Федеральное агентство по рыболовству

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

Высшего профессионального образования

«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра «Микробиология»

Контрольная работа № 2

на тему: «Корь»

Выполнила:

студентка 4 курса

Специальности «Микробиология»

Бабарыкина А. А.

Проверила:

д.б.н., профессор

«Микробиология»

Перетрухина А. Т.

Мурманск, 2010

Содержание

1. **История**
2. **Морфология и антигенная структура**
3. **Культивирование**
4. **Резистентность**
5. **Восприимчивость животных**
6. **Эпидемиология**
7. **Патогенез**
8. **Клиническая картина**
9. **Иммунитет**
10. **Лабораторная диагностика**
11. **Лечение**
12. **Специфическая профилактика**

**Список использованной литературы**

1. **История**

Вероятно, корь была широко распространена везде, где жил человек. Первое дошедшее до нас классическое описание кори было сделано иранским ученым Рази в 915 году н.э. Описаны эпидемии кори в Европе в 15 и 16 веках. В 17 веке идет активное изучение этого заболевания. Приходят к выводу, что корь и скарлатина — это разные заболевания. В 1898 г. Коплик описал на слизистой оболочке рта пятна, которые встречаются только у больных корью. В настоящее время эти пятна носят его имя. В 1911 году ученые открыли вирусную природу кори, а в 1940 году искусственно выделили возбудителя в пробирке. Реальная возможность снижения заболеваемости этой инфекцией появилась только в 1954 г., благодаря исследованиям J. Enders и Т. Peebles, выделившим от больного вирус кори и продемонстрировавшим его размножение в культуре клеток. Эти исследования явились в дальнейшем основой создания коревых вакцин, применение которых привело к существенному снижению заболеваемости корью, смертности и летальности от этой инфекции во многих странах мира.

1. Морфология и антигенные свойства

Вирус кори относится к роду Morbillivirus семейства Paramyxoviridae и очень близок к вирусам чумы собак и чумы крупного рогатого скота. Вирус кори — сферический, однонитевой РНК-содержащий вирус, диаметром - 150-250 нм. Из шести идентифицированных структурных белков три связаны с вирусной РНК, а три находятся в вирусной оболочке. Размер генома 16-20 тысяч нуклеотидов, имеют внешнюю оболочку, спиральный тип симметрии капсида. Минус-цепь РНК.

Компоненты вирусной оболочки включают М-белок на внутренней поверхности, а также Н- и F-белки на наружной поверхности. С помощью белка Н вирус прикрепляется к поверхности клетки. F-белок обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран, способствуя пенетрации вируса и разрушению клетки (рис. 1).

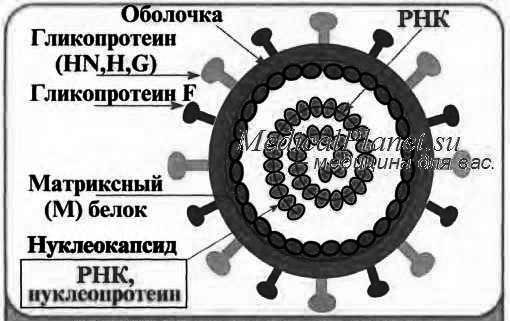


Рис. 1. Схема строения парамиксовируса

Основные антигены вируса кори — гемагглютинин, белок F и нуклеокапсидный белок NP. AT к гемагглютинину и F-протеину проявляют цитотоксическое действие, направленное против инфицированных клеток.

В клеточных культурах вирус кори вызывает отчетливый цитопатический эффект (ЦПЭ): формирование многоядерного синцития (т.н. гигантских клеток), содержащего ядра разрушенных клеток. Это явление связано с гемолитическими свойствами вируса. ЦПЭ аналогичен патологическим проявлениям, наблюдаемым в инфицированных тканях, включая кожную сыпь и пятна Коплика.

1. Культивирование

Вирус кори хорошо адаптируется к росту во многих первичных и перевиваемых культурах тканей человека и животных, однако для выделения вируса от больных наиболее пригодны два типа первичных культур: ткани почек человека и ткани почек обезьян. Основа такой избирательности неизвестна, однако ее существование, впервые отмеченное Enders и Peebles, подтверждено наблюдениями во многих лабораториях. Для культивирования коревого вируса использовали также лейкоциты человека и обезьян. Размножение клеток вируса кори сопровождается образованием гигантских многоядерных клеток – симпластов, а также появлением цитоплазматических и внутриядерных включений. Вирус кори размножается медленно; требуется 2—4 дня в культуре перевиваемых клеток и 6—10 дней в первичной культуре, чтобы он достиг наивысшего титра. После этого титр вируса в культуральной жидкости остается постоянным в течение 1—3 недель, пока не разрушатся все клетки.

1. Резистентность

Вирус кори является лабильным и быстро инактивируется многими физическими или химическими агентами.

В температурном интервале 0-25° он наиболее устойчив при рН 7,0-8,0, однако изменения рН от 5,0 до 10,5 не ведут к заметному снижению титра.

При большей степени кислотности (рН 2,0-4,0) или щелочности (рН 11,0) инфекционность быстро падает. В средах, содержаших белок, вирус может долгое время храниться на холоде. После хранения от года до 5 с половиной лет при —70° инфекционность или не изменялась, или снижалась в небольших пределах. В среде с сывороткой при 4—6° титр вируса сохраняется 5 месяцев, однако при отсутствии белка инфекционность утрачивается в течение 2 недель.

