

Лабораторная диагностика вирусных инфекций

В лабораторной диагностике вирусных инфекций имеются три основных подхода:

1. непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;
2. изоляция вируса из клинического материала и идентификация вируса;
3. серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста **антител к вирусам** в течение болезни.

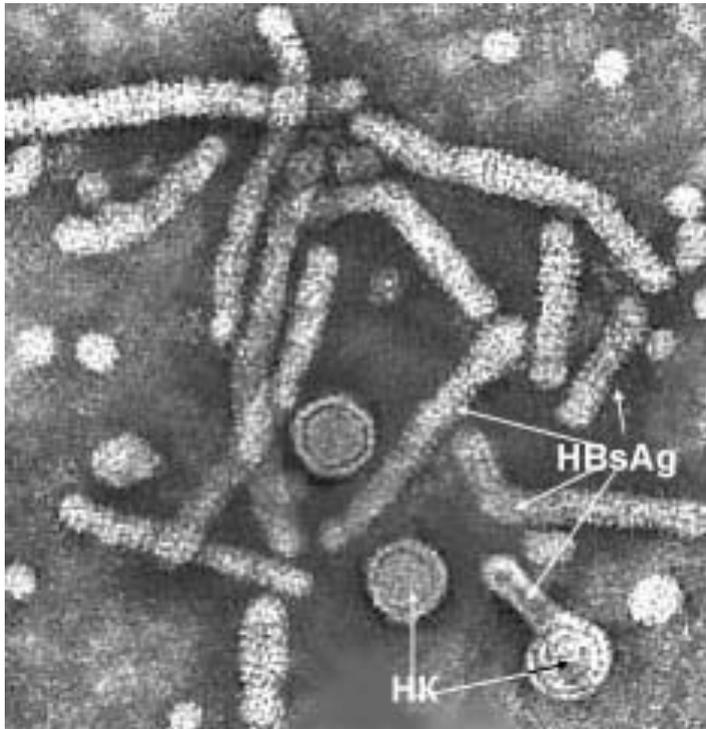
I. Прямые методы исследования клинического материала

- Это методы, которые позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту (НК) непосредственно в клиническом материале.
- Являются наиболее быстрыми (2–24 ч).
- Однако прямые методы имеют свои ограничения (возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Поэтому они иногда требуют подтверждения непрямыми методами.

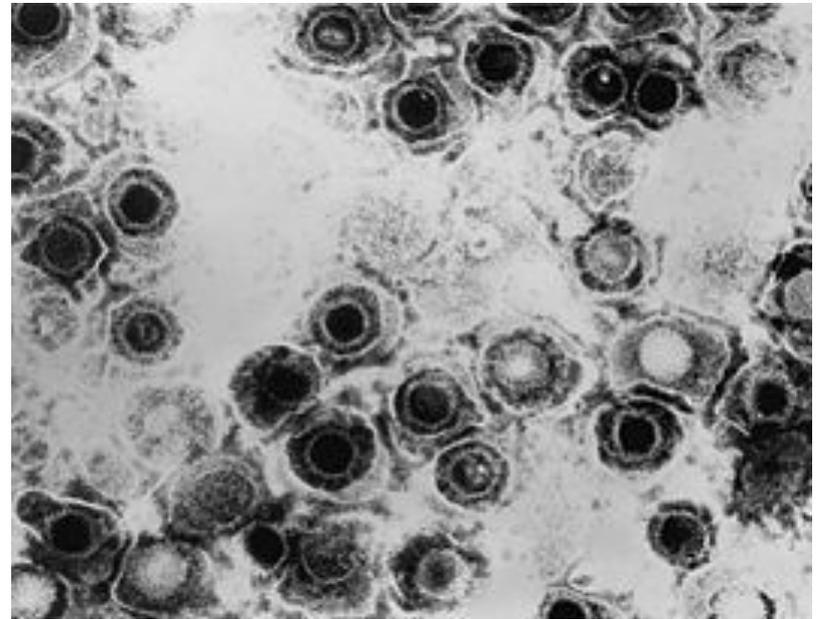
1. Электронная микроскопия (ЭМ)

- С помощью этого метода можно обнаружить собственно **вирус**.
- Для успешного определения вируса его концентрация в пробе должна быть не менее **$1 \cdot 10^6$ частиц в 1 мл**.
- Но поскольку концентрация возбудителя, как правило, в материале от больных незначительна, то поиск вируса затруднен и требует предварительного его осаждения с помощью центрифугирования.
- Кроме того, ЭМ не позволяет типировать вирусы, так как у многих из них нет морфологических различий внутри семейства.

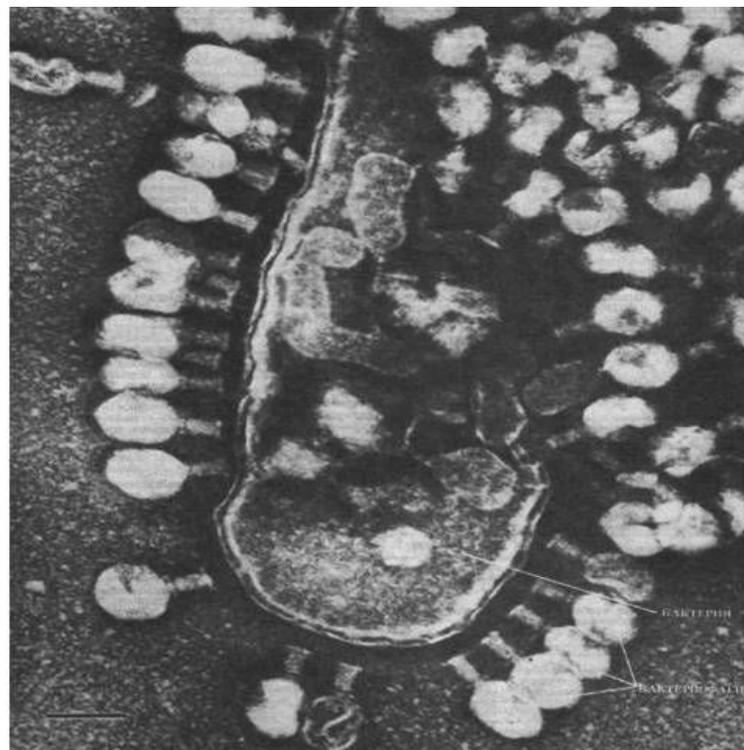
Вирус гепатита В



Вирус простого герпеса



Бактериофаги на бактериальной клетке



2. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

- Метод основан на использовании **антител, связанных с красителем - флюорохромом.**
- **РИФ** широко применяется для выявления вирусных антигенов в материале больных и для быстрой диагностики.
- В практике применяются **два варианта РИФ:** прямой и непрямой.

