

Занятие 26.

Микробиологическая диагностика энтеровирусных
(полиомиелит, Коксаки, ЕСНО) и ротавирусных
инфекций

prof. Akif Qurbanov

Обсуждаемые вопросы:

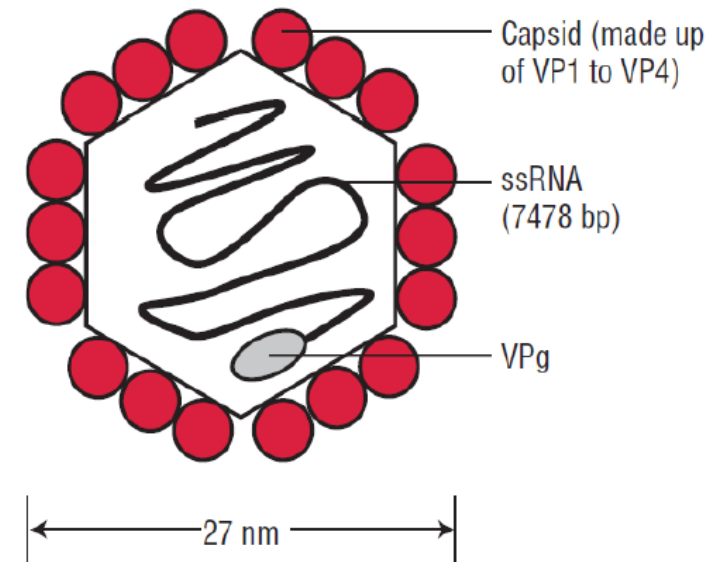
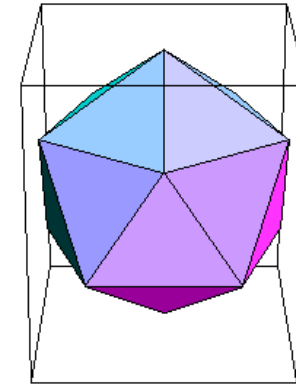
- 1. Семейство *Picornaviridae*, общие свойства (классификация, морфология, культивирование, антигены, персистенция).
- Морфо-биологические особенности вирусов полиомиелита, эпидемиология, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение и специфическая профилактика полиомиелита.
- Морфо-биологические особенности вирусов Коксаки и ЕСНО, эпидемиология, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение вызываемых ими заболеваний.
- 3. Род *Rubivirus* - вирус краснухи, общие, культуральные свойства, патогенность, эпидемиология и патогенез краснухи, тератогенное действие вируса краснухи. Микробиологическая диагностика, лечение и специфическая профилактика краснухи

Цель занятия:

- дать информацию студентам о морфобиологических особенностях вирусов, относящихся к семейству *Picornaviridae* (вирусы полиомиелита, Коксаки, ЕСНО), и роду *Rotavirus*, обучить их методам лабораторной диагностики полиомиелита и герпесвирусных инфекций.

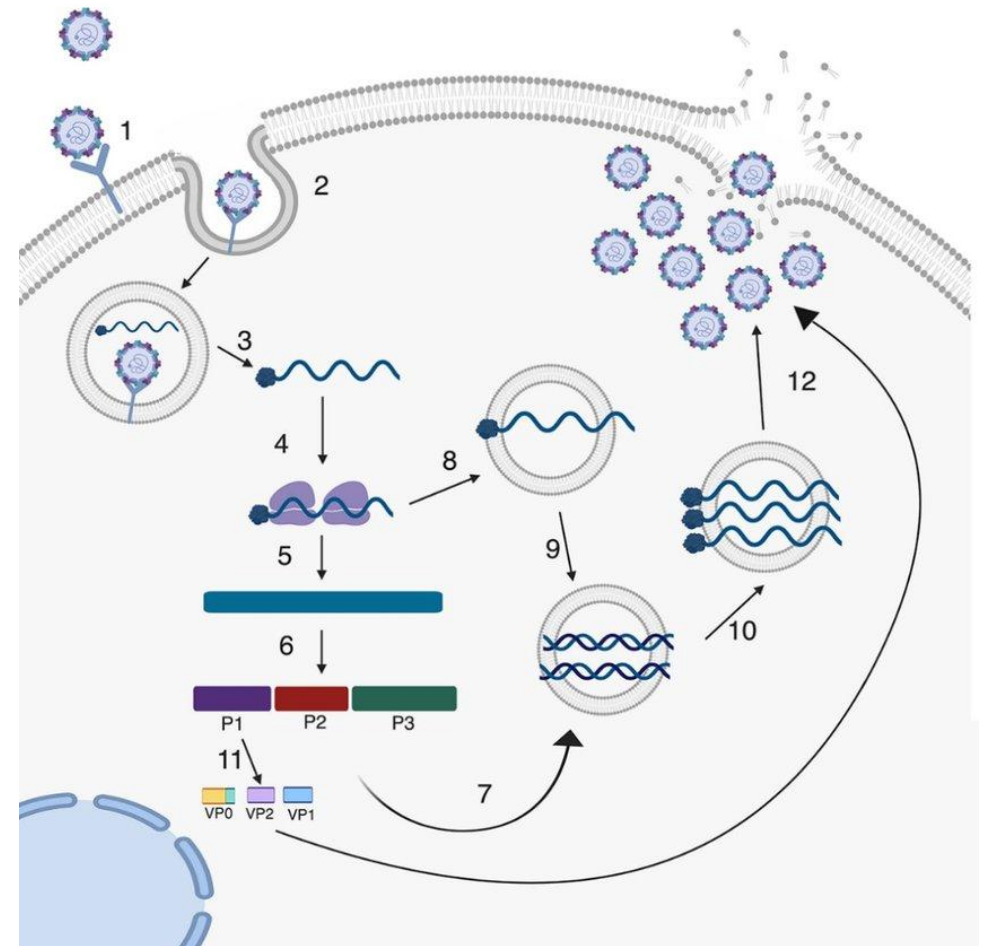
Семейство Picornaviridae

- **Члены** семейства Picornaviridae представляют собой простые вирусы с одноцепочечной РНК. Название семейства связано с очень малыми размерами этих вирусов (*pico*-маленький, *rna*-РНК).
- Вирусы имеют простое строения (без оболочки), размером 28-30 нм.
- Капсид имеет 12 пентамеров с икосаэдрической симметрией. На поверхности каждого пентамера имеются специальные бороздки («каньоны»), обеспечивающие связь вируса с клеткой-хозяином, а также с Fab-фрагментами антител.
- Геном вирусов состоит из **положительной** РНК инфекционной природы и связанного с ней VPg-белка..



Репродукция пикорнавирусов

- Репродукция происходит в цитоплазме клеток-хозяев.
- Вирус проникает в клетку-хозяина путем эндоцитоза.
- Геномная РНК играет роль информационной РНК и участвует в синтезе вирусных белков, в том числе РНК-зависимой РНК-полимеразы.
- Этот фермент синтезирует отрицательную РНК комплементарную положительной РНК и снова положительную РНК (геномную РНК) из отрицательной.
- Геномная РНК окружается капсидом из структурных белков и образует зрелый вирион.
- В результате лизиса клеток высвобождаются вирионы.