При отсутствии белкового стабилизатора вирус быстро инактивируется под влиянием света.

Различные виды излучений (ультрафиолетовые, бета- и гамма-лучи, альфа-частицы, дейтроны) оказывают на вирус кори быстрое инактивируюшее действие. Как и все миксовирусы, возбудитель кори чувствителен к действию эфира и ацетона и полностью утрачивает инфекционность при взаимодействии с 20% эфиром (за 10 минут) и с 50% ацетоном (за 30 минут) при комнатной температуре. Если обработка эфиром следует за обработкой детергентом типа Твин 80, гемагглютинационные свойства вируса сохраняются, и можно получить антиген более высокого титра. Воздействие при 37° формалином (1:4000) или бета-пропиолактоном (0,01%) подавляет инфекционность вируса, сохраняя антигенность.

1. Восприимчивость животных

Вирус кори вызывает заболевание без предварительных адаптационных пассажей только у человека и некоторых приматов. Имеются штаммы вируса, которые после многих пассажей приобрели способность инфицировать другие виды животных (мыши, хомяки), вызывая в ряде случаев тяжелые заболевания. По-видимому, эти штаммы происходят от чрезвычайно редких естественных вариантов вируса, которые удалось селекционировать в благоприятных условиях, искусственно созданных в лаборатории.

1. Эпидемиология

Путь передачи инфекции — воздушно-капельный, вирус выделяется во внешнюю среду в большом количестве больным человеком со слизью во время кашля, чихания и т. д. Вирус кори по отношению к другим вирусам обладает высокой летучестью.

Источник инфекции — больной корью в любой форме, который заразен для окружающих с последних дней инкубационного периода (последние 2 дня) до 4-го дня высыпаний. С 5-го дня высыпаний больной считается незаразным.

Корью болеют преимущественно [дети](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%B1%D1%91%D0%BD%D0%BE%D0%BA) в возрасте 2—5 лет и значительно реже взрослые, не переболевшие этим заболеванием в детском возрасте. Новорожденные дети имеют колостральный [иммунитет](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82_%28%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29), переданный им от матерей, если те переболели корью ранее. Этот иммунитет сохраняется первые 3 [месяца](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%81%D1%8F%D1%86) жизни. Встречаются случаи врожденной кори при трансплацентарном заражении вирусом [плода](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%BE%D0%B4_%28%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%8F%29) от больной матери.

После перенесенного заболевания развивается стойкий иммунитет, повторное заболевание корью человека, без сопутствующей патологии иммунной системы, сомнительно, хотя и такие случаи описаны. Большинство случаев кори наблюдаются в зимне-весенний (декабрь-май) период с подъёмом заболеваемости каждые 2—4 года.

В настоящее время в странах, проводящих тотальную вакцинацию против кори, заболевание встречается в виде единичных случаев или мини-[эпидемий](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BF%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F).

Прививки от кори в России делаются уже 35 лет, что привело к снижению заболеваемостью этой инфекцией, а смертность была практически ликвидирована. В настоящее время летальные исходы встречаются только при осложненной кори (особенно при возникновении энцефалитов), у детей первого года жизни и лиц старшего возраста. В 2001 г. 30 территорий (из 89) РФ оказались свободны от кори, а на 80,0% территорий заболеваемость очень низкая и не превышает 1 случая на 100 тыс. населения.

1. Патогенез

Проникновение вируса в организм человека происходит через слизистую оболочку верхних дыхательных путей и далее с током [крови](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D1%80%D0%BE%D0%B2%D1%8C) (первичная виремия) вирус попадает в ретикулоэндотелиальную систему (лимфатические узлы) и поражает все виды белых кровяных клеток. С 3-го дня инкубационного периода в лимфоузлах, миндалинах, [селезенке](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D1%91%D0%BD%D0%BA%D0%B0) можно обнаружить типичные гигантские многоядерные клетки Warthin-Finkeldey с включениями в [цитоплазме](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BF%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B0). После размножения в лимфатических узлах вирус снова попадает в кровь, развивается повторная (вторичная) виремия, с которой связано начало клинических проявлений болезни. Вирус кори подавляет деятельность иммунной системы (возможно непосредственное поражение Т-лимфоцитов), происходит снижение иммунитета и как следствие развитие тяжелых вторичных, бактериальных осложнений с преимущественной локализацией процессов в органах дыхания. [Вирус](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81) возможно вызывает и временный [гиповитаминоз](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B8%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B7) [витамина А](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD_A).

Микроскопическая картина: слизистая дыхательных путей — отек, полнокровие сосудов, очаги некроза, участки [метаплазии](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%B0%D0%BF%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%B8%D1%8F) эпителия, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация в подслизистом слое. [Ретикулоэндотелиальная система](http://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A0%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D1%83%D0%BB%D0%BE%D1%8D%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0&action=edit&redlink=1) — клетки Warthin-Finkeldey. [Кожа](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%B6%D0%B0) — изменения в сосочковом слое [дермы](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%B6%D0%B0) в виде отека, полнокровия сосудов, кровоизлияний с периваскулярной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, фокусы [некроза](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B5%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B7) в эпидермисе.