- 1) **Прямая РИФ:** применяются меченные красителем антитела к вирусам, которые наносятся на инфицированные клетки (мазок, культура клеток).
- 2) **Непрямая РИФ:**
 - на исследуемый материал наносится специфическая сыворотка, антитела которой связываются с вирусным антигеном, находящимся в материале;
 - затем наслаивается антиглобулиновая (антивидовая) сыворотка, меченая флюорохромом.

- **РИФ** широко применяется для быстрой расшифровки этиологии **острых респираторных вирусных инфекций** при анализе мазков-отпечатков со слизистой оболочки верхних дыхательных путей.
- **Успешное применение РИФ** возможно, если в клиническом материале содержится достаточно большое число инфицированных клеток.

3. Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Антитела, меченые ферментами, связываются с антигеном (вирусом), и такой комплекс обнаруживается при добавлении субстрата для фермента.
- **ИФА**, как и РИФ, может применяться как в прямом, так и в непрямом варианте.

Преимущества метода ИФА:

- т.к. с помощью ИФА можно измерять **растворимые антигены**, то не требуется наличия интактных клеток в образце и таким образом могут использоваться различные виды клинического материала.
- возможность **количественного определения антигенов**, что позволяет применять его для оценки клинического течения болезни и эффективности химиотерапии.

4. Радиоиммунный анализ (РИА)

- Метод основан на **метке антител радиоизотопами**, что обеспечивало высокую чувствительность в определении вирусного антигена.
- Широкое распространение метод получил в 80-е годы, особенно для **определения маркеров HBV** и других некультивируемых вирусов.
- К **недостаткам метода** относится необходимость работать с радиоактивными веществами и использования дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

