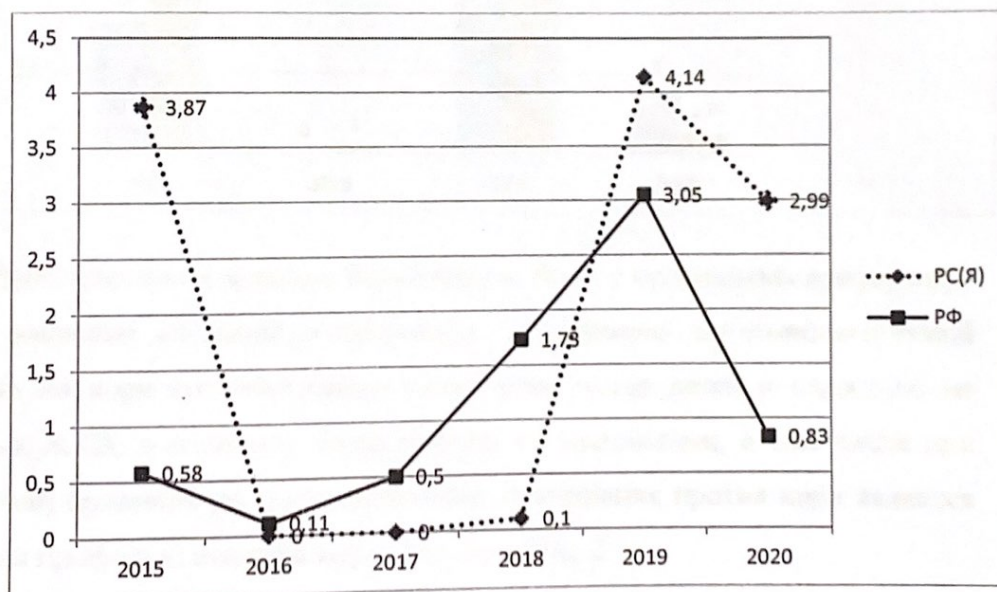
3. Промыть промывочным раствором 400 мкл, 5 раз

- 4.Внести по 100 мкл конъюгата
- 5.Инкубировать 30 мин, 37°C
- 6.Промыть промывочным раствором 400 мкл, 5 раз
- 7.Внести по 100 мкл раствора тетраметилбензидина
- 8.Инкубировать 25 мин, 18-25°C в темноте
- 9.Внести по 100 мкл стоп-реагента
- 10.Измерить оптическую плотность при 450 нм\ референсная длина волны – 620-655 нм

2.1 Сравнение коревой заболеваемости в Республике Саха (Якутия)

Корь в Республике Саха (Якутия).