1. Клиническая картина

Инкубационный период 8—14 дней (редко до 17 дней). Острое начало — [подъем температуры](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B8%D1%85%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%B4%D0%BA%D0%B0) до 38—40 °C, сухой кашель, насморк, светобоязнь, чихание, осиплость голоса, головная [боль](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%BE%D0%BB%D1%8C), отек век и покраснение конъюнктивы, гиперемия зева и коревая энантема — красные пятна на твердом и мягком нёбе. На 2-й день болезни на слизистой щек у коренных зубов появляются мелкие белесые пятнышки, окруженные узкой красной каймой — пятна Бельского — Филатова — Коплика — [патогномоничные](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%81%D0%B8%D0%BC%D0%BF%D1%82%D0%BE%D0%BC) для кори. Коревая сыпь (экзантема) появляется на 4—5-й день болезни, сначала на лице, шее, за ушами, на следующий день на туловище и на 3-й день высыпания покрывают разгибательные поверхности рук и ног, включая пальцы. Сыпь состоит из мелких папул окруженных пятном и склонных к слиянию.

Обратное развитие элементов сыпи начинается с 4-го дня высыпаний — температура нормализуется, сыпь темнеет, буреет, пигментируется, шелушится (в той же последовательности, что и высыпания). Пигментация сохраняется 1—1,5 недели.

1. Иммунологический ответ на естественную инфекцию

При первичной острой инфекции Т-клеточный и В-клеточный ответ может быть выявлен на большинство из шести белков вируса кори. Вначале вырабатываются как IgG-, так и IgM-антитела, однако уровень IgM-антител, максимум которого приходится на 7—10-й день после появления сыпи, быстро снижается; IgM редко сохраняются более 4 недель. Вырабатываются также сывороточные и секреторные IgA-антитела, но, как правило, кратковременно.

Присутствие IgM-антител обычно свидетельствует о первичной коревой инфекции, вызванной заболеванием или вакцинацией.

IgG-антитела появляются в крови вскоре после начала высыпания, сохраняются на максимальном уровне в течение приблизительно четырех недель, после чего их титры постепенно снижаются, но персистируют всю жизнь. Выработка IgG-антител к Н-белку является самым важным моментом в становлении иммунитета. Иммунитет после естественной инфекции обычно является пожизненным. Пассивный иммунитет, передаваемый плоду в виде IgG, защищает новорожденного в течение 6 месяцев после рождения.

1. Лабораторная диагностика

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).

* 1. Цитологическое исследование носового отделяемого.

Исследование проводят следующим образом. При помощи изогнутой стеклянной трубки с резиновым баллончиком собирают слизь из верхних носовых ходов. Материал равномерно наносят на предметное стекло, фиксируют и окрашивают по Папаниколау. Препараты, высушенные на воздухе и окрашенные по Райту, также пригодны для исследования.

Клетки крупные и многоядерные. В ранних случаях они базофильны, с хорошо сохранившимися ядрами. На этой стадии они напоминают слившийся нормальный эпителий. Некоторые синцитиальные скопления сохраняют границы с ресничками или крупными вакуолями, вероятно, принадлежащими мукозным бокаловидным клеткам. Позднее цитоплазма становится эозинофильной или оранжефильной. Ядра окрашиваются более плотно сжимаются. Иногда эти клетки содержат ярко ацидофильные рассеянные цнтоплазматические включения.

В слоях отторгнутого эпителия ядра распределены равномерно, имеют одинаковую форму и размер и не образуют скоплений. Ядра гигантских клеток варьируют в размерах и форме нередко объединены в плотные агрегаты. Гигантские клетки описанного типа не обнаруживаются у больных с инфекциями верхних дыхательных путей, аллергическими состояниями и многими экзантематозными заболеваниями, в частности краснухой, ветряной оспой и скарлатиной.

* 1. Выделение вируса в культуре ткани

1. Сбор, хранение и обработка проб.

а. Кровь. Взятие проводят шприцем с 1 мл раствора гепарина (1:2000) и сразу же (или с минимальным интервалом) вносят по 0,1—0,5 мл гепаринизированной крови в 3 пробирки с культурой ткани.

Вирус обычно связан с лейкоцитами, циркулирующими в крови, поэтому вероятность выделения вируса повышается, если заражение проводят не цельной кровью, а суспензией лейкоцитов. Лейкоциты оседают на клеточный слой; культуры инкубируют в неподвижном состоянии 4 дня до первой смены среды. Смену проводят осторожно, чтобы по возможности не переместить лейкоциты. В дальнейшем среду сменяют с недельным интервалом. Культуру периодически просматривают, следя за появлением типичных синцитиальных клеток; они обнаруживаются обычно между 4 и 12 днями культивирования.

б. Глоточное отделяемое. Больного просят прополоскать горло несколькими мл обезжиренного молока, которое затем собирают в стерильный флакон. После добавления пенициллина и стрептомицина (по 500 ЕД/мл) пробу центрифугируют 35 минут при 1500 об/мин и затем вносят по 0,2—0,5 мл в 2—3 культуры клеток.

в. Секрет конъюнктивы. Осторожно протирают конъюнктиву ватным тампоном, который затем обрабатывают, как описано выше.