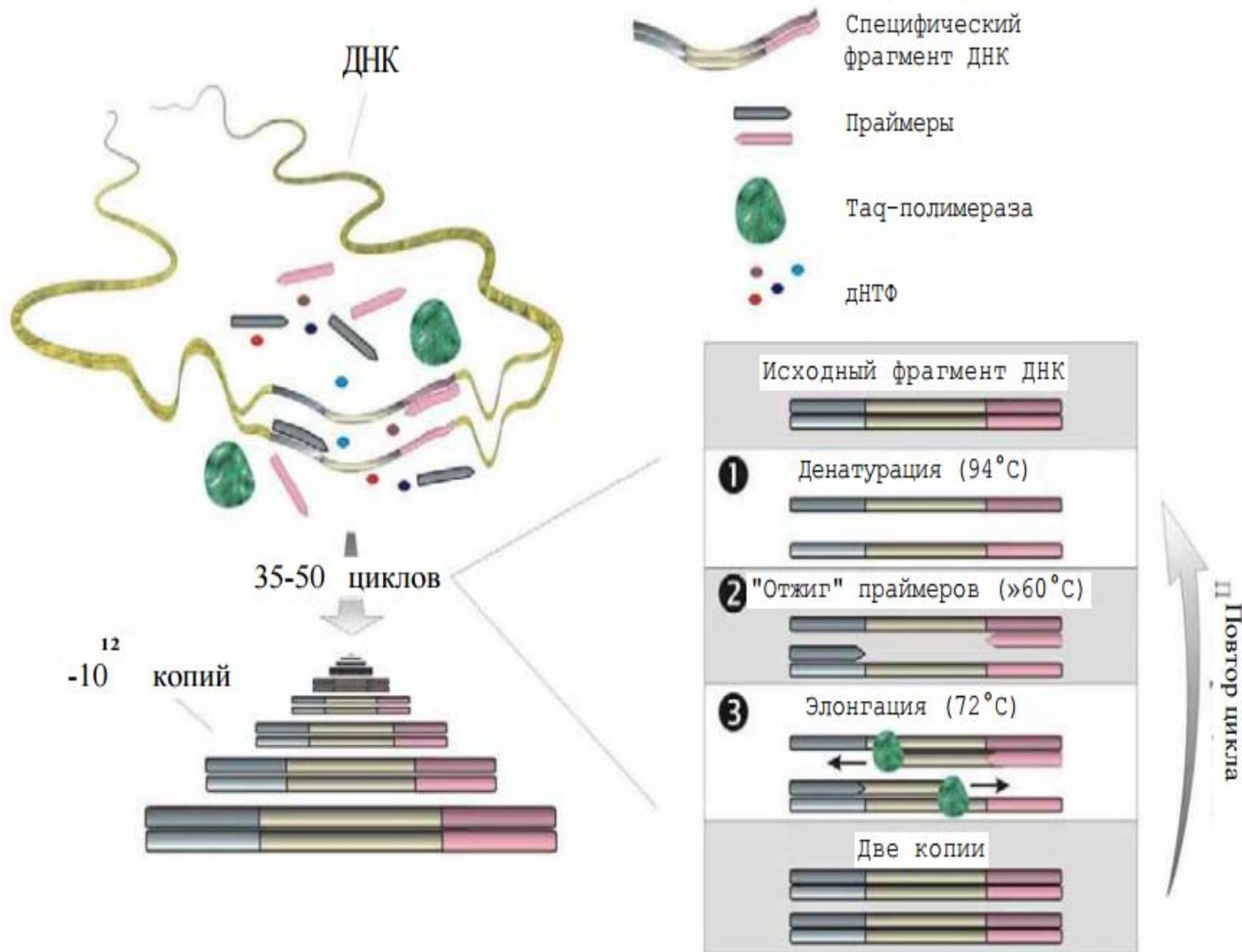
5. Молекулярные методы

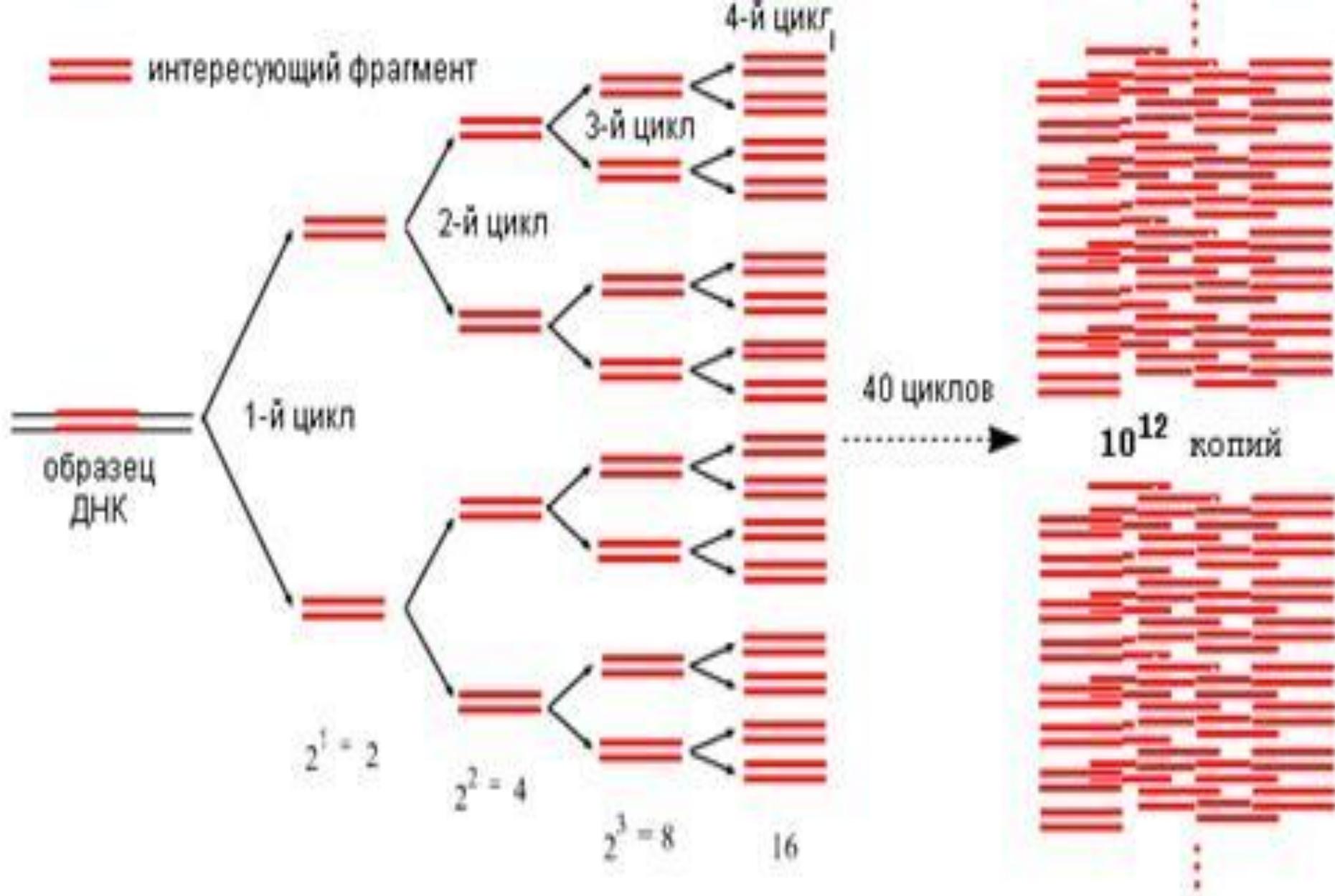
- 1) **Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот.**
 - Метод основан на **гибридации комплементарных нитей ДНК или РНК** с образованием **двунитевых структур** и выявлении их с помощью метки.
 - Для этой цели используются специальные **ДНК- или РНК-зонды**, меченные изотопом (^{32}P) или биотином, обнаруживающие комплементарные нити ДНК или РНК.

2) Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

- Основана на принципе естественной репликации ДНК.
- Суть метода заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирус-специфической последовательности ДНК с помощью термостабильной **Taq ДНК-полимеразы** и двух специфических затравок — так называемых **праймеров**.
- Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, что позволяет за **25–35** циклов наработать достаточное число **копий выбранного участка ДНК** для ее определения различными методами.