Классификация пикорнавирусов:

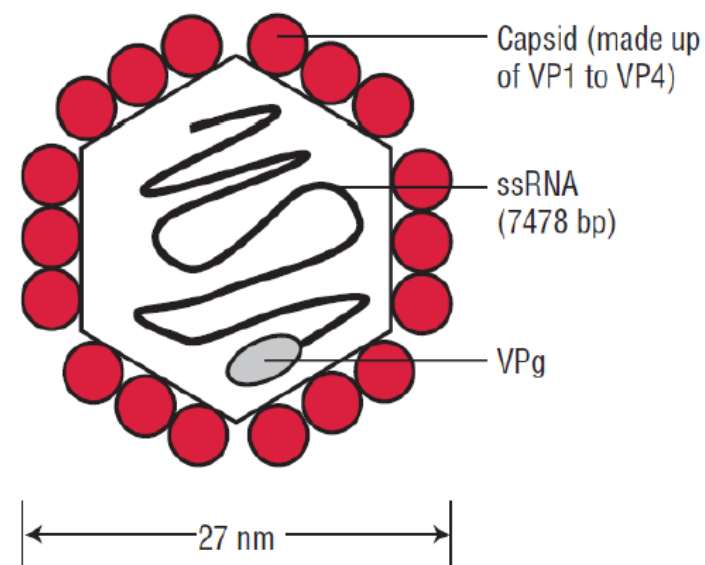
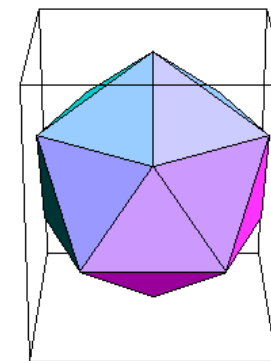
- Семейство *Picornaviridae* состоит из 9 родов: Enterovirus (энтеровирусы), Hepatovirus (вирусы гепатита А), Rhinovirus (риновирусы), Aphthovirus (кожные вирусы), Parechovirus (пареховирусы), Cardiovirus и др. Первые 5 родов имеют большее значение в патологии человека.

Род *Enterovirus* (энтеровирусы)

- Энтеровирусы (от греч. *enteron* – кишка) вызывают разнообразные по клиническим проявлениям заболевания преимущественно в кишечнике человека.
- Энтеровирусы относятся к семейству *Picornaviridae* рода *Enterovirus* . Род включает вирусы полиомиелита , Коксаки А и В (по названию населенного пункта в США , где они были впервые выделены), ЕСНО (аббревиатура от англ. Enteric cytopathogenic human orphans – кишечные цитопатогенные человеческие вирусы сироты), энтеровирусы типов 69-71 и 73-78 .
- В настоящее время 72-ой тип энтеровирусов (вирус гепатита А) отдельно включен в род *Hepatovirus*

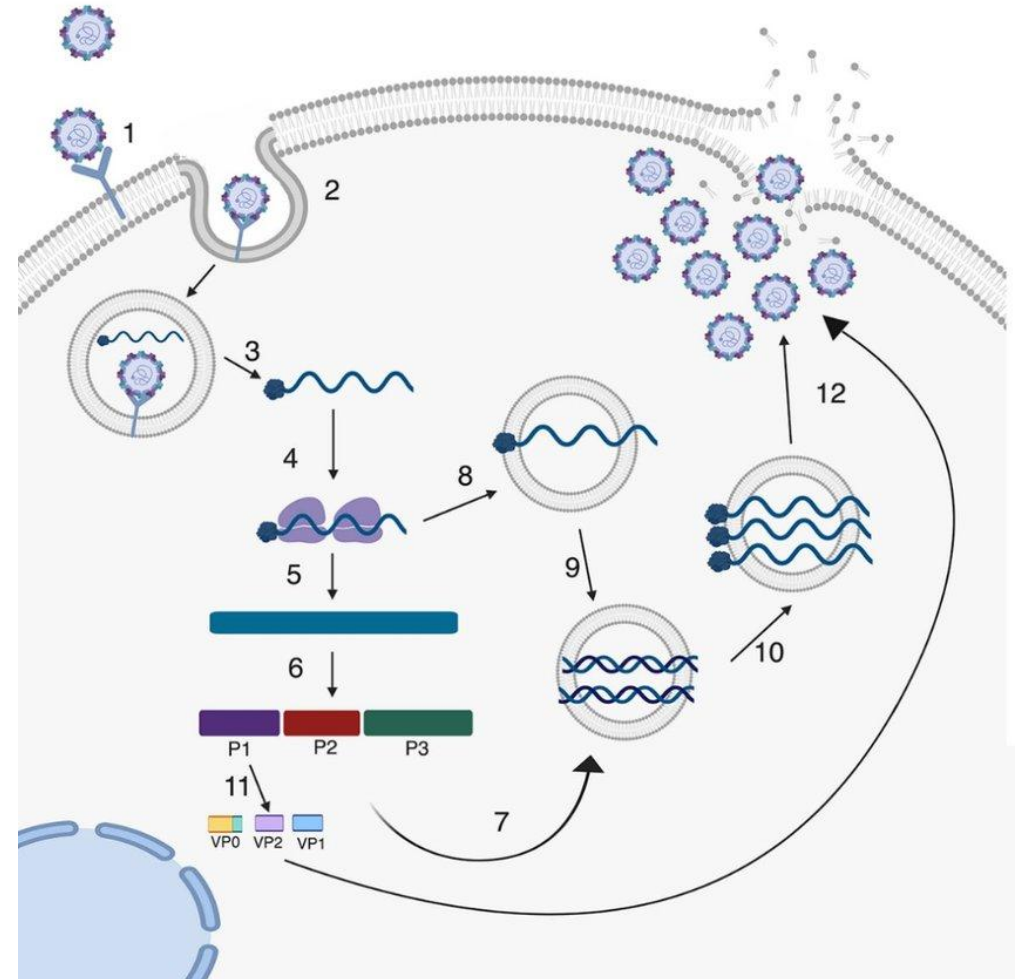
Энтеровирусы (особенности)

- Просто организованные (безоболочечные) вирусы, размером 28-30 нм.
- Капсид с икосаэдрическим (кубическим) типом симметрии, состоит из 12 пентамеров. Углубления (каньоны) на поверхности каждого пентамера являются областью соединения с рецепторами клетки хозяина, а также Fab-фрагментом антител.
- Геном вируса - инфекционная однонитевая плюс РНК, связанная с белком VPg.