г. Моча. Пробу собирают в стерильный сосуд, избегая посторонней контаминации. Доводят рН до 7,0—7,2 3% раствором двууглекислого натрия и добавляют пенициллин и стрептомицин (по 200 ЕД/мл). Всю собранную мочу центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин и 4°. Осадок ресуспендируют в 1—2 мл культуральной среды и вносят по 0,3 мл в 2—3 пробирки с культурой клеток.

2. Культуры клеток. Для выделения вируса используют только первичные культуры клеток человека или обезьян. Культуры трипсинизированных клеток почек человека, выращенные в наклонном положении, или вертикальные культуры клеток амниона человека имеют преимущество перед культурами клеток обезьян макак резусов и циномольгусов, патас и бабуинов, так как клетки человека обычно не контаминированы спонтанными вирусами.

3. Период наблюдения. В первичных культурах клеток цитопатический эффект проявляется обычно не раньше 5—10-го дня после заражения. Наблюдать культуры нужно не менее 30 дней. Один слепой пассаж может помочь обнаружить вирус при его очень низком исходном титре.

4. Идентификация вируса. Появление многоядерных гигантских клеток и постепенное разрушение клеточного слоя служит указанием на присутствие вируса. Его идентификация включает исследование окрашенных препаратов культуры для обнаружения описанных выше цитологических изменений и реакцию нейтрализации, при постановке которой используют иммунную к вирусу кори и нормальную сыворотки.

* 1. Серологическая диагностика

1. Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации можно проводить на белых мышах-сосунках, используя адаптированный штамм вируса.

а. Типы клеточных культур. Для проведения реакции нейтрализации лучше использовать перевиваемые клеточные линии, так как они более чувствительны к адаптированному вирусу кори, чем первичные культуры. Перевиваемые линии клеток человека и обезьян лишь немногим различаются в чувствительности к коревому вирусу. Другие клеточные линии, обладающие равной стабильностью и чувствительностью к вирусу, также пригодны для работы.

б. Выбор вируса. В качестве стандартного штамма можно рекомендовать штамм Edmonston на уровне относительно небольшого числа культуральных пассажей. При использовании других штаммов рекомендуется отбирать те, которые имеют одинаковый инфекционный титр со стандартным вирусом в аналогичных культурах ткани.

в. Выбор рабочей дозы вируса. В реакции нейтрализации используют обычно 100 ТЦД50 вируса, рассчитанных по данным титрования в соответствующей культуре клеток. Результаты титрования варьируют в зависимости от времени учета. Поэтому для используемого типа культур важно определить время, в течение которого цитопатогенность вируса выявляется полностью. В противном случае рабочая доза вируса может быть избыточной, а титры антител в исследуемых сыворотках окажутся неестественно низкими.

г. Титрование суспензии вируса. Основной вирусной суспензией служит жидкая фаза инфицированных культур, которую хранят при —70°. Из основной суспензии готовят разведения на культуральной среде. Каждое разведение вносят в 3—5 пробирок с культурой ткани, помещают их в термостат (37°) и периодически просматривают, следя за появлением цитопатических изменений. Титр рассчитывают по методу Кербера и выражают как lg ТЦД50 в 1 мл или в 0,1 мл.

д. Сыворотки. Берут 5 мл крови, соблюдая предосторожности, чтобы избежать гемолиза, так как сыворотка может потребоваться для реакции связывания комплемента. Кровь оставляют в пробирке до образования сгустка, сыворотку отделяют и инактивируют 30 минут при 56°. Разведения сыворотки готовят на растворе Хэнкса.

Постановка реакции. Для большей точности можно использовать по 5 пробирок культуры на каждое разведение сыворотки. При обычной работе, в частности для определения диагностически значимого подъема титра антител, достаточно 2—3 пробирок. Исходную суспензию вируса разводят культуральной средой до концентрации 100 ТЦД50 в 0,1 мл. Это разведение вируса добавляют в равном объеме к разведениям сыворотки: смеси выдерживают час при 4°, после чего вводят каждую из них в 2—5 пробирок по 0,2 мл и помещают в термостат (37°). Для контроля титра вируса в исходной суспензии готовят три ее разведения, содержащие 100,10 и 1 ТЦД50 в 0,2 мл, заражают каждым из них группу пробирочных культур по 0,2 мл на пробирку и помещают их в термостат вместе с основным опытом. Для контроля чувствительности опыта включают лабораторную стандартную иммунную сыворотку, прошедшую сравнение с эталонной сывороткой.

Интерпретация результатов и их диагностическое значение. При помощи реакции нейтрализации можно получить подтверждение клинического диагноза или установить наличие инфекции в прошлом и невосприимчивость к кори в момент обследования. Для подтверждения диагноза одновременно исследуют сыворотку, взятую в острой фазе болезни, и сыворотку, полученную в стадии реконвалесценции. Появление антител или 4-кратное (и выше) нарастание их титра рассматривают как подтверждение коревой инфекции. Обнаружение вируснейтрализующих антител в любом титре можно считать подтверждением прошлой инфекции, а также невосприимчивости к заражению в период исследования. Наблюдения показывают, что лица даже со следами антител не заболевают при контакте с больными. В нормальном организме инфекция вирусом кори, как правило, вызывает быстрое образование антител.