Принцип метода пцр

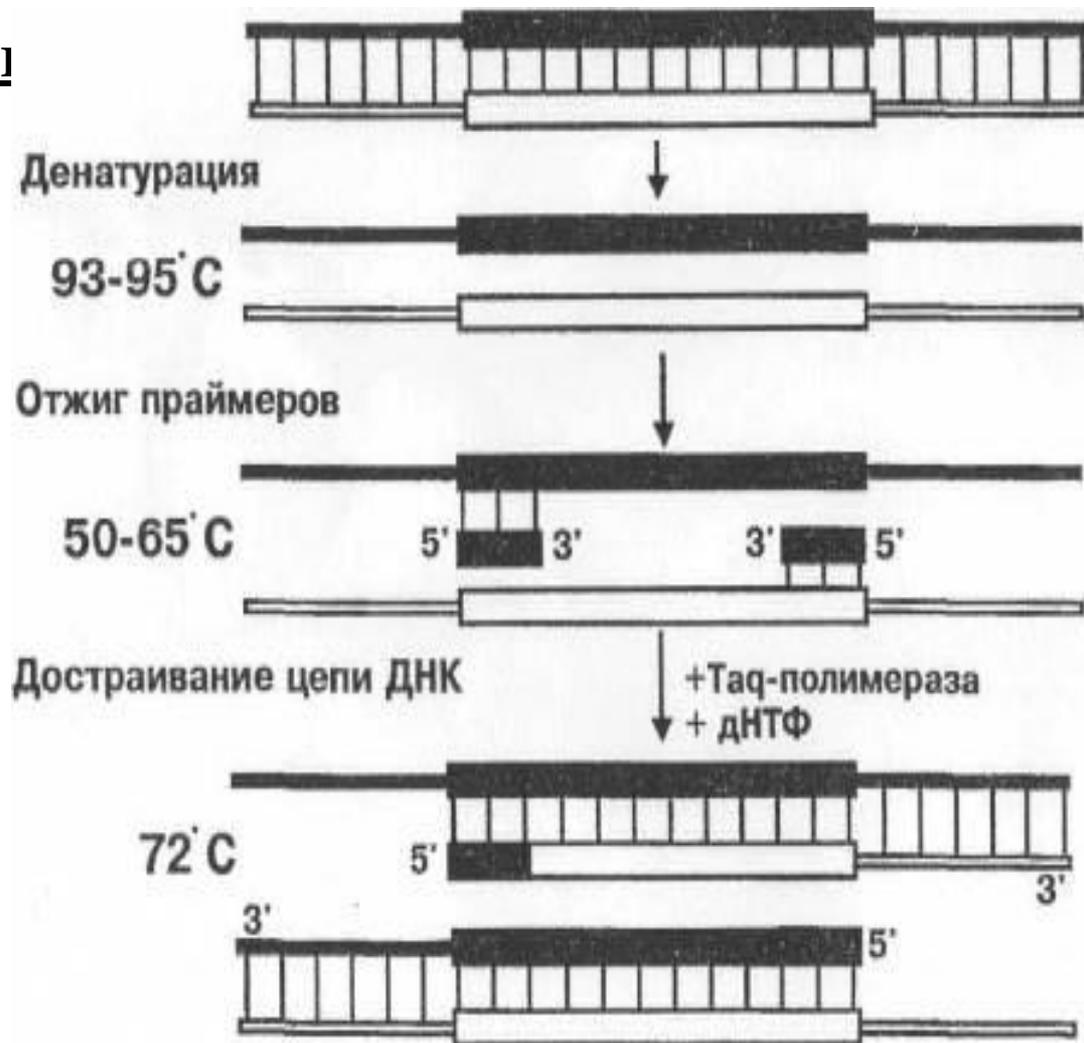




Многократное копирование необходимого образца ДНК

Структуру отдельного цикла можно представить следующим образом:

- Денатурация ДНК
- Отжиг праймеров
- Элонгация ДНК



Оборудование

1. Ламинарные шкафы и боксы для стерильных работ;
2. Системы автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот;
3. Автоматические пипетки;
4. Электрофорез;
5. Амплификатор (термоциклер, ПЦР-



King Fisher
Flex. Выделение и
очистка
нуклеиновых
кислот, а также
белков



Ламинарный бокс

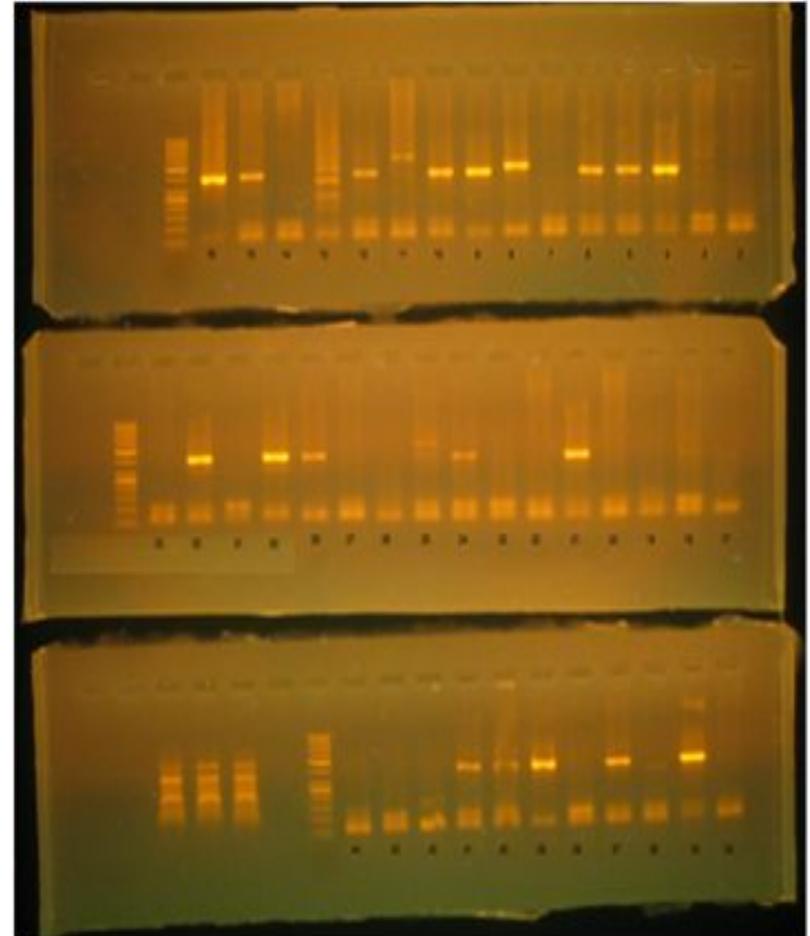
- **Амплификатор** (термоциклер, ПЦР-машина) — прибор, обеспечивающий периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Прибор производит определенное количество попеременных нагревов и охлаждений (термоциклов) в зависимости от используемого метода и повторяет их множество раз. Копирование участков ДНК происходит тысячи раз.



Детекция продуктов амплификации

В большинстве методик на данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии.

1. Метод горизонтального электрофореза;
2. Метод вертикального электрофореза;
3. Метод гибридизационных зондов



Детекция ПЦР-продукта методом
гель-электрофореза

Варианты постановки ПЦР

- Вложенная ПЦР (Nested PCR (англ.);
- Инвертированная ПЦР (Inverse PCR (англ.);
- ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR (англ.);
- Асимметричная ПЦР (англ. Asymmetric PCR);
- Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.);
- Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR (англ.);
- Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, англ. *Colony - PCR Colony*);
- ПЦР длинных фрагментов (англ. *Long-range PCR*);
- RAPD (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA*);
- Групп-специфическая ПЦР (англ. group-specific PCR);
- ПЦР с использованием горячего старта (англ. *Hot-start PCR*) ;
- Виртуальная ПЦР (англ. *in silico PCR*, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР).

