

ЭТИОЛОГИЯ И ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА

Проф. С. М. ВЯСЕЛЕВА

Из кафедры микробиологии Казанского института усовершенствования
врачей имени В. И. Ленина

Несмотря на то, что грипп, как эпидемическое заболевание, известен уже много столетий, научно обоснованные данные о его возбудителе относятся к 1931—1933 гг. и связаны с успехами молодой дисциплины — вирусологии. Лишь исторический интерес представляют исследования бактериологов конца прошлого столетия, пытавшихся открыть возбудителя гриппа бактериологическими методами. Так, в 1889 г. Афанасьев, а в 1892 г. — Пфейффер обнаружили в мокроте больных маленькие, неподвижные грам-отрицательные палочки, с трудом культивируемые на питательных средах. Эти палочки, названные палочками инфлюэнцы, и были ими описаны как возбудитель гриппа.

Однако, дальнейшая проверка не подтвердила этого: оказалось, что они нередко находятся в носоглотке здоровых людей и могут отсутствовать у больных. Выяснилось, что эти палочки, так же, как и грам-положительные кокки, способны вызывать вторичные инфекции, осложняющие гриппозную.

В 1931—32 гг. Шоуп, изучая возбудителя инфлюэнцы свиней, обнаружил, что заболевание животных происходит только тогда, когда они одновременно инфицируются палочкой, сходной с палочкой инфлюэнцы, и фильтрующимся вирусом.

В 1933 г. Смит, Эндрюс и Лейдлоу получили фильтрующийся вирус из носоглоточных смывов людей, больных гриппом. Белые хорьки, зараженные интраназально фильтратами носоглоточных смывов, заболевали тяжелым катаром верхних дыхательных путей. Инфекция была заразной: здоровые хорьки, находившиеся вместе с больными, также заболевали.

А. А. Смородинцеву и Тушинскому удалось капельным аэрогенным путем заразить хорьковым вирусом людей-добровольцев. У заболевших развивалась характерная клиническая картина гриппа с наличием лейкопении. Таким образом была доказана вирусная этиология гриппа.

В настоящее время установлено, что вирус гриппа проходит через бактериальные фильтры типа Зейтца, Беркефельда — V и N и Шамберлана — L₂ и L₅. Методами фильтрации, ультрацентрифугирования и электронной микроскопии определены размеры вирусных частиц: они колеблются от 80 до 120 миллимикрон. Есть указания на то, что частицы вируса А несколько меньше частиц вируса В.

Форма этих частиц, изученная в электронном микроскопе (рис. 1 и 2), представляется чаще круглой, а у вируса А — эллипсоидной или бобовидной. Кроме того, имеются палочковидные и нитевидные формы различной величины, встречающиеся особенно часто в аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов. Возможна фрагментация палочковид-

ных форм на круглые. Хойл предполагает, что продолговатые формы состоят из липондной оболочки, заключающей в себе круглые образования.

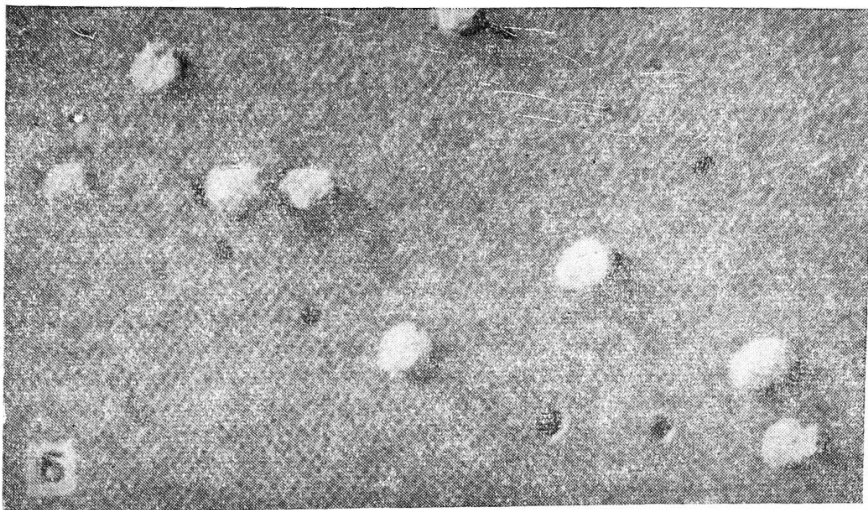


Рис. 1.

Вирус гриппа. Электронная микроскопия, увеличение в 40000 раз (по Т. Риверсу).