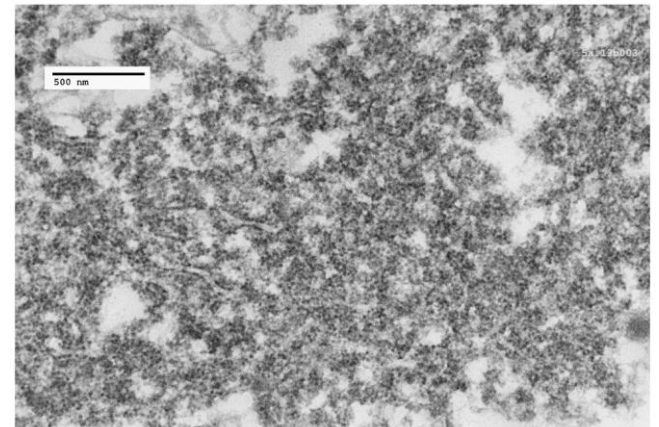
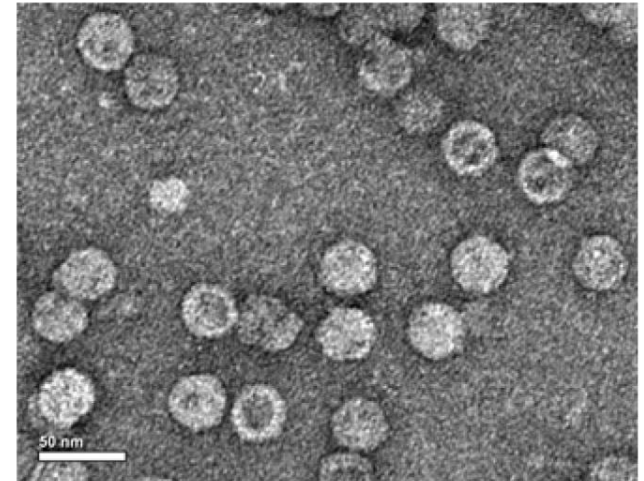
Репродукция энтеровирусов

- Репродукция энтеровирусов происходит в цитоплазме клетки хозяина.
- Вирус поступает в клетку путем эндоцитоза.
- Геномная РНК функционирует как иРНК для синтеза белка, включая РНК-зависимую полимеразу.
- Полимераза синтезирует минус-нить матрицы с поверхности плюс-нити и реплицирует геном.
- Структурные белки собираются в капсид, в него включается геном, образуется вирион.
- Вирионы освобождаются из клетки посредством ее лизиса.



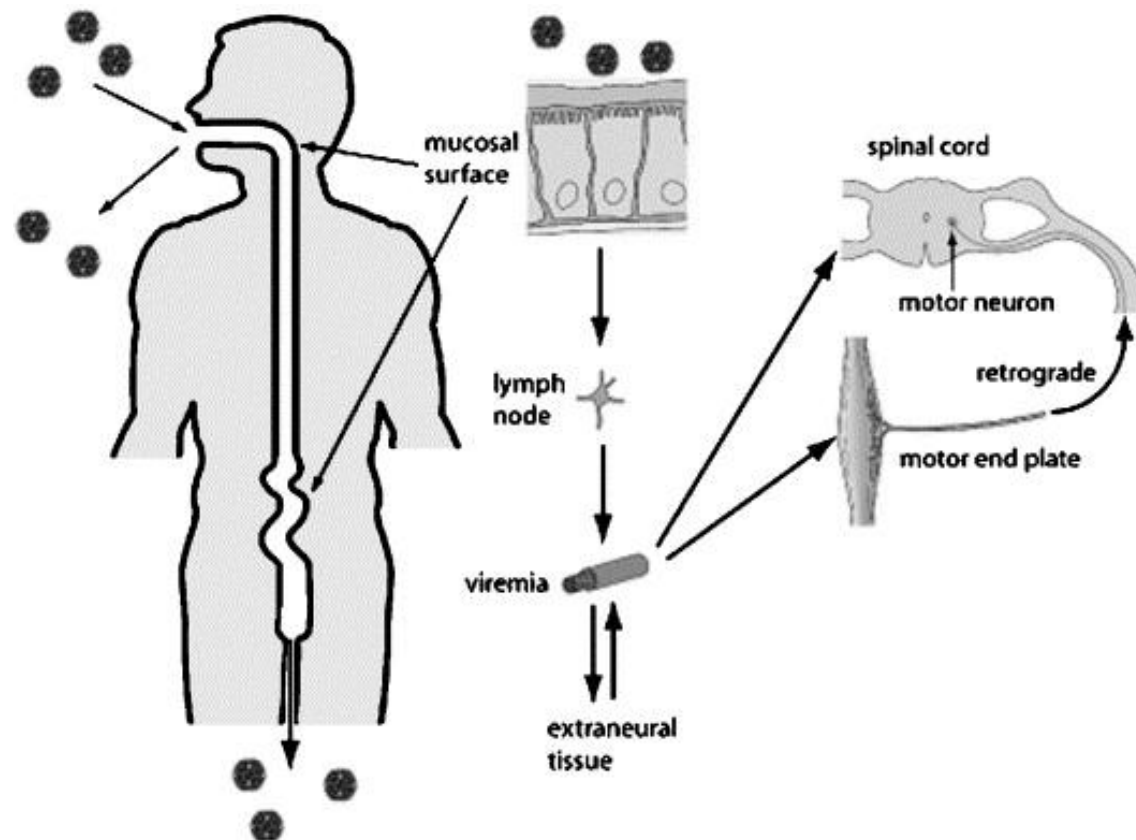
Вирусы полиомиелита (полиовирусы)

- Вирус полиомиелита относится к семейству *Picornaviridae* роду *Enterovirus*.
- По структуре полиовирусы – типичные представители рода *Enterovirus*. Различают 3 серотипа внутри вида: 1, 2, 3, не вызывающие перекрестного иммунитета.
- Полиовирусы хорошо репродуцируются в первичных и перевиваемых культурах клеток из тканей человека и обезьян (например, в культуре клеток почек) и в течение 3-6 дней вызывают цитопатический эффект.
- Полиовирусы сохраняются в воде, почве, в некоторых пищевых продуктах и на предметах обихода месяцами. Погибают при температуре 55°C в течение 30 мин., при кипячении – за несколько секунд.