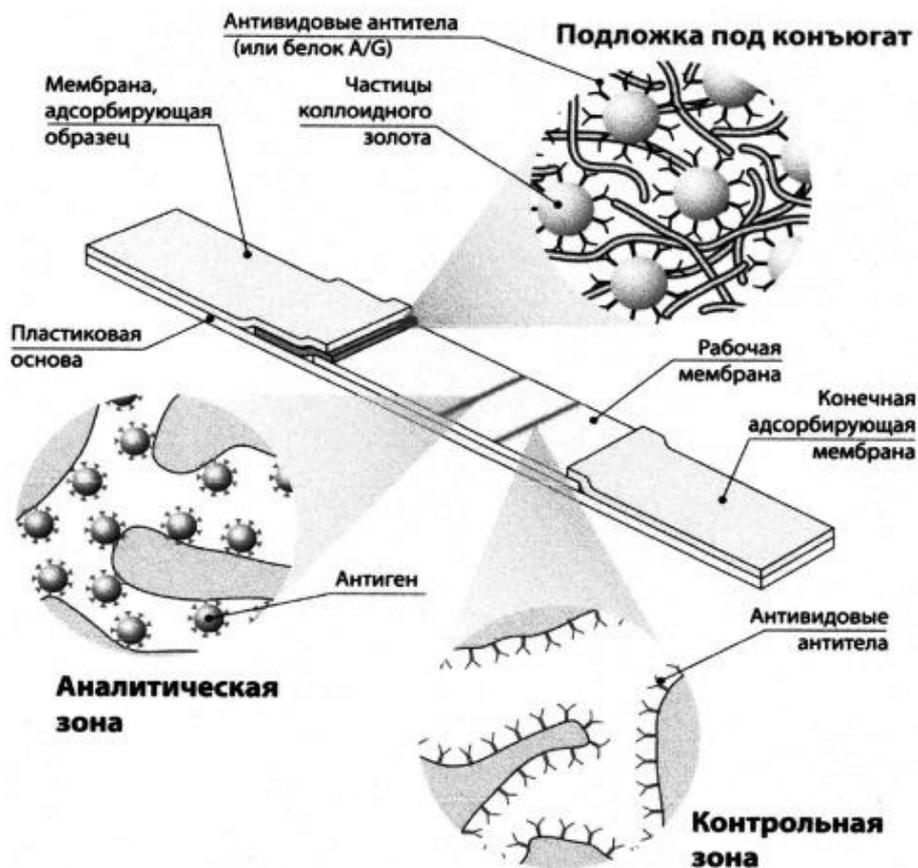
Принцип метода ПЦР с обратной транскриптазой

- образование комплементарной ДНК (кДНК) на матрице одноцепочечной мРНК с помощью фермента ревертазы, с последующими циклами по стандартной методике ПЦР

- **Метод ПЦР высокоспецифичен и очень чувствителен.** Он позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК в исследуемом материале.
- В последние годы **ПЦР находит все более широкое применение** для диагностики и мониторинга вирусных инфекций (вирусы гепатитов, герпеса, папилломы и др.)

Иммунохроматографический анализ

— это метод определения наличия определенных концентраций антигенов вируса в биологических материалах (моча, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, кал и т. д.).



ИХА- тест до исследования:



ИХА-тест после исследования:



(тест положительный)

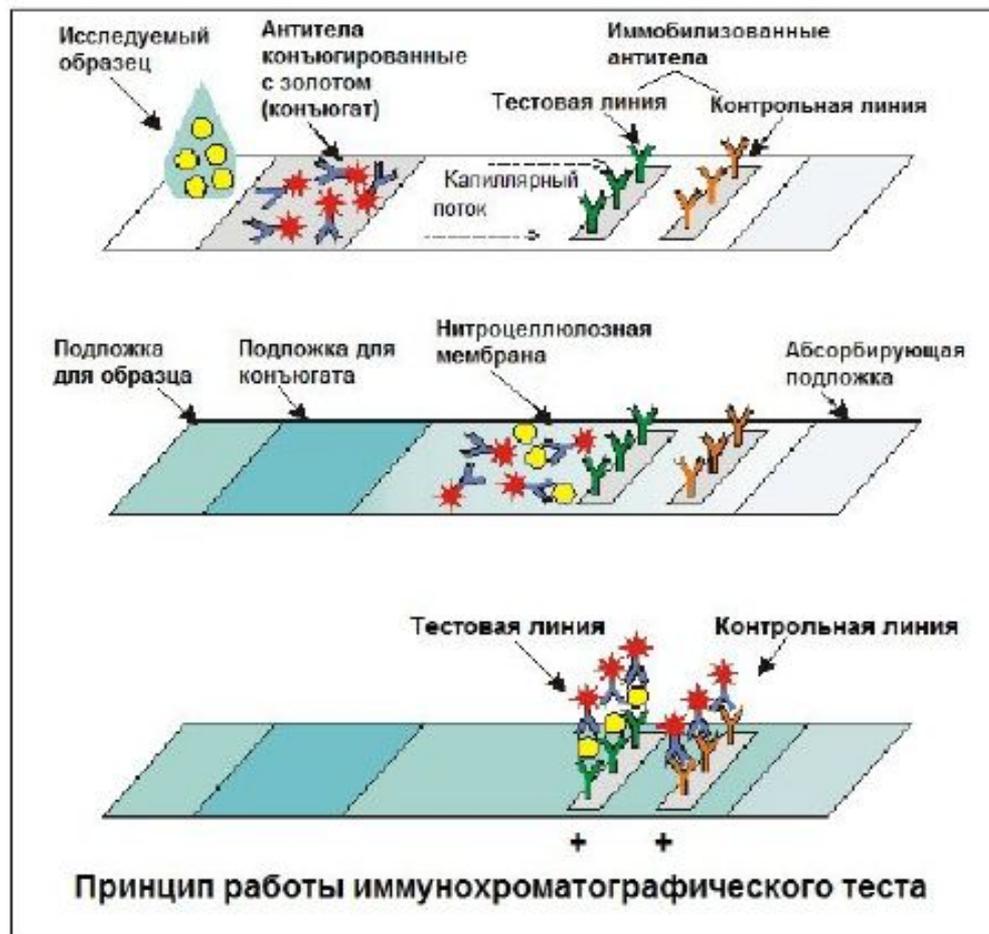
Принцип действия иммунохроматографического теста.