2. Реакция связывания комплемента.

Методы проведения реакции при кори не отличаются существенно от применяемых с другими вирусными антигенами. Реакция дает вполне удовлетворительные и воспроизводимые результаты при постановке в пробирках, микрообъемах или капельным методом.

а. Приготовление антигена. Антигены можно готовить на многих типах клеточных культур — первичных культурах клеток почек человека, обезьян (резус и циномольгус) и собак, перевиваемых линиях клеток приматов. В качестве источника для получения антигена обычно используют жидкую фазу инфицированных культур или смесь ее с экстрактом инфицированных клеток. Антиген накапливается медленно, поэтому культуры следует тщательно поддерживать некоторое время после широкого распространения цитопатического эффекта в клеточном слое.

Обычно рабочим правилом является проведение сбора материала для антигена не ранее 7 дней после основательного развития цитопатического эффекта. Чтобы увеличить выработку антигена, культуры заражают максимально возможной дозой вируса. Некоторое повышение титра антигена достигают 3-кратным попеременным замораживанием и оттаиванием культур перед сбором жидкости в смеси сухого льда и спирта. Это способствует освобождению вирусного антигена из клеток. Собранный и смешанный материал прогревают 30 минут при 56° для инактивации вируса и центрифугируют 15 минут при 2000 об/мин. На-досадочную жидкость (антиген) разливают в плотно закрывающиеся флакончики. При —15° антиген можно хранить в течение многих месяцев.

б. Сыворотки. Сыворотки людей инактивируют 30 минут при 56° исразу же исследуют или хранят при 15°-20°. Сыворотки обезьян могут приобретать некоторую степень антикомплементарности.

в. Техника реакции связывания комплемента при кори.

Стандартный метод проведения реакции связывания комплемента в пробирках является модификацией метода Колмера. Используют 2 единицы комплемента, связывание проводят при 5° в течение 16—18 часов. Антигены и сыворотки берут в объемах по 0,25 мл, комплемент и взвесь сенсибилизированных эритроцитов — по 0,5 мл. Антиген готовят из штамма Edmonston на относительно низком пассажном уровне, выращивание проводят на перевиваемых клетках FL амниона человека. Титр антигена соответствует наибольшему разведению, связывающему комплемент в присутствии 4 единиц антител, и составляет обычно 1:4. Титр антител соответствует наибольшему из двукратных разведений сыворотки, дающему связывание на 4+ или 3+.

3. Реакция торможения гемагглютинации.

а. Приготовление гемагглютинина. Клеточные культуры, пригодные для получения гемагглютинина вируса кори, включают перевиваемые линии клеток KB, клеток Lu 106—легкого эмбриона человека, первичные культуры почечных клеток обезьян бабуинов, почечных клеток собак и ряд других перевиваемых линий и первичных культур. Выработка гемагглютинина в клетках почек собак протекает медленнее, чем в клетках перевиваемых линий, однако его конечные концентрации вполне сравнимы с получаемыми в других типах культур, а иногда оказываются более высокими. Согласно имеющимся данным, высокие инфекционные титры соответствуют тем клеточным системам, где размножение вируса достигает наибольших уровней.

В период выработки гемагглютинина применяют разнообразные поддерживающие среды. Для клеток KB пригодна среда 199 с 5% куриной или телячьей сыворотки; для культур ткани почек собак — среда с коровьей амниотической жидкостью или среда, состоящая из 0,5% гидролизата лактальбумина и 2% инактивированной телячьей сыворотки в растворе Эрла.

Культуры заражают неразведенной вирусной суспензией высокого титра и инкубируют в термостате до тех пор, пока цитопатический эффект не проявится в 50—100% клеток. После этого культуры трижды попеременно замораживают и оттаивают, смешивают полученную жидкость и удаляют взвешенные частицы центрифугированием 20 минут ар и 1500 об/мин.

Гемагглютинационный титр такого препарата обычно низок, поэтому проводят дополнительную концентрацию антигена. Один из применяемых методов концентрации заключается в добавлении к жидкости 0,06% желатина, центрифугировании 90 минут при 30000 об/мин, удалении 9/10 надосадочной жидкости и ресуспендировании осадка в оставшейся 1/10.

Метод, предложенный Norrby, позволяет получить гемагглютинин достаточно высоких титров, пригодный для практического использования без дополнительной концентрации. Культуры перевиваемых клеток легкого эмбриона человека (линия Lu 106) или первичные культуры клеток собачьих почек заражают неразведенным вирусом (штамм Edmonston) и инкубируют при 33°. Среду сменяют через 2—3 дня. Когда все (или почти все) клетки окажутся пораженными, культуры подвергают троекратному попеременному замораживанию и оттаиванию и собирают культуральную жидкость. Добавляют Твин 80 в концентрации 0,125% при постоянном помешивании на холоде (можно при комнатной температуре). Затем на холоде при постоянном помешивании добавляют эфир (половину объема обрабатываемого материала) и продолжают перемешивание 15 минут. Центрифугируют 20 минут при 3000 об/мин, отбирают водную фазу и удаляют из нее остатки эфира пропусканием газообразного азота. Такая обработка препаратов, полученных на клетках Lu 106, увеличивает титр гемагглютинина в 4—8 раз, а полученных на клетках почек собак-в 8-32 раза. Без добавления Твина 80 обработка эфиром снижает титр гемагглютинина.