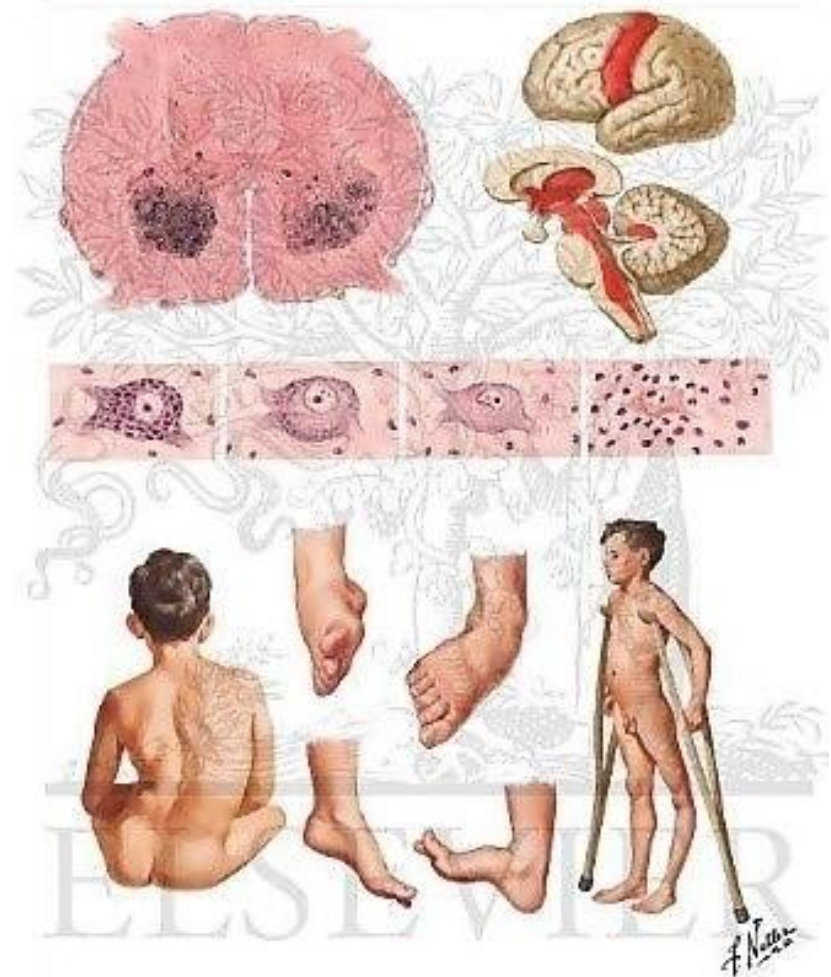
Патогенез полиомиелита

- Источник инфекции – человек и вирусоноситель. Заражение происходит фекально-оральным механизмом – через пищевые продукты, воду, предметы обихода, грязные руки. В первые 1-2 недели заболевания вирус может передаваться через носоглоточный секрет воздушно-капельным путем.
- Полиовирус проникает в организм через слизистые оболочки носоглотки и тонкого кишечника. Первичная репродукция вирусов происходит в лимфатических узлах глоточного кольца и тонкого кишечника.
- Вирусы проникают в центральную нервную систему, где избирательно поражают клетки передних рогов спинного мозга (двигательные нейроны). В результате этого возникают вялые параличи конечностей и туловища.



Клинические проявления полиомиелита

- Полиомиелитом болеют преимущественно дети. Инкубационный период продолжается в среднем 7-14 дней. Проявления полиомиелита могут варьировать от бессимптомных до очень тяжелых клинических форм, сопровождающихся параличом.
- Чаще встречается **легкая форма заболевания**, которая длится несколько дней, сопровождается температурой, общей слабостью, головной болью, рвотой и болью в горле.
- **Менингеальная форма (асептический менингит)** – продолжается в течение 2-10 дней, проходит без остаточных признаков.
- **Паралитическая форма** возникает в результате повреждения мотонейронов спинного мозга. В основном вызывается вирусом 1 серотипа (развивается примерно в 1% случаев). Часто наблюдаются асимметричные параличи нижних конечностей. Паралитическая форма заболевания длится долго, у больных сохраняются остаточные параличи.
- Спустя десятилетия после перенесенной в детстве паралитической формы полиомиелита у некоторых людей может развиваться **прогрессирующая мышечная атрофия**

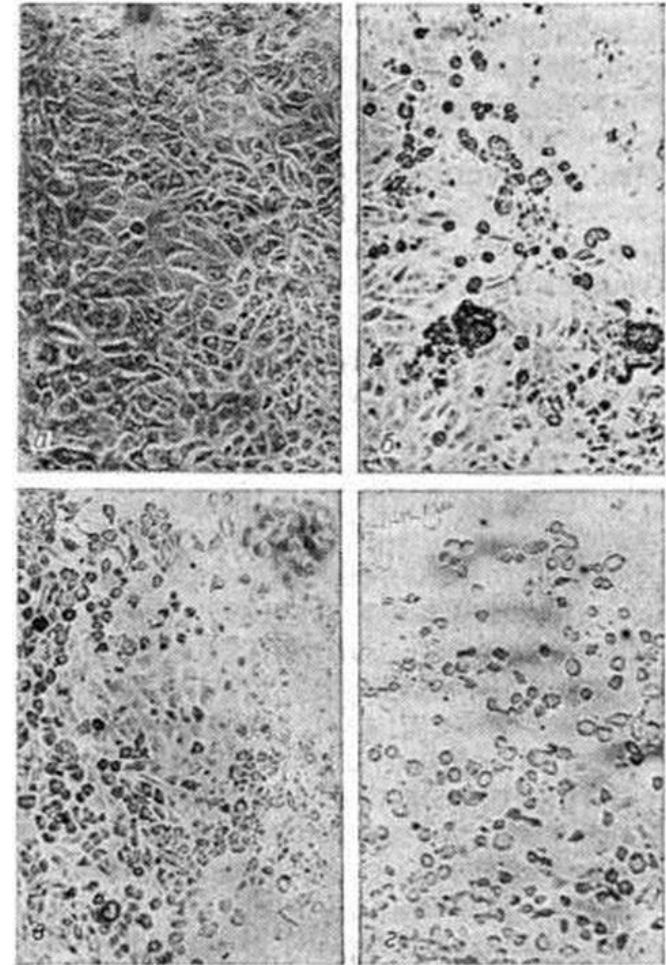


Иммунитет

- После перенесенной болезни остается пожизненный типоспецифический иммунитет. Невосприимчивость связана наличием вируснейтрализующих антител.
- Естественный пассивный иммунитет новорожденных обусловлен материнскими антителами и сохраняется в течение 6 месяцев
- Пассивный искусственный иммунитет сохраняется только в течение 3-5 недель.

Микробиологическая диагностика

- Материалом для исследования служат отделяемое носоглотки, испражнения.
- Вирусы полиомиелита выделяют путем заражения исследуемым материалом **первичных и перевиваемых культур клеток человека и обезьян. О репродукции вирусов судят по цитопатическому действию.** Идентификацию проводят с помощью типоспецифических сывороток в реакции нейтрализации в культуре клеток, а также в ПЦР.
- Серодиагностика основана на нарастании титра специфических антител с использованием парных сывороток больных .



Лечение полиомиелита

- Средства специфической профилактики отсутствуют, поэтому проводят симптоматическое лечение.
- Применение *иммуноглобулина* до начала заболевания дает положительный эффект.
- И хотя препарат на короткое время предотвращает развитие паралитических форм, он не защищает от субклинического течения инфекции.

Профилактика полиомиелита

- **Первая инактивированная** (формалином) вакцина для профилактики полиомиелита была разработана Дж. Солком в 1953 году. Она создавала лишь общий гуморальный иммунитет, не формируя при этом местной резистентности слизистых оболочек.
- В 1956 г. А.Сэбин получил **живую культуральную вакцину** из аттенуированных штаммов вирусов полиомиелита всех трех типов. Вакцина Сэбина индуцирует выработку IgM и IgG и синтез секреторного IgA в кишечнике. Данная вакцина вводится перорально и используется для массовой иммунизации детей.



Вирусы Коксаки

- Вирусы Коксаки относятся к семейству *Picornaviridae* роду *Enterovirus* . В отличие от прочих энтеровирусов вирусы Коксаки являются наиболее патогенными для новорожденных мышей . По патогенности для новорожденных мышей вирусы разделены на группы А и В (29 серотипов) .
- Вирусы Коксаки А вызывают диффузный миозит и очаговый некроз поперечно-полосатых мышц.
- Вирусы Коксаки В вызывают поражение ЦНС , развитие параличей, некроз скелетной мускулатуры, иногда – миокарда.