В ИХА-полосках (экспресс-тестах) используются три типа антител:

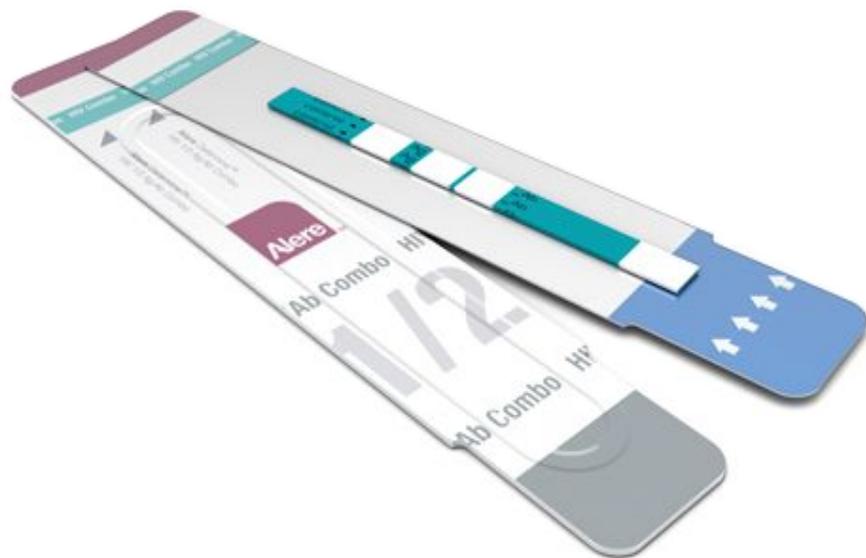
- 1. Подвижные (растворимые) моноклональные антитела к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные ("сшитые") с коллоидным золотом - красителем, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в исследуемую жидкость (мочу, кровь). И после погружения в биологическую жидкость мигрируют вместе с жидкостью.

2. Поликлональные антитела к исследуемому антигену или антителу, жестко иммобилизованные в тест-зоне полоски.

3. Вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски (анти- антитела).



ИХА тест 4-го поколения Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo



№ лота

Место для записи пациента

Зона Контрольная линия

Зона p24 антигена- Ag

Зона антител к ВИЧ- Ab



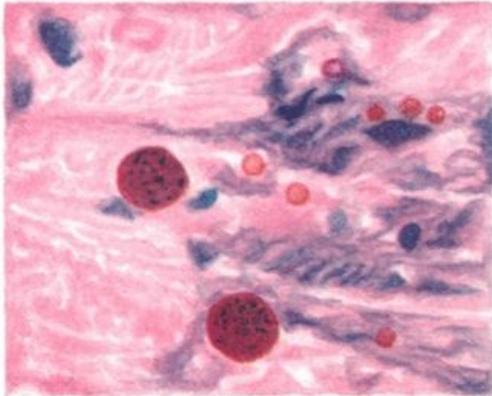
Тест-карта «Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo»:
2 или 10 тест-карт.

Каждая тест-карта содержит 10 тест-полосок с нанесенным рекомбинантным антигеном ВИЧ-1/ВИЧ-2, синтетическими пептидами, антителом анти-p24 и авидином.

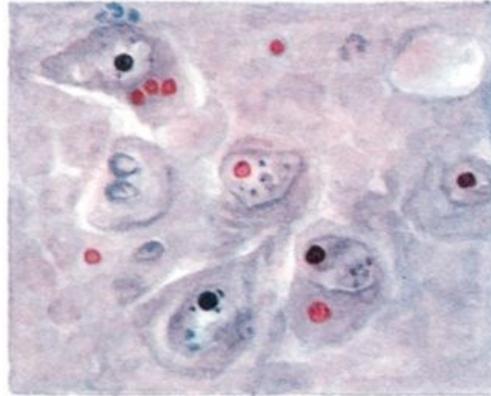
6. Цитологические методы

- В настоящее время имеют **ограниченное диагностическое значение**, но при ряде инфекций по-прежнему должны применяться.
- Исследуются **материалы биопсии, мазки**, которые после соответствующей обработки **окрашиваются и анализируются под микроскопом**.
- При **цитомегаловирусной инфекции**, например, в срезах ткани или в моче обнаруживаются характерные **гигантские клетки**— "совиный глаз"; при бешенстве — включения в цитоплазме клеток (**тельца Бабеша—Негри**).

Выявление телец Бабеша—Негри в цитоплазме нервных клеток при различных методах окраски.



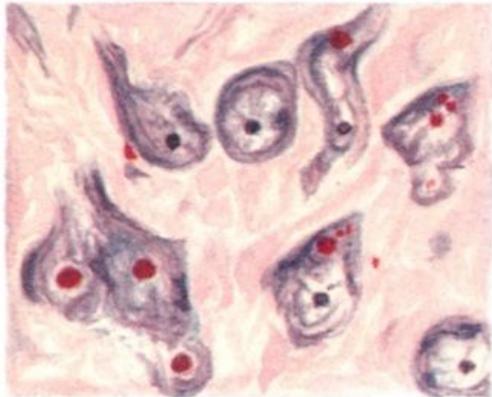
4



5



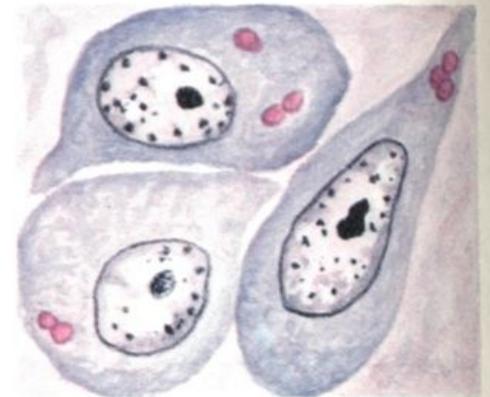
6



7



8



9

II. Непрямые методы диагностики

- **Выделение вирусов** – один из самых старых и трудоемких методов диагностики.
- Однако и сегодня **выделение вируса с последующей идентификацией** с помощью одного из современных методов (ИФА или ПЦР) является **наиболее достоверным методом диагностики** – так называемый "**золотой стандарт**".