Рис. 1

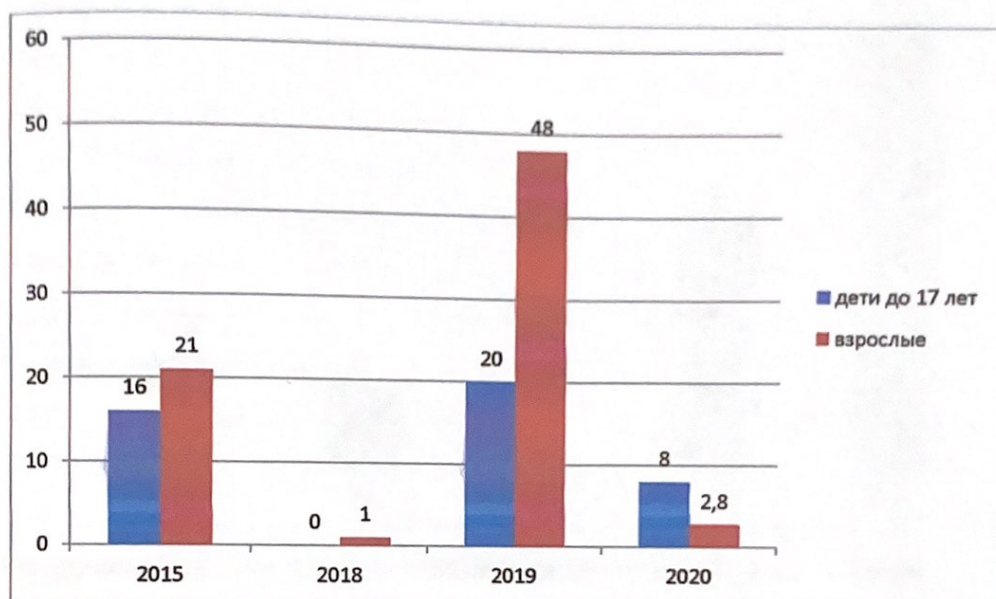


Ранее случаи кори регистрировались в 2015 году (37 случаев), в 2018 году (1 случай), вспышка кори началась в декабре 2019 года по январь 2020 года и продолжалась на протяжении 3 инкубационных периодов. Общее количество заболевших 68 человек (в декабре 2019 года – 40 случаев, январе 2020 года – 28 случаев). Всего в 2020 году зарегистрировано 29 случаев,

показатель заболеваемости составил 2,99 на 100 тысяч населения, что в 3,6 раза выше среднего по Российской Федерации.(Рис.1.)

Возрастной состав заболевших корью в Республике Саха (Якутия) в 2015-2020 году

Рис.2



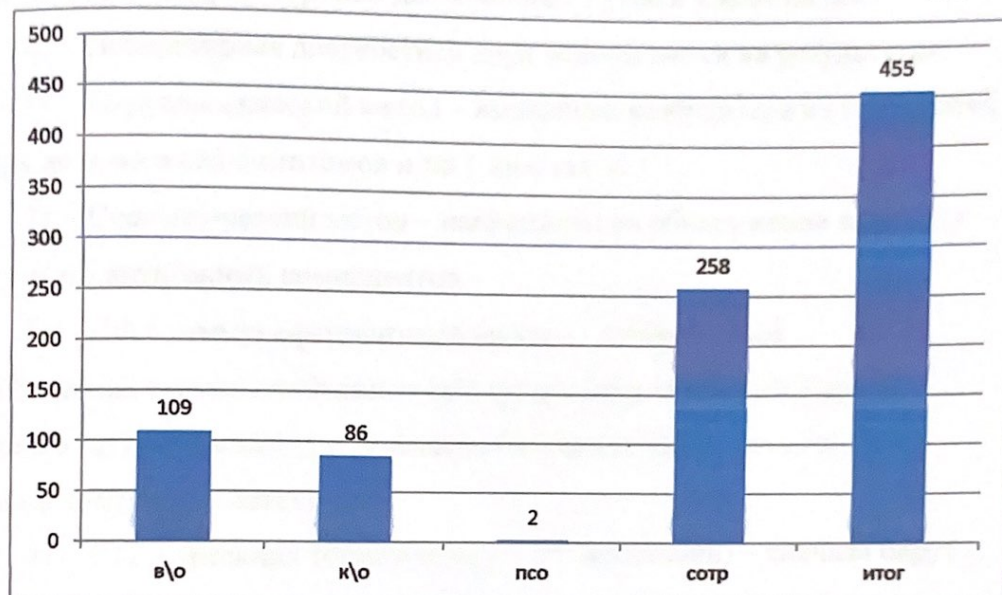
Заболеваемость корью в большинстве была у непривитых против кори или не имевших сведений о прививках. Ухудшению эпидемиологической ситуации по кори способствовало увеличение числа детей и взрослых, не привитых ЖКВ, в основном из-за отказов от вакцинации, в том числе при проведении прививок по эпидпоказаниям. Вакцинация против кори является основным профилактическим мероприятием.(Рис.2)

По итогам 2015-2020 года уровень охвата прививками против кори детей превышает регламентированный – 95 %. В целом по республике с 2015-2020 году против кори вакцинировано 139 353 человека, в т.ч. 87 272 детей и 52 081 взрослых. Ревакцинацию получили 165 510 человек, в т.ч. 96 618 детей и 68 892 взрослых.

2.2 Результаты исследования

Общий анализ на антитела к вирусу кори IgG по методу ИФА за 2021 год в ГБУ «ДИКБ» РС(Я)

Рис.3



На данном (рис.3) мы видим общий итог проведения исследований анализа на антитела к вирусу кори IgG по отделениям за 2021 год в ГБУ «ДИКБ» РС(Я). В вирусологическом отделении была проведена 109 анализов на антитела к вирусу кори, в кишечном отделении 86, в первично сосудистом отделении 2, сотрудников 258 по общим итогам была проведена 455 анализов на антитела к вирусу кори. Положительных результатов нет.