Патогенез и клинические проявления заболеваний , вызываемых вирусами Коксаки

- Несмотря на репликацию в гастроинтестинальном тракте , характерную для многих энтеровирусов , вирусы Коксаки не вызывают кишечных инфекций. Вирусы вызывают у человека асептический менингит , респираторные заболевания и лихорадку. Инкубационный период заболеваний , вызываемых вирусами Коксаки составляет 2-9 дней.
- **Асептический менингит.** Может сопровождаться мышечной слабостью, напоминающую параличи при полиомиелите.
- **Герпангина** , вызванная вирусами Коксаки А , сопровождается тяжелым лихорадочным фарингитом .Отмечается повышение температуры, боль в горле , герпетиформные высыпания в глотке , миндалинах и на языке.
- **Пузырчатка полости рта и конечностей.** Заживление везикул без образования корочек , что отличает их от заболеваний , вызываемых герпес- и поксвирусами.
- **Плевродиния** ,или **эпидемическая миалгия.** Сопровождается лихорадкой и болями в грудной клетке .
- **Миокардиты.** В основном сопровождаются у детей тяжелыми воспалениями сердца и его оболочек, среди новорожденных наблюдается высокая летальность.

Микробиологическая диагностика

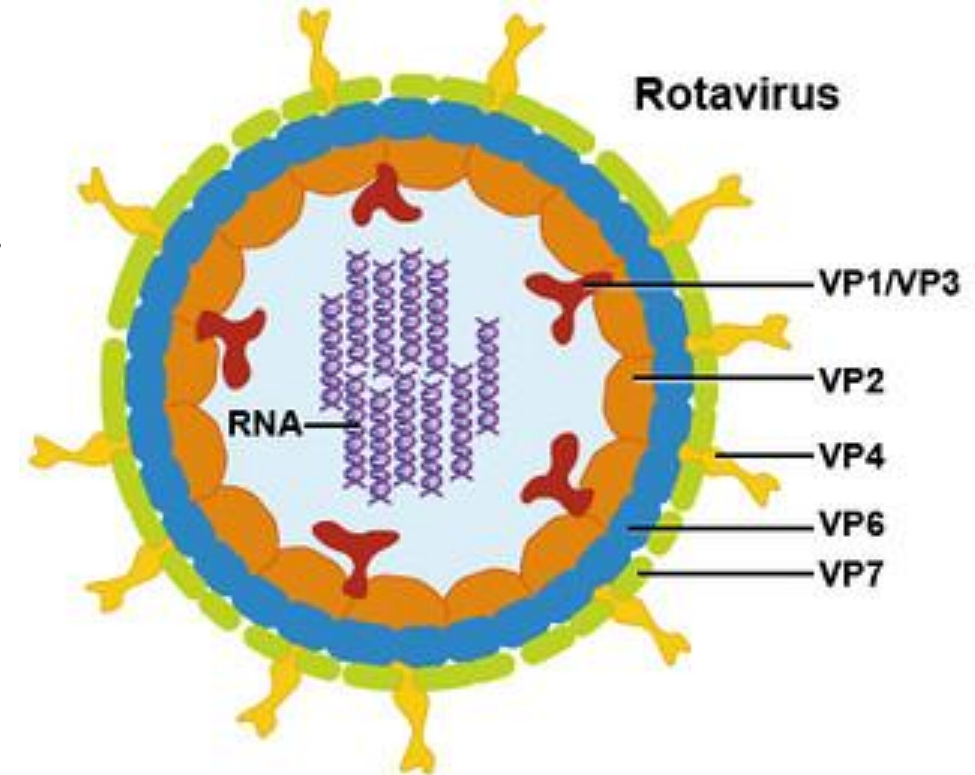
- Вирусы выделяют из отделяемого носоглотки в первые дни заболевания , из испражнений – в первые недели.
- При асептическом менингите возбудитель возможно выделить из спинномозговой жидкости и испражнений . Заражают культуры клеток *Hela* , тканевые культуры почек обезьян (через 5-14 дней становится видимым цитопатический эффект) или мышей-сосунков .
- В клиническом материале вирусы выявляют с помощью ПЦР.

Вирусы группы ЕСНО

- Вирусы группы ЕСНО (от англ. *Enteric cytopathogenic human orfans* – **кишечные цитопатогенные человеческие вирусы сироты**) относятся роду *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*. Вызывают ОРВИ, асептический менингит, полиомиелитоподобные заболевания
- Наиболее часто встречаемые в детском возрасте заболевания обычно сопровождаются появлением сыпи

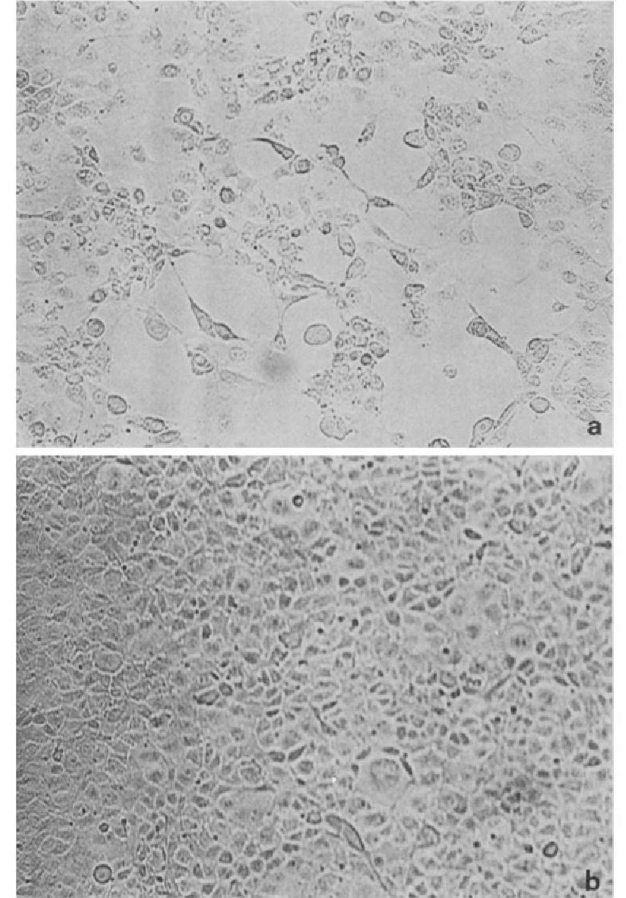
Род Rotavirus (ротавирусы)

- Ротавирусы относятся к семейству *Reoviridae* роду *Rotavirus*. Свое название получили из-за строения вириона, напоминающего зубчатое колесо (от лат. *rota* - колесо).
- Вирион ротавирусов сферической формы, содержит двунитевую фрагментированную (11 сегментов) РНК. Двухслойный (внутренний и внешний) капсид имеет форму колеса с отходящими внутрь «спицами». Вирион имеет 8 белков. Внутренний капсид содержит VP-1, VP-2, VP-3, VP-6 белки. Наружный капсид содержит VP-4 и VP-7 белки.
- Белок VP-7 – основной компонент наружного капсида (типоспецифический антиген), по антигенной структуре которого ротавирусы делятся на 6 серотипов (A-F).
- У человека заболевания вызывает серогруппа А.