б. Сыворотки. Проводят инактивацию сывороток 30 минут при 56°. Так как некоторые сыворотки человека и различных животных (например, кроликов) содержат агглютинины к эритроцитам обезьян, рекомендуется провести адсорбцию каждой сыворотки при 4° в течение ночи с равным объемом 50% взвеси обезьяньих эритроцитов, которые затем удаляют центрифугированием или осторожным отсасыванием отстоявшейся за ночь сыворотки.

в. Эритроциты. Подходящими для реакции являются эритроциты бабуинов, макак резусов, обезьян патас и зеленых мартышек. Кровь собирают и хранят в растворе Алсивера. Перед употреблением эритроциты отмывают трижды в физиологическом растворе. В опыте используют 0,5% взвесь эритроцитов в физиологическом растворе.

г. Титрование гемагглютинина. Для титрования можно использовать пробирки или пластмассовые пластины с лунками. При титровании в пробирках приготавливают двукратные разведения антигена в фосфатно-буферном солевом растворе при рН 7,2. К 0,4 мл каждого разведения добавляют 0,2 мл 0,5% суспензии эритроцитов в том же растворе. Пробирки встряхивают и выдерживают час при 38°. Оценку гемагглютннации проводят, как при работе с другими гемагглютинирующими вирусами. Наибольшее разведение антигена, вызывающее полную или частичную агглютинацию, считают содержащим 1 гемагглютинирующую единицу. При использовании пластмассовых пластин техника идентична, но объем каждого из ингредиентов, вносимых в лунку, снижают до 0,2 мл; в качестве разбавителя можно использовать физиологический раствор.

Проведение опыта. При проведении реакции в пробирках все ингредиенты разводят фосфатно-буферным солевым раствором. К 0,2 мл каждого разведения сыворотки добавляют 4 единицы гемагглютинина в объеме 0,2 мл. Смеси выдерживают час при комнатной температуре и добавляют в каждую пробирку 0,2 мл 0,5% взвеси обезьяньих эритроцитов. Пробирки встряхивают и выдерживают 30—60 минут при 37° до полного формирования осадка. Титры соответствуют наибольшим разведениям сывороток, вызвавшим полное торможение гемагглютинацин. При использовании пластмассовых пластин техника идентична, но объемы каждого из ингредиентов снижают до 0,1 мл, а концентрацию эритроцитов во взвеси доводят до 1%. В качестве разбавителя можно использовать физиологический раствор.

Интерпретация результатов. При исследовании двух проб сыворотки-ранней и реконвалесцентной—нарастание титра антител в 4 раза и выше рассматривают как результат, согласующийся с диагнозом кори. Обнаружение специфических антигемагглютининов к вирусу кори в единичной пробе сыворотки рассматривают как указание на инфекцию в прошлом и на наличие невосприимчивости к кори в период исследования. Отсутствие антигемагглютинина, в частности в низком разведении сыворотки (1:2), свидетельствует обычно о восприимчивости к коревой инфекции.

1. Лечение

Симптоматическое, в случае развития пневмонии или других бактериальных осложнений показаны [антибиотики](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8), в тяжелых случаях крупа используются кортикостероиды. [Рибавирин](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B8%D0%B1%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BD) показал свою эффективность [in vitro](http://ru.wikipedia.org/wiki/In_vitro). Для профилактики и лечения могут использоваться большие дозы [витамина А](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD_A).

1. Специфическая профилактика. Препараты, применяемые против кори

Первая вакцинация делается детям в 12 месяцев, в 20 месяцев и 6 лет проводят ревакцинацию.

1. Гамма-глобулин сыворотки человеческой крови для профилактики кори

С целью предупреждения заболеваний корью и борьбы с летальностью при этой инфекции у детей, находившихся в контакте с коревыми больными, создают пассивный иммунитет путем введения антител против возбудителя кори. Для целей профилактики кори теперь применяется исключительно гамма-глобулин, выделенный из крови взрослых людей, в прошлом переболевших корью, исходным материалом для получения противокоревого гамма-глобулина служит венозная кровь доноров, а также плацентарная кровь и экстракты плацент, полученных от здоровых рожениц. Допускается использование абортной крови, причем полученный из нее гамма-глобулин выпускается отдельными сериями.

Каждая серия гамма-глобулина готовится из сывороток, полученных не менее чем от 1000 человек.

Для первичной обработки собранной крови при областных (городских) санэпидстанциях созданы специальные лаборатории, назначением которых является получение сыворотки, которая пересылается в институты, изготавливающие гамма-глобулин.

Прозрачная сыворотка до дальнейшей обработки сохраняется при температуре от 0 до 4° не более 7 дней. Чтобы удлинить срок хранения, сыворотку подвергают стерилизующей фильтрации. В качестве консерванта применяется хлороформ (0,5%).

При использовании плацент производится экстрагирование содержащихся в них антител с помощью 2% раствора хлористого натра, добавляемого в количестве 1,5-2 литра на килограмм измельченных плацент. Экстрагирование продолжается в течение суток при 0°, смесь систематически перемешивается. После отделения тканевой массы путем фильтрации через полотно и центрифугирования для удаления эритроцитов и мелкодисперсного осадка получается готовый плацентарный экстракт, представляющий собой прозрачную, красноватого цвета жидкость, содержащую 1—2% белка. До дальнейшей обработки он сохраняется при 0°.