- Для успешного выделения вирусов **клинический материал должен быть взят в соответствии с патогенезом** предполагаемого заболевания и в наиболее ранние сроки.
- Как правило, берутся:
 - при респираторных инфекциях — носоглоточный смыв;
 - при энтеровирусных инфекциях — фекалии (энтеровирусы);
 - при поражениях кожи и слизистых оболочек — соскобы, содержимое пузырьков (герпес, ветряная оспа).

- Для культивирования вирусов используют **ряд методов. Это культивирование в:**
 - организме экспериментальных животных,
 - развивающихся куриных эмбрионах,
 - культурах тканей (чаще — эмбриональные ткани или опухолевые клетки).
- Для выращивания клеток тканевых культур используют **многокомпонентные питательные среды (среда 199, среда Игла и др.)**. Они содержат индикатор измерения рН среды и антибиотики для подавления возможного бактериального загрязнения.

Культуры тканей могут быть:

- **переживающими**, в которых жизнеспособность клеток удастся сохранить лишь временно;
- **растущими**, в которых клетки не только сохраняют жизнедеятельность, но и активно делятся.

- В роллерных культурах клетки ткани фиксированы на плотной основе (стекло, пластик) — чаще в один слой (однослойные).
- В суспензированных — взвешены в жидкой среде.

- **О размножении вирусов в культуре ткани можно судить по цитопатическому действию (ЦПД):**
 - деструкции клеток;
 - изменению их морфологии;
 - формированию многоядерных **симпластов** или **синтиция** в результате слияния клеток.

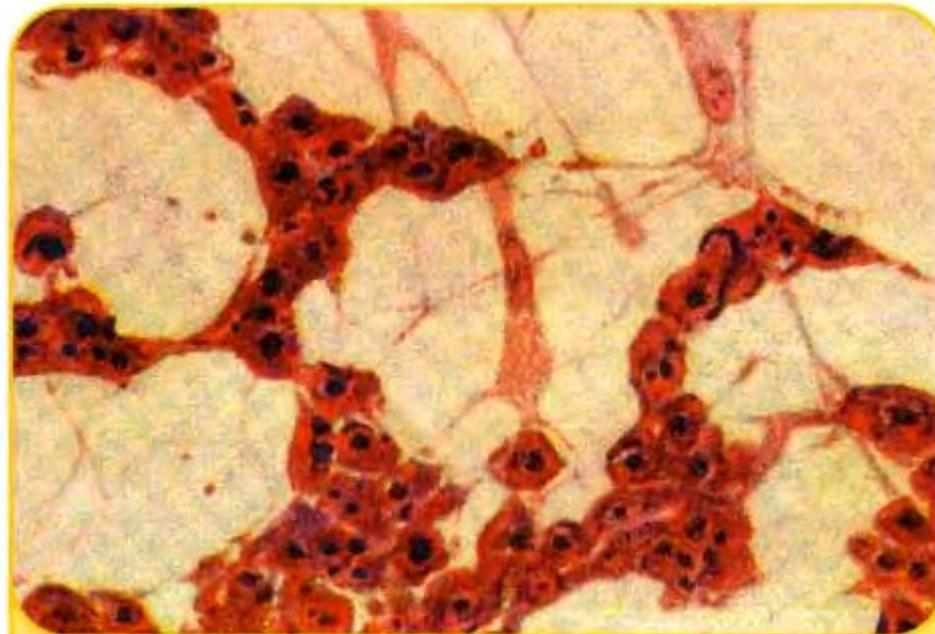


Рис. 4.12. ЦПД вируса

- В клетках культуры ткани при размножении вирусов могут образовываться **включения** — структуры, не свойственные нормальным клеткам.
- По локализации в клетке различают:
 - цитоплазматические;
 - ядерные;
 - смешанные включения.
- Характерные **ядерные включения** формируются в клетках, зараженных **вирусами герпеса (тельца Каудри)**, аденовирусами, а **цитоплазматические включения** — вирусами **оспы (тельца Гварниери и Пашена)**, бешенства (тельца Бабеша-Негри) и др.

Тельца Гварниери

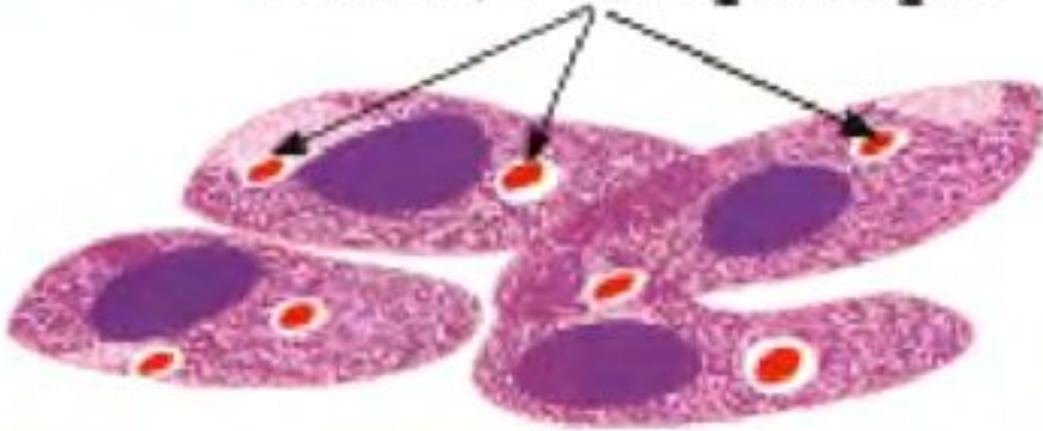


Рис. 4.13. Включения в цитоплазме (тельца Гварниери)