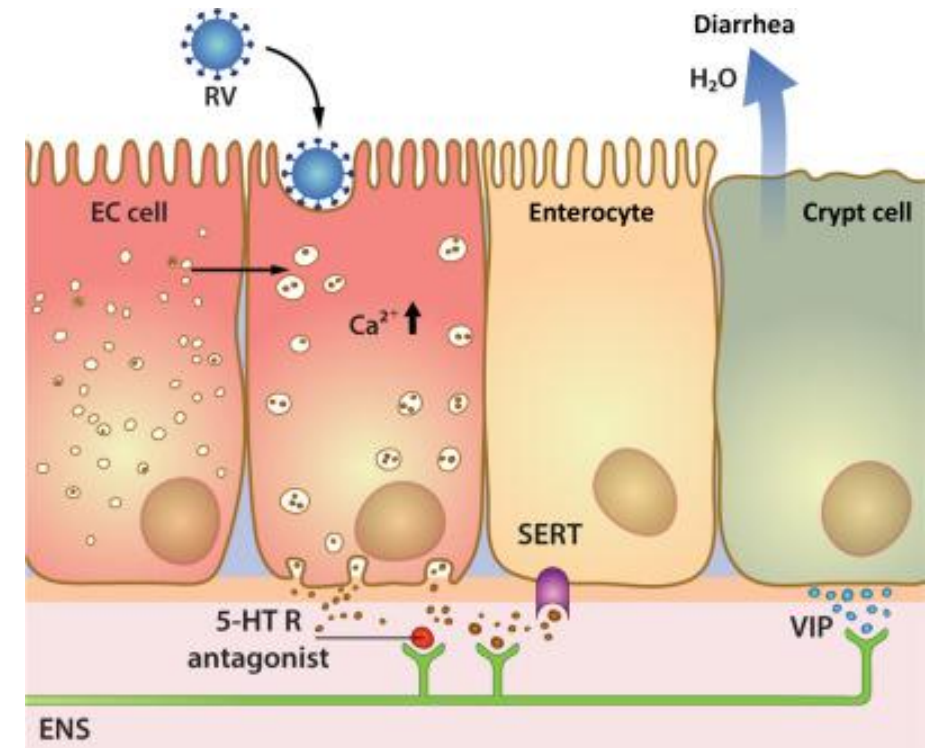
Ротавирусы (культивирование)

- Ротавирусы трудно культивируются в клеточных культурах.
- Ротавирусы серогруппы А возможно культивировать в присутствии протеолитического фермента - **трипсина**. Протеолиз происходящий под действием фермента, повышает инвазивную активность вирусов и приводит к образованию инфекционных субвирусных частиц.



Патогенез и клинические проявления ротавирусных инфекций

- Источник инфекции – больные или вирусоносители. Вирусы выделяются с фекалиями (фекально-оральный механизм). Пути передачи – водный (основной), пищевой, контактно-бытовой.
- Ротавирусы размножаются в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки, вызывая их гибель. NSP4 белок вируса обладает свойством энтеротоксина. Диарея развивается в результате нарушения всасывания глюкозы и солей в кишечнике.
- Ротавирусные инфекции в основном у новорожденных и детей младшего возраста (от 6 мес. до 2 лет) вызывают острые энтериты. Инкубационный период – 1-3 дня. Основные клинические симптомы заболевания – лихорадка, рвота, боли в животе и диарея, могут стать причиной потери жидкости и электролитов и привести к смерти.



Микробиологическая диагностика

- Основана на выделении вируса в испражнениях с помощью иммунной электронной микроскопии, реакции латекс-агглютинации, ИФА и ПЦР.
- Антитела выявляют в парных сыворотках крови с помощью ИФА.



Род Rubivirus (вирус краснухи)

- Вирус краснухи подобен другим вирусам семейства Togaviridae.
- Вирус краснухи можно культивировать во многих культурах клеток, но он не дает заметного цитопатического эффекта.
- Следовательно, можно обнаружить вирус в первичных культурах клеток благодаря явлению интерференции. Для этого используют любой цитопатогенный вирус, репродукция которого в тканевых культурах всегда сопровождается цитопатическим эффектом. Однако в культуре клеток, ранее инфицированных вирусом краснухи, эти вирусы не вызывают цитопатического эффекта (феномен интерференции).
- В отличие от других тоговирусов вирус краснухи не культивируется в культуре клеток членистоногих и обладает нейраминидазной активностью.

Род *Rubivirus* (вирус краснухи)

- Краснуха — острое лихорадочное заболевание с сыпью и лимфаденопатией, которое встречается преимущественно у детей.
- Вирус краснухи относится к роду *Rubivirus* семейства *Togaviridae*. Следует отметить, что данный вирус не относится к группе арбовирусов как исключительный представитель семейства *Togaviridae*.
- Однако по своей структуре и физико-химическим свойствам он принадлежит к семейству *Togaviridae*.
- Название рода (лат. *rubrum* — красный) относится к красной пятнисто-массивной сыпи, появляющейся на коже больных во время кори.

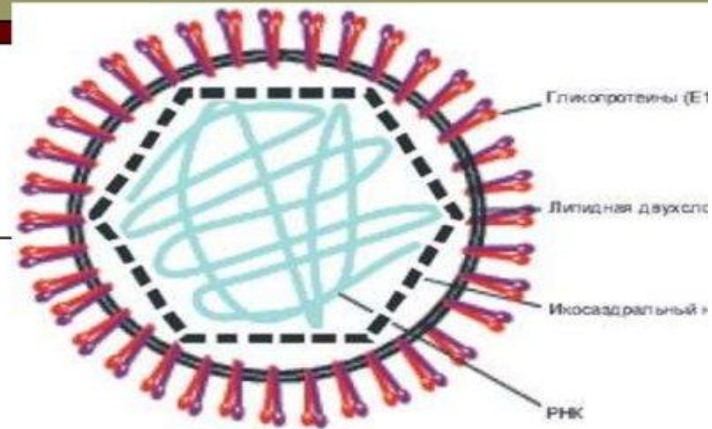
ВИРУС КРАСНУХИ -Относится к роду *Rubiviridae* (от лат. *rubrum* – красный, что связано с появлением пятнисто-папулезной сыпи на коже).

Вызывает приобретенную и врожденную краснуху и подострый краснушный панэнцефалит

1.Морфология

- ❑ Форма: сферическая
- ❑ Диаметр: 60-70 нм
- ❑ Наружная липидная оболочка имеет на поверхности гликопротеиновые шипы:

- ❖ E1 – обладает гемагглютинирующими свойствами
- ❖ E2 – выполняет функцию рецептора при взаимодействии с клеткой.
- ❑ Под оболочкой капсид кубического типа симметрии
- ❑ Геном: однонитевая плюс-РНК
- ❑ Вирус имеет собственную нейраминидазу