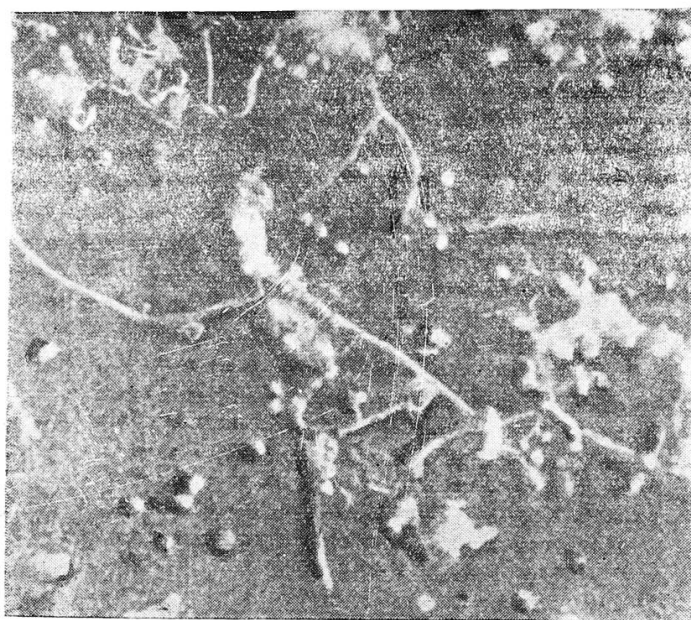


Рис. 2.

Вирус гриппа. Электронная микроскопия, увеличение в 11,333 раза (по Г. Маковер).

Методом ультрацентрифугирования вирус гриппа удастся разделить на 3 фракции с различными скоростями осаждения. Первая фракция состоит из круглых частиц со специфическими антигенными и инфекцион-

ными свойствами. Вторая — «растворимая субстанция» — в действительности имеет частицы около 10 микрон, она не инфекционна, но обладает антигенными свойствами. Третья фракция, с более низким коэффициентом осаждения, близка к второй.

Химическое изучение гриппозного вируса показало, что он состоит из воды, тимонуклеиновой и рибонуклеиновых кислот, полисахаридов, липоидов, аминокислот. В составе вируса А несколько больше аминокислот и по качеству они имеют отличия. Товарницкий предполагает, что в основе образования новых вирусных разновидностей лежит изменение аминокислот.

Количество устанавливаемого в вирусе белка зависит от степени его очистки; обнаружены кислые и нейтральные белки.

Вирус гриппа малоустойчив к внешним воздействиям. При нагревании до 60°С инактивируется через 5—10 минут. При воздействии солнечного света, ультрафиолетовых лучей быстро погибает. Высушивание переносит плохо, однако, будучи высушенным в вакууме и при низкой температуре, сохраняется долгое время. Вирус малоустойчив к дезинфицирующим веществам.

Вирус гриппа так же, как и другие фильтрующиеся вирусы, не культивируется на искусственных питательных средах. Из применяемых методов культивирования наиболее подходящим оказался метод выращивания на куриных эмбрионах, причем лучшие результаты получаются при заражении в амниотическую и аллантоисную полости зародыша. После двух-трехсуточного инкубирования в термостате, инфицированные яйца вскрываются и подвергаются изучению. Эмбрион убивают только некоторые, хорошо адаптированные к куриным зародышам, штаммы.

Наблюдаются гистопатологические изменения и набухание оболочек. Аллантозная жидкость, при соответствующем методе заражения, становится токсичной для нормальных зародышей и начинает давать реакцию гемагглютинации. Концентрация вируса прямо пропорциональна титру гемагглютинации.

Кроме указанного способа культивирования, за последнее время начинает практиковаться метод тканевых культур, особенно во вращающихся пробирках.

Вирус гриппа был первым среди ряда других вирусов, у которых обнаружена способность агглютинировать эритроциты (Херст, 1941 г.). Лучше всего реакция агглютинации получается с эритроцитами кур, морских свинок и человека.

Механизм реакции представляется в следующем виде: в первой фазе реакции происходит быстрая адсорбция вируса на поверхности эритроцитов; в следующей фазе наступают физико-химические изменения их поверхности, уменьшается стабильность взвеси, в результате чего они склеиваются (Еремеев). В дальнейшем комплекс: вирус — эритроцит — может подвергнуться диссоциации. После этого эритроциты теряют способность повторно агглютинироваться вирусом.

Если смешать вирус гриппа со специфической иммунной сывороткой, то гемагглютинация не происходит. На этом основана реакция торможения гемагглютинации.