Заготовленное сырье (сыворотка из венозной, плацентарной крови, плацентарный экстракт) подвергается фракционированию спирто-водными растворителями для выделения гамма-глобулина. Плацентарная сыворотка и экстракты обрабатываются для этой цели несколько иначе, чем сыворотка, полученная из венозной крови. Принципиальное отличие сводится к введению дополнительной очистки их перед фракционированием и после первого осаждения. Эта процедура имеет целью удалить примеси, нерастворимые при низких (8%, 5%) концентрациях спирта.

Готовый гамма-глобулин представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую жидкость, бесцветную или желтоватую.

Гамма-глобулиновая фракция составляет 97% общего белка препарата. Каждая ампула содержит одну дозу гамма-глобулина, т. е. 3 мл 10%-ного белкового раствора. Помимо общего и специального контроля каждая серия гамма-глобулина проходит контроль на трех здоровых детях для выяснения реактогенности. Препарат признается ареактогенным, если введение его не приводит к развитию местных воспалительных явлений и подъему температуры выше 37,5°.

Серии гамма-глобулина с повышенной реактогенностыо выпуску не подлежат. Гамма-глобулин годен к употреблению в течение трех лет со времени получения сыворотки, из которой он приготовлен. Препарат хранится при температуре 2—10° в темном месте. Обычной дозой при своевременном применении является 1,5 мл гамма-глобулина. Наиболее эффективным является введение препарата в первые 4 дня инкубации, после седьмого дня инкубации эффективность препарата резко падает.

Если при контакте с коревым больным были ослабленные и больные дети, а также при позднем введении препарата доза его увеличивается до 4 5 мл. Гамма-глобулин вводится внутримышечно в верхний наружный квадрант ягодины при строжайшем соблюдении асептики. Учитывая вязкость, связанную с высоким содержанием белка, во избежание образования пены, препарат нужно набирать в шприц медленно, хорошо пригнанной иглой с широким просветом.

Введение гамма-глобулина создает пассивный иммунитет, оказывающий свое действие в течение 30 дней. При повторном контакте с больными корью после этого срока детям вновь вводится гамма-глобулин в объеме не менее 2-х мл. Противопоказаний к применению гамма-глобулина нет. При своевременном введении этот препарат является надежным средством профилактики кори. Он с успехом применяется также для профилактики полиомиелита, инфекционного гепатита, краснухи, паратита и др.

2. Коревые вакнины

Специфическая профилактика кори до настоящего времени осуществлялась путем создания пассивного искусственного иммунитета. В последние годы разработаны методы приготовления живых коревых вакцин, позволяющих создать активный искусственный иммунитет. В нашей стране изучаются в широком эпидемиологическом опыте коревые вакцины трех типов. Действующим началом всех вакцин являются живые, аттенуированные штаммы коревого вируса. Отличаются они одна от другой особенностями штаммов, способами их аттенуации и степенью реактогенности.

3. Живая коревая вакцина для введении без гамма-глобулина

Препарат представляет собой высушенную вирус-содержащую жидкость, снятую с первичной культуры почек морских свинок (П. М. С.).

Основное действующее начало его живой аттенуированный вирус (штамм Л-16, Ленинград), предложенный А. А. Смородинцевым, ослабленный в результате многократных (16 – 25) пассажей в тканевой культуре П. М. С.

Вакцина контролируется на бактериальную стерильность, биологическую активность, отсутствие случайных возбудителей, которые могут попасть из культуры ткани (цитопатогеиные и гемадсорбирующие вирусы, вирус лимфоцитариого хориомениигита и другие вирусы, микобактерии).

Биологическую активность вакнины проверяют на амниотических перевиваемых клетках человека.

Для проверки специфичности используется реакция нейтрализации цитопатических изменений в культуре амниотической ткани человека эталонной противокоревой сывороткой, полученной от лошадей или других животных (только не от морских свинок).

Безвредность и токсичность контролируются на морских свинках путем введения двух миллилитров вакнины, в течение пяти дней животные должны быть здоровы.

Для установления степени реактогенности препарат в дозе 0,5 (30—300 тканевых 50%-ных цитопатогенных доз ТЦД50 вводится 25 детям в возрасте от одного года до восьми лет. Он признается ареактогеиным в том случае, если в течение 72 часов после введения реакция у привитых отсутствует. Позже (через 6 -18 дней; могут возникать реакции, при которых появляются симптомы митигированной кори, не передающейся здоровым детям, находящимся в контакте с привитым. Иммуногенность вакцины оценивают на основании серологического обследования (по РСК, РН, ТРГА) парных сывороток двадцати детей, привитых вакциной.

Она считается иммуногенной, если стимулирует выработку антител не менее чем у шестнадцати детей. Вакцина выпускается в сухом виде. Предназначена для создания искусственного активного иммунитета против кори у детей, не болевших ранее. Прививке подлежат дети в возрасте от одного года до восьми лет. Поздние реакции, описанные выше, могут развиваться у 40— 60% привитых.