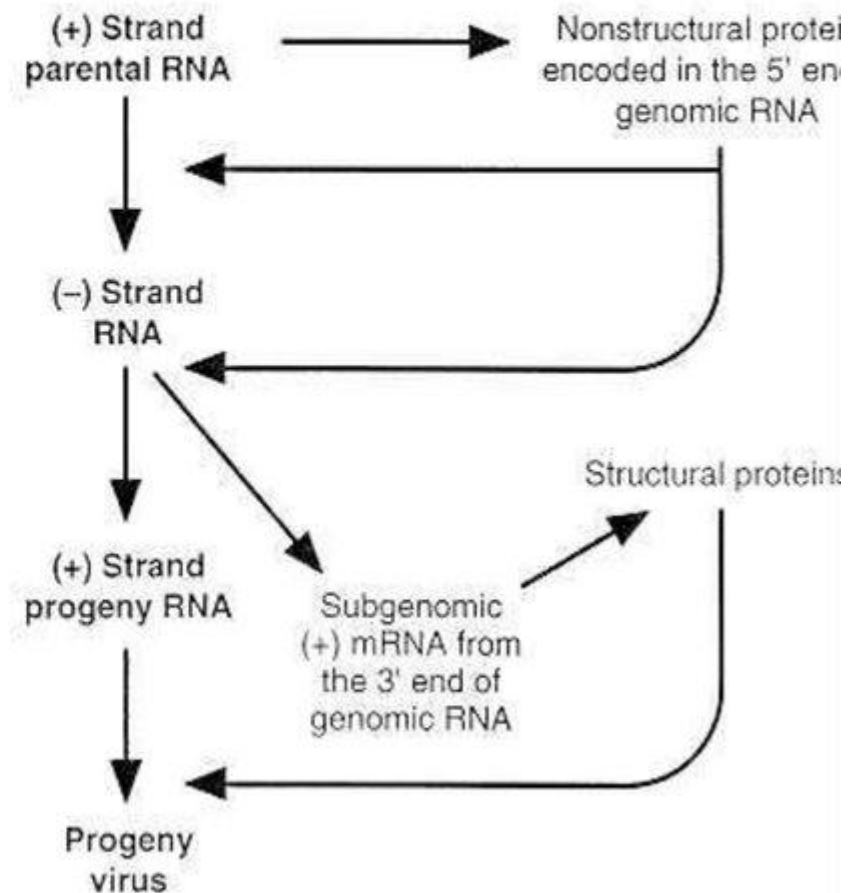


АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА

- ВИРУС ИМЕЕТ ОДИН СЕРОТИП
 - С-антиген – нуклеокапсидный выявляется в РСК
 - Е2 протективный (гемагглютинин)– выявляется в РН
 - Е1 участвует в прикреплении вируса
-
- Культивируется в ВНК21 и Vero вызывая ЦПД в виде бляшек, очаговой деструкции монослоя
 - Вирус можно обнаружить по феномену интерференции
 - К вирусу чувствительны куриные и утиные эмбрионы

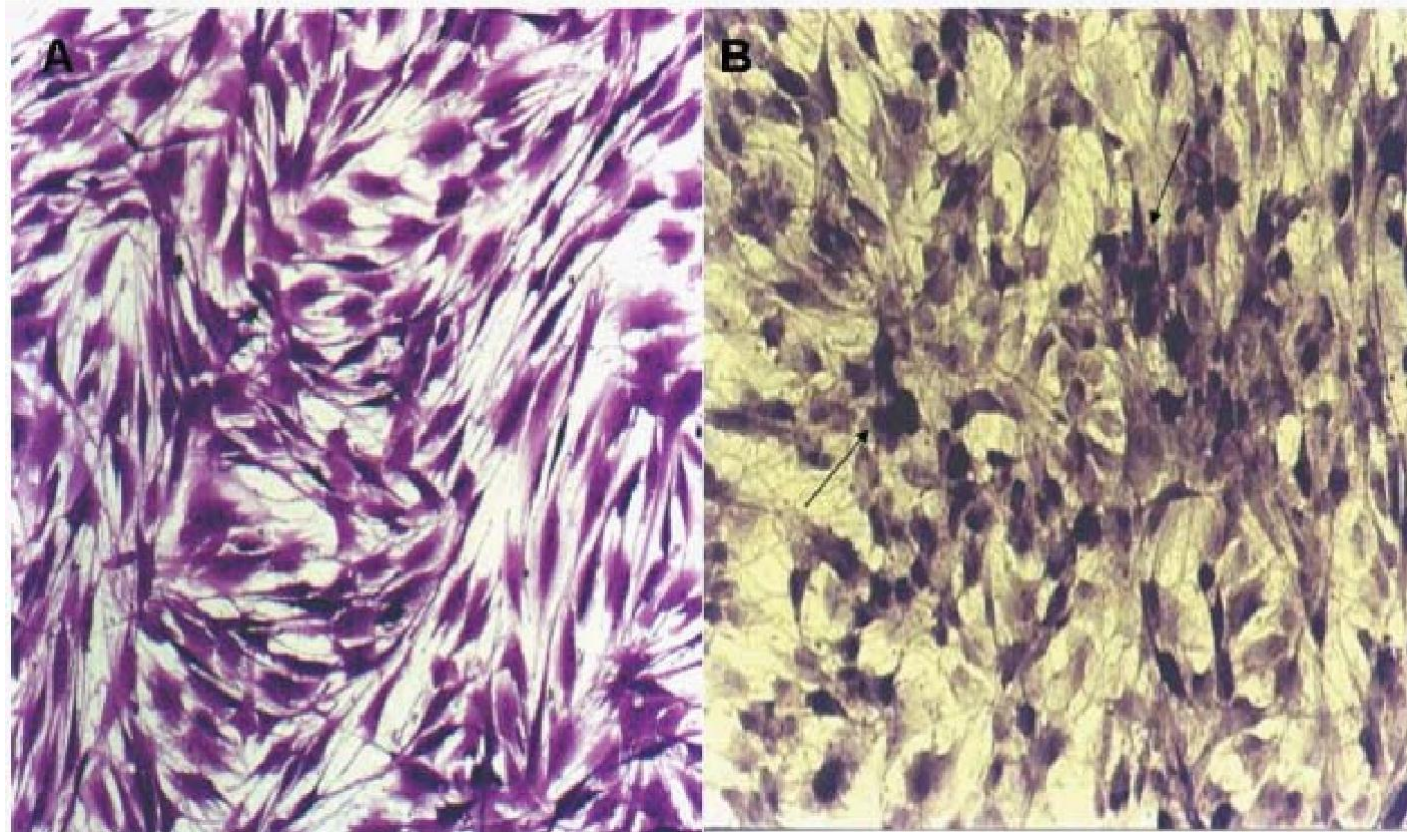
Репродукция вируса (продуктивная инфекция)

- ❑ Проникновение вируса в цитоплазму клетки происходит путем рецепторного эндоцитоза
- ❑ После «раздевания» синтезируется вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза.
- ❑ Затем при помощи этого фермента матрице плюс-РНК образуется комплементарная минус-РНК. Она служит матрицей для образования двух нитей плюс-РНК – полной и короткой. Полная нить кодирует генс вируса и вирусные полипептиды а короткая нить используется для синтеза капсидных и оболочечных белков. Белки расщепляются, образу гликопротеины E1 и E2.