По некоторым данным, вирусные частицы имеют фермент, разлагающий мукопротеиновые вещества на поверхности эритроцитов и некоторых других клеток. Взаимодействие между гриппозным вирусом и клетками дыхательных путей напоминает взаимодействие между вирусом и эритроцитами.

Токсические свойства вируса еще недостаточно изучены. Известно следующее: токсический фактор тесно связан с вирусными частицами и не поддается диализу. Токсическая активность не является результатом

размножения вируса. При внутримозговом введении вируса белым мышам через 12—48 часов у животных появляются судороги и в дальнейшем наступает смерть. Токсическим действием объясняется помутнение роговицы при введении вируса в переднюю камеру глаза кролика. Токсическое действие вируса гриппа А нейтрализуется иммунной сывороткой против вируса А, но не вируса В, и наоборот.

Наиболее чувствительными к гриппозному вирусу экспериментальными животными являются хорьки, белые мыши, крысы и некоторые другие грызуны. Наибольшее значение имеет инфекция, воспроизводимая на белых мышах, тем более, что Зильбер и Фалькович предложил ее как метод выделения вируса от больных людей.

Мышей обычно заражают интраназально под легким эфирным наркозом или ингаляционным способом. После двух-четырехдневной инкубации у них развивается пневмония. Животные становятся вялыми, шерсть взъерошивается. Сроки гибели мышей зависят как от количества введенного вируса, так и от применяемого штамма. Есть указание на то, что белые мыши более чувствительны к вирусу А, нежели к А₁ или В.

В серологическом отношении штаммы гриппозного вируса неоднородны. В 1940 г. Френсис и Меджилл выделили штаммы, отличающиеся по антигенным свойствам от ранее известных. Новые штаммы были обозначены типом В, в отличие от прежних, названных типом А. В дальнейшем Тейлор выделил третий тип вируса — С, который, по его данным, кроме серологических отличий, выделяется еще и тем, что агглютинирует куринные эритроциты только при 4° С.

По данным Л. Я. Закстельской, М. А. Яхно и В. А. Ефимовой, вирус С циркулировал и в Советском Союзе, поскольку антитела к нему обнаружены у ряда лиц, проживающих в Московской области. Позже был установлен подтип А₁, получивший довольно широкое распространение и у нас, и за рубежом. В Японии, а в 1956 г. и в Советском Союзе — на Дальнем Востоке и в Москве — обнаружен новый серологический тип вируса — Д. Указывается, что этот вирус вызывает дегенерацию в культуре фибробластов легочной ткани человеческого эмбриона.

Чжу-Цзи-мин и другие исследователи из Чангунского института вакцин и сывороток сообщили о том, что эпидемия гриппа, имевшая место в Китае в феврале — апреле этого года, была вызвана особым вирусом типа А, резко отличающимся по антигенной структуре от ранее известных штаммов. Эти штаммы были названы в дальнейшем вирусом А₂. При изучении многих штаммов, выделенных летом текущего года в Советском Союзе, было установлено, что они тоже могут быть отнесены к вирусу А₂.

При этом различают два его варианта: авидный, хорошо реагирующий со специфической сывороткой, и неавидный, плохо соединяющийся с сывороткой. По сообщению В. М. Жданова, к новому вирусу имеется высокая восприимчивость населения, так как иммунитет к вирусам А и А₁ не предохраняет от него.

Характерна для гриппозного вируса его изменчивость. Изменяться могут токсические, инфекционные, гемагглютинирующие и антигенные свойства вирусов.

Во время эпидемической вспышки нетрудно поставить диагноз гриппа, а в межэпидемический период диагностика сильно затрудняется, ввиду сходства симптомов этой инфекции с острыми катарами дыхательных путей и с некоторыми другими заболеваниями. В таких случаях серьезную помощь может оказать лабораторная диагностика. Кроме того, только методами лабораторных исследований можно установить тип возбудителя гриппа.

Для ранней диагностики гриппа применяется выделение вируса из

носоглоточных смывов. Однако, применение этого метода возможно только в вирусологической лаборатории с необходимой аппаратурой.

Сущность этого метода, вкратце, заключается в следующем: в первые дни заболевания у больных берутся носоглоточные смывы, обрабатываются антибиотиками для подавления посторонней микрофлоры и вводятся в амниотическую полость 10—11-дневных куриных эмбрионов. Зараженные эмбрионы инкубируются при 37° С 2—3 суток, после чего для обнаружения размножившегося вируса ставится реакция гемагглютинации с амниотической жидкостью, а для определения типа вируса — реакция торможения гемагглютинации с типовыми противогриппозными сыворотками.