Выводы

1. Корь – острое, высококонтагиозное, антропозное вирусное заболевание, распространяющееся воздушно – капельным путем и проявляющееся общей интоксикацией, характерной макуло – папулезной сыпью на коже, катаром верхних дыхательных путей и конъюнктив.

2. Лабораторная диагностика кори основывается на результатах:

1) Вирусологический метод – выделение возбудителя из носоглотки за 3 дня до появления симптомов и по 1 дню сыпи.

2) Серологический метод – направлены на обнаружение антител к вирусу и его антигенных компонентов.

3) ИФА (иммуноферментный анализ) – обнаружение специфических иммуноглобулинов IgM (указывают на острый коревой процесс) и IgG (указывают на перенесенное раннее заболевание и сохранившийся иммунитет)

4) РТГА (реакция торможение гемагглютинации) – сначала берут кровь в катаральном периоде или в 1-ые 3 дня с момента появления сыпи, и повторно берут кровь через 14 дней – результаты сравнивают и смотрят на нарастание титра антител.

3. Проведя сравнение государственных докладах «о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» по Республике Саха (Якутия) за 2015-2020 год показало, что в 2019 и 2020 году началась вспышка кори и продолжалась на протяжении 3 инкубационных периодов.

В ГБУ «ДИКБ» РС(Я) за 2021 год было сделано 455 анализов на иммуноферментный анализ на корь. Положительных результатов нет.

Заболееваемость корью в большинстве была у непривитых против кори или не имевших сведений о прививках. Ухудшению эпидемиологической ситуации по кори способствовало увеличение числа детей и взрослых, не привитых ЖКВ, в основном из-за отказов от вакцинации, в том числе при

проведении прививок по эпидпоказаниям. Вакцинация против кори является основным профилактическим мероприятием.

Заключение

Корь – острое высоко контагиозное инфекционное заболевание вирусной этиологии, которое проявляется лихорадкой, общей интоксикацией, сыпью, конъюнктивитом, поражением слизистой верхних дыхательных путей. Актуальность проблемы заключается в том, что корь несет тяжелые осложнения со стороны органов дыхания, нервной системы, органов зрения, органов слуха, мочевыделительной системы.

Возбудитель кори относится к семейству парамиксовирусов, неустойчив во внешней среде. Источником инфекции является только больной человек, который выделяет вирус кори с последних двух дней инкубационного периода и до четвертого дня после появления сыпи на кожных покровах. Путь передачи инфекции – воздушно-капельный, входными воротами инфекции служит слизистая оболочка верхних дыхательных путей.

В ходе изучения из литературных источников, сделаны выводы, что корь в большинстве случаев поражает детский организм, поэтому у детей встречается чаще всего. Особенно восприимчивы не болевшие корью и не привитые против нее, причем восприимчивость сохраняется в любом возрасте.

После перенесенного заболевания остается стойкий пожизненный иммунитет. Корь – это управляемая инфекция, которая включена рядом стран в программу ликвидируемых.

Список использованной литературы

1. Агафонов А.П., Игнатъев Г.М., Пьянков С.А., Корь современные представления о возбудителе, клиника, диагностика, профилактика. Новосибирск, 2002. - 38с;
2. Воздушно-капельные инфекции. Стандарты медицинской помощи: справочное издание, сост. А.С. Дементьев и др. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 448 с.
3. ВОЗ. Руководство по лабораторной диагностике кори и краснухи. Вторая редакция, 2006; 17–9с.
4. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М., Микробиология: Учебник – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336с;
5. Особенности диагностики и профилактики кори на современном этапе / Я.М. Еремушкина, Т.К. Кускова, Е.Т. Вдовина и др. Лечащий Врач. - 2019. - №11. - С. 32-35с.
6. Материалы к государственному докладу «о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» по Республике Саха (Якутия) за 2015 – 2020 год.
7. Инфекционные болезни: учебник. Учайкин В.Ф., Нисевич Н.И., Шамшева О.В. 2013. - 688 с.