- **Включения** выявляются в **окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках из зараженных клеток.**
- **Краситель** состоит из **эозина, метиленового синего и азура**, растворенных в **метаноле** или в **смеси метанола с глицерином.**
- Обладает полихромным действием, окрашивая **ацидофильные структуры** в разные тона **красного цвета**, **базофильные** - в тона **от пурпурового до синего.**
- Непосредственно перед употреблением к **10** мл дистиллированной воды прибавляют **10** капель **коммерческого красителя Романовского-Гимза.**
Предметное стекло с окрашиваемым препаратом погружают в стаканчик с краской. Через **1** ч. краску сливают, препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

- О размножении вирусов в культуре ткани также можно судить по методу «бляшек» (негативных колоний).
- «Бляшки», или «негативные» колонии — ограниченные участки разрушенных вирусами клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым покрытием, видимые как светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток.
- Один вирион образует потомство в виде одной «бляшки».
- «Негативные» колонии разных вирусов отличаются по размеру, форме, поэтому метод «бляшек» используют для дифференциации вирусов, а также для определения их концентрации.

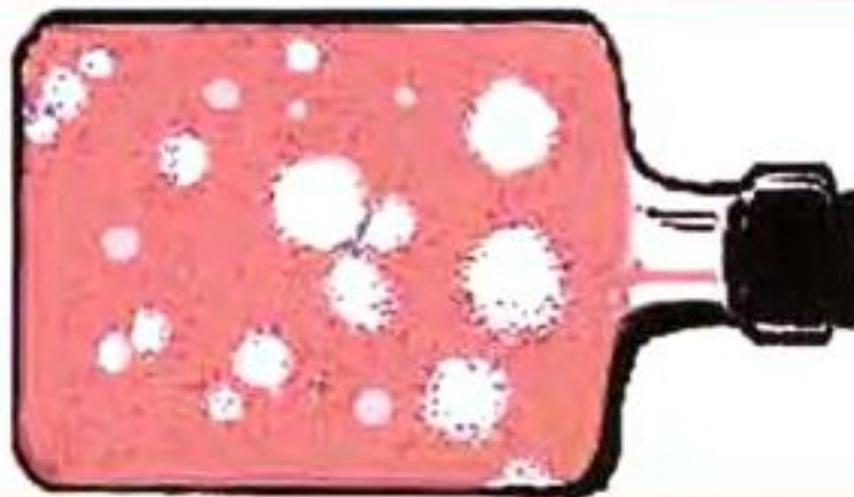


Рис. 4.14. «Бляшки» (негативные колонии вируса)

- Еще одним методом, позволяющим судить о размножении вирусов в культуре ткани, является **реакция гемадсорбции**.
- **Реакция гемадсорбции** — способность культур клеток, инфицированных вирусами, **адсорбировать на своей поверхности эритроциты**.



- **Наиболее распространенным методом оценки размножения вирусов в культуре ткани является метод «цветной пробы».**
- **«Цветная» реакция оценивается по изменению цвета индикатора, 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.**
- **При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет свой первоначальный цвет.**

III. Серодиагностика

- В большинстве случаев используют **парные сыворотки крови**, взятые с интервалом в **2–3 нед.**
- **Положительной реакцией** считается по крайней мере при 4-кратном нарастании титра антител.
- Известно, что **большинство специфических антител относятся к классам IgG и IgM**, которые синтезируются в различное время инфекционного процесса.
- При этом **IgM** относятся к **ранним**, и тесты, используемые для их определения, применяются для ранней диагностики (достаточно исследовать одну сыворотку).
- Антитела класса **IgG** синтезируются позже и длительно сохраняются.

1. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

- **Используется для диагностики заболеваний, вызванных гемагглютинирующими вирусами.**
- **Она основана на связывании стандартного вируса (вирусный диагностикум) с антителами сыворотки больного.**
- **При отсутствии специфических антител эритроциты агглютинируются вирусом (формирование характерного "зонтика").**

2. Реакция связывания комплемента

- РСК является одной из традиционных серологических реакций и используется для диагностики многих вирусных инфекций.
- В реакции принимают участие две системы: **антитела сыворотки больного + стандартный вирус и эритроциты барана + антитела к ним**, а также **комплемент**.
- При соответствии антител и вируса этот комплекс связывает комплемент и лизиса бараньих эритроцитов не происходит (положительная реакция).
- При отрицательной РСК комплемент способствует лизису эритроцитов.

3. Реакция пассивной гемагглютинации

- РПГА – агглютинация сенсibilизированных вирусными антигенами эритроцитов в присутствии антител.
- На эритроцитах могут быть сорбированы любые вирусы, независимо от наличия или отсутствия у них гемагглютинирующей активности.

4. Иммуноферментный анализ

- **ИФА** применяется для определения антител в сыворотке.
- На твердую фазу (дно лунок полистироловых планшет) сорбируется вирусный антиген.
- При добавлении соответствующих антител, находящихся в сыворотке, происходит их связывание с сорбированными антигенами.
- Наличие искомых антител обнаруживается с помощью **анти-антител** (например, человеческих), **конъюгированных с ферментом (пероксидазой)**.
- Добавление субстрата и реакция субстрат – фермент дают окраску.

Заключение

- Количество методов, используемых для диагностики вирусных инфекций, непрерывно растет. Одни уходят в прошлое и имеют в основном историческое значение, другие совершенствуются.
- В настоящее время выпускается большое количество **коммерческих сертифицированных тест-систем**, в том числе и отечественных, для диагностики **наиболее распространенных и социально значимых вирусных инфекций**.
- Государственный реестр содержит более **600** **диагностических препаратов**.
- Однако далеко не для всех групп вирусов имеются диагностические тест-системы. Например, из большой группы энтеровирусов (более 80) только для **определения вирусов полиомиелита** имеются тест-системы, в то же время для диагностики **ВИЧ-инфекции** выпускается более **15** различных наборов.