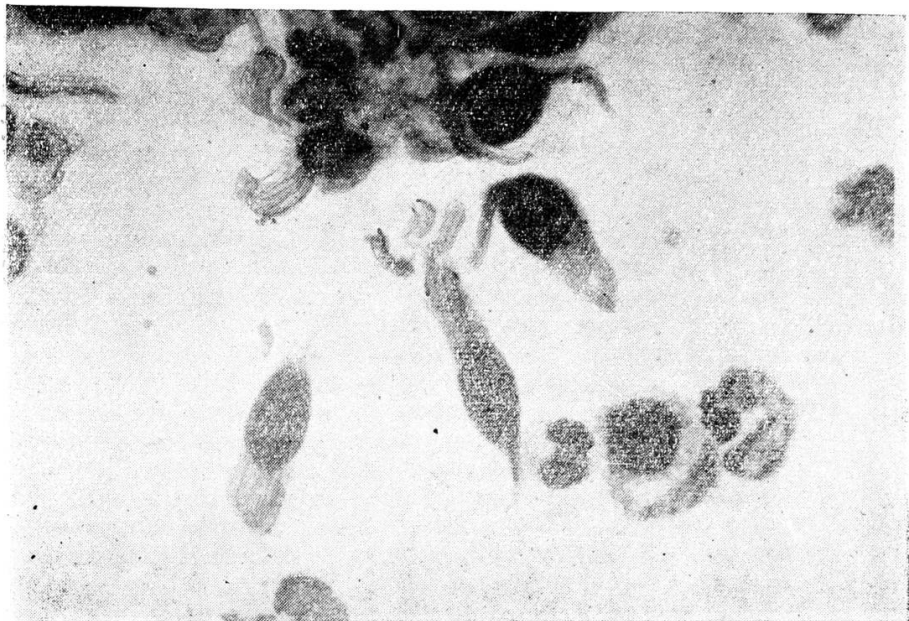


Рис. 3.

Отпечаток слизистой носа при гриппе. Клетки цилиндрического эпителия (по Ф. Т. Эпштейн).

Из других предложенных методов ранней диагностики гриппа наиболее простым является риноцитоскопия, разработанная Е. А. Колядицкой под руководством А. А. Смородинцева. При быстром размножении вируса в верхних дыхательных путях больного происходит слущивание клеток цилиндрического эпителия, чего не бывает при острых катарах. Для обнаружения этого в носовую полость больного вводится узкое отшлифованное стеклышко, которое слегка прижимается к стенке носа, противоположной носовой перегородке. Мазки-отпечатки высушиваются и окрашиваются вначале краской Май-Грюнвальда, а затем — Гимза-Романовского. В положительном случае при микроскопировании видны в большом количестве клетки цилиндрического эпителия (рис. 3. и 4). Однако, нужно иметь в виду, что сходная морфологическая картина может быть и при некоторых других заболеваниях слизистой носа.

В. Е. Пигаревский и О. М. Чалкина (1957 г.) предложили модификацию этого метода, которая, по заключению авторов, дает более четкие результаты.

Видоизменение заключается в том, что мазки-отпечатки из полости носа без фиксации окрашиваются сначала красителем, состоящим из

водных растворов метилового зеленого пиронина, а затем, после промывания, докрашиваются красителем Селлера. Последний представляет из себя растворы основного фуксина и метилового синего в метиловом спирту. При микроскопировании таких препаратов в клетках цилиндри-



Рис. 4.
Отпечаток слизистой носа при остром катаре. Лейкоциты. Клеток цилиндрического эпителия нет (по Ф. Т. Эпштейн).

ческого эпителия обнаруживаются крупные, округлые фуксинофильные включения (рис. 5). Авторы указывают, что эти включения встречаются только при гриппозной инфекции.

В 1949 г. М. А. Морозов предложил микроскопическое исследование мазков, взятых со слизистой оболочки носа и конъюнктивы глаза. В препаратах из мазков, посеребренных по Морозову, обнаруживаются очень мелкие точечные тельца, рассматриваемые автором как элементарные тельца вируса гриппа.

По данным Л. Д. Княzewой (1957 г.), этот метод исследования может быть применен как вспомогательный для ранней диагностики гриппа. В первые 3 дня заболевания диагноз подтверждается им примерно в 55%.

В качестве раннего метода диагностики гриппа А. А. Смородинцев рекомендует выявление гриппозного антигена в носоглоточных смывах путем постановки реакции связывания комплемента. Но эта реакция доступна далеко не всем практическим лабораториям.