Вакцина вводится подкожно, однократно, в дозе 0,5 мл, содержащей аттенуированный вирус кори в количестве 30—300 ТЦД50. Ослабленным детям одновременно с вакциной вводят 0,5 мл гамма-глобулина.

4. Живая коревая вакцина института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (ЖКВ АМН СССР)

Препарат представляет собой высушенную вируссодержащую жидкость, снятую с первичной культуры почек зеленых мартышек. Основное действующее начало его — живой аттенуированный вирус кори, адаптированный к клеточным культурам почек африканских зеленых мартышек.

Указанный вирус является вариантом штамма коревого вируса, выделенного от больного и аттенуированного Эндерсом. Дополнительно от больного он был аттенуирован Шварцем. В СССР степень его аттенуации была повышена путем адаптирования к культурам почек обезьян при температуре 32°.

Он получил название: «штамм коревого вируса ЭШЧ» — по первым буквам работавших с ним авторов (Эндерс, Шварц, Чумаков). Штамм характеризуется высокой иммуногенностью и низкой реактогенностью при введении, без гамма-глобулина, детям, не болевшим корью.

Всесторонне проверенный штамм, сохраняемый при — 70°, предназначен для многократного использования на производстве. Живая коревая вакцина контролируется на стерильность, безвредность, отсутствие токсичности для лабораторных животных. Она не должна содержать посторонних вирусных агентов. Заражение вакциной чувствительных к коревому вирусу обезьян не приводит к появлению нейросимптомов. На культурах клеток, при 32°, вакцина вызывает характерную дегенерацию, специфичность которой может быть проверена реакцией нейтрализации специфической сывороткой. Активность вакцины определяется количеством содержащихся в ней культуральных единиц вакцинного коревого вируса. Вакцина признается иммуногенной в том случае, если она стимулирует развитие антител не менее чем у 90% привитых детей. Введение вакцины детям не должно приводить к появлению симптомов кори, передающихся путем контакта непривитым. Препарат нетоксичен; в течение 72 часов после его введения не возникает никаких реакций; позже, через 6—18 дней, у 40% привитых могут наступить реакции, проявляющиеся в кратковременном повышении температуры (не выше 38,5°) и, в ряде случаев, в появлении отдельных симптомов митигированной кори. Вакцина вводится подкожно, однократно, в дозе 0,2—0,5 мл, содержащей не менее 1000 и не более 300000 культуральных единиц аттенуированного вируса кори. Ревакцинация проводится через 2—3 года по эпидемиологическим показаниям. Вакцина выпускается в сухом виде. Срок годности ЖКВ—1 год.

5. Живая коревая вакцина на человеческих диплоидных клетках из штамма Л-16.

Препарат представляет собой вируссодержащую жидкость, полученную при выращивании аттенуированного вируса кори (штамм Л-16) в культуре диплоидных клеток эмбриона человека. Для этих целей используется стандартный штамм перевиваемых диплоидных клеток человека, полученный из международного центра. Сохраняется он в замороженном состоянии (в жидком азоте). Перед введением в производство диплоидные клетки из каждой ампулы проходят тщательный бактериологический, микологический, вирусологический и гистологический контроль. Готовая вакцина проверяется по тем же показателям, что и первые две. Она должна быть стерильной, безвредной, биологически активной, не вызывать у привитых детей реакций в ранние сроки (72 час) и приводить к развитию вакцинальных реакций через 6—18 дней после прививки. Вакцинальные реакции проявляются в повышении температуры и симптомах митигированной кори. Число сильных реакций не должно быть выше 12%. Вакцина признается иммуногенной, если она вызывает образование антител не менее чем у 80% привитых. Вакцина вводится подкожно, однократно, в дозе 0;5 мл, содержащей от 50 до 300 ТЦД50, детям в возрасте от 1 года до 8 лет, не болевшим корью и не привитым ранее. Срок годности вакцины — 1 год.

6. Коревой гемагглютинирующий антиген

Готовится из вируссодержащей культуральной жидкости, полученной при выращивании вакцинного штамма (Л-4 или эдмонстон) вируса кори в культуре клеток и обработанной Твином-80 и эфиром или ультразвуком.

Действующим началом препарата являются гемагглютинины вируса кори; применяется он для определения коревых антител в гамма-глобулинах и сыворотках с помощью реакции торможения гемагглютинации. Гемагглютинин выпускается с титром 1:32. Специфичность его проверяется в РН противокоревым стандартным гамма-глобулином. Срок годности жидкого препарата — 9 месяцев, сухого— 12 месяцев.

Список использованной литературы

1. Мордовина, Л.Г. Бактерийные и вирусные препараты. / Л.Г. Мордовина, Л.Л. Зайцева, Р.М. Подгорбунская – Томск: Изд. ТГУ, 1971. - 308 с.
2. Дзагуров, С.Г. Справочник по применению бактерийных и вирусных препаратов. – М.: Медицина, 1975. - 222 с.
3. Покровский, В.И. Медицинская микробиология./ В.И. Покровский, О.К. Поздеев – М.: Гэотар медицина, 1999. - 1200 с.
4. Шуба, Г.М. Основы медицинской бактериологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие / Г. М. Шуба – М.: Логос, 2003. – 254 с.
5. Микробиология и иммунология: Учебник/ Под ред. А.А. Воробьева. – М.: Медицина, 1999.