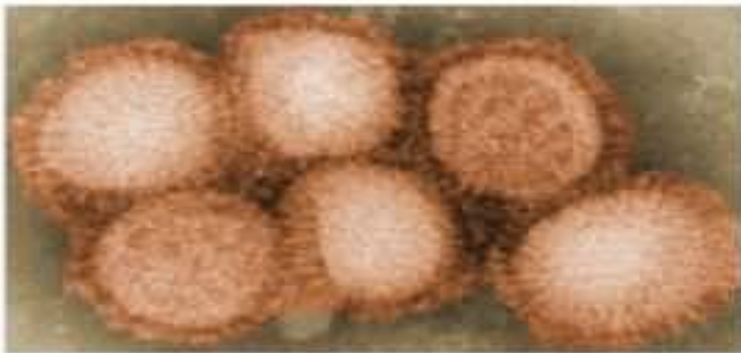
- ❑ Завершение сборки и выход вирионов из клетки происходит путем почкования

цитопатический эффект вируса краснухи в культуре клеток
«*Rabbit cornea cell line*»



Источник инфекции и пути заражения

- Вирус краснухи вызывает постнатальную краснуху, врожденную краснуху и прогрессирующий краснушный энцефалит.
- Источником инфекции являются больные клиническими и бессимптомными формами.
- Заражение происходит воздушно-капельным путем.
- У беременных возможно трансплацентарное заражение плода. В это время происходит гибель плода, либо ребенок рождается с врожденной корью.



Вирус краснухи (вверху) и
типичная краснушная сыпь
у взрослого (справа)



Приобретенная краснуха

Патогенез краснухи

- **Врожденная краснуха** возникает в результате трансплацентарного заражения плода.
- Заражение краснухой особенно опасно в первом триместре беременности, так как в этот период формируются все органы и ткани плода. В этот период у 85% инфицированных детей формируются врожденные аномалии.
- При заражении во II триместре беременности примерно 16% детей рождаются с врожденными симптомами краснухи. Инфекция спинного мозга также может вызывать гибель плода и самопроизвольные аборты.
- После 20-й недели беременности при трансплацентарном инфицировании дефектов обычно не наблюдается.

Врожденная краснуха

Классификация

Врожденная краснуха:

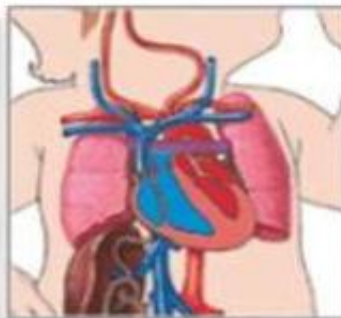
Развивается при внутриутробном заражении. Может развиваться и после бессимптомной (иннапарантной) краснухи у матери.

Характеризуется триадой Грегга:

- 1 – поражения органов зрения;
- 2 – патология органов слуха;
- 3 – врожденные пороки сердца.



Микроцефалия



Пороки сердца



Катаракта

Патогенез

Предполагаемый механизм патогенеза врожденной краснухи



Патогенез краснухи

- **Послеродовая краснуха.** Воротами инфекции являются слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Вирус размножается в эпителии дыхательных путей, в лимфатических узлах шеи и затылка, попадает в кровь, вирусемия продолжается до образования в крови антител (13-15 дней).
- Латентный период кори длится в среднем 2-3 недели. Заболевание начинается с незначительного повышения температуры тела, слабовыраженных катаральных явлений, а также роста шейных и затылочных лимфатических узлов. Позже на всей поверхности тела образуются кореподобные пятнисто-папулезные высыпания. Высыпания сначала наблюдаются на лице, затем распространяются на туловище и конечности, причем высыпания держатся самое большее 3 дня (с этим связано название болезни «трехдневная корь»), бесследно исчезают.



Подострый Краснушный Панэнцефалит – медленная вирусная инфекция, которая может развиться через десятилетия после перенесенной в детстве краснухи а также у лиц с врожденной краснухой

- **Болезнь характеризуется комплексом прогрессирующих нарушений двигательной и умственной функций ЦНС, и завершается летальным исходом**

Тератогенные эффекты рубивируса

- Персистенция вируса в тканях плода сопровождается тератогенным эффектом. Последнее связано с ослаблением митотической активности клеток, ишемией плода вследствие повреждения сосудов плаценты, а также с прямым цитопатогенным действием вируса на клетки плода - вирус повреждает моноциты и лимфоциты и персистирует в них длительное время.
- Вирус, сохраняющийся в организме детей с врожденной краснухой, обладает высокой вирулентностью.

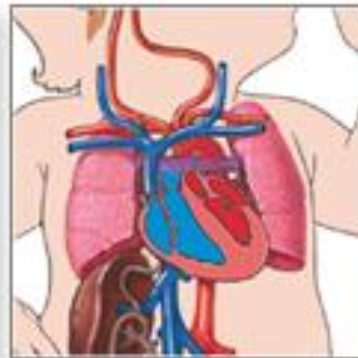
Врожденная краснуха

- Врожденная краснуха сопровождается классическими симптомами триады - катарактой, пороками сердца и глухотой, но возможны и другие аномалии развития - сыпь, гепатоспленомегалия, желтуха, менингоэнцефалит.
- Глухота, вызванная поражением центральной нервной системы, также вызывает умственную отсталость. Внутрочерепные мальформации также могут быть вызваны вирусами простого герпеса, цитомегаловирусом, вирусами гриппа и кори, но лидером является вирус краснухи

Rubella syndrome



Microcephaly



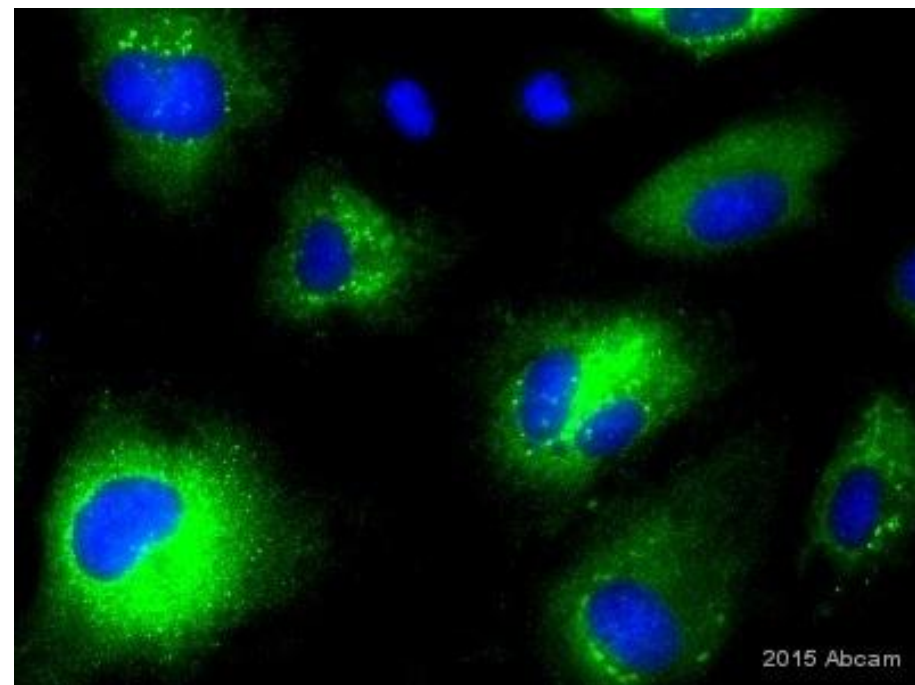
PDA



Cataracts

Микробиологическая диагностика краснухи