Для ретроспективной диагностики можно проводить серологические исследования с постановкой реакций: торможения гемагглютинации, свя-

зывания комплемента и нейтрализации. Наиболее доступна из них первая. Убедительным для гриппозной инфекции является нарастание антител к тому или другому типу вируса во время заболевания.

Методика реакции торможения гемагглютинации в основном такова: готовятся разведения сыворотки больного от 1:10 до 1:2560 в объеме

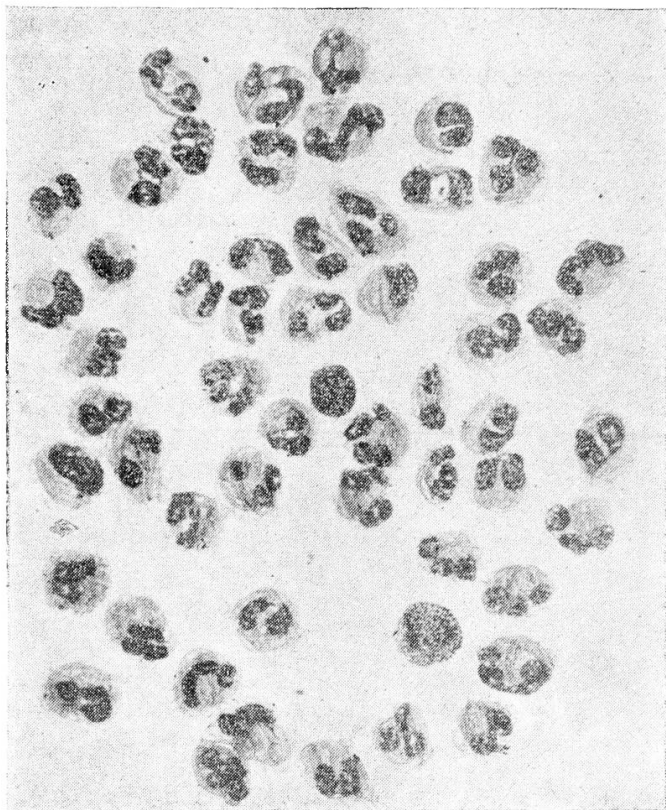


Рис. 5.

Отпечаток слизистой носа при гриппе. Фуксинофильные включения в клетках цилиндрического эпителия (по В. Е. Пигаревскому и О. М. Чалкиной).

0,25 мл, или 0,5 мл. В каждый ряд пробирок с разведенной сывороткой добавляется равное количество вирусного диагностикума различного типа. После тщательного перемешивания жидкостей во все пробирки добавляется 1—2% взвесь эритроцитов, и они выдерживаются или полчаса в термостате, или 1 час — при комнатной температуре. Учет реакции производится по виду осадка эритроцитов. При наличии агглютинации осадок эритроцитов врыхлый, с кружевными краями, при отсутствии агглютинации — эритроциты оседают на дно в виде компактного ровного диска. Задержка агглютинации произойдет с тем антигеном, который соответствует исследуемой сыворотке. Титром сыворотки считается то наибольшее ее разведение, при котором еще нет склеивания эритроцитов. Ориентировочные сроки исследования сывороток больного: первое — на 1—3 день заболевания, повторное — на 12—30 день от начала болезни. Если при повторном исследовании титр сыворотки увеличивается в 3—4 раза, то это может считаться подтверждением имеющегося гриппозного заболевания.

Для постановки указанной реакции в настоящее время выпускаются диагностикумы различных вирусов гриппа, инаktivированные формалином.

В заключение следует отметить, что перечисленные методы лабораторной диагностики вирусного гриппа на практике еще не нашли широкого применения, во-первых, потому, что многие из них сложны и малоприменимы в больнично-поликлинических условиях, а во-вторых, потому, что не все они специфичны. При большой загрузке лабораторий другими видами исследований лабораторной диагностике гриппа практически не уделяется внимания, хотя некоторые методы и заслуживают внедрения в широкую практику.

Одним из признаков вирусного гриппа, позволяющим отличить его от сходных бактериальных инфекций, может служить картина белой крови — лейкопения с эозинофилией, с относительным лимфоцитозом и сдвигом формулы влево.

Доступным является риноцитологическое исследование мазков-отпечатков со слизистой носа, что требует лишь специальных стекол и красок.

Заслуживает внимания реакция выявления прироста антител в парных сыворотках, то есть взятых у человека в начале заболевания и на 12—30 день болезни.

По мере возможности, следует использовать и выявление специфического антигена, получаемого из носоглотки больных путем постановки реакции связывания комплемента.

Статья поступила 5 ноября 1957 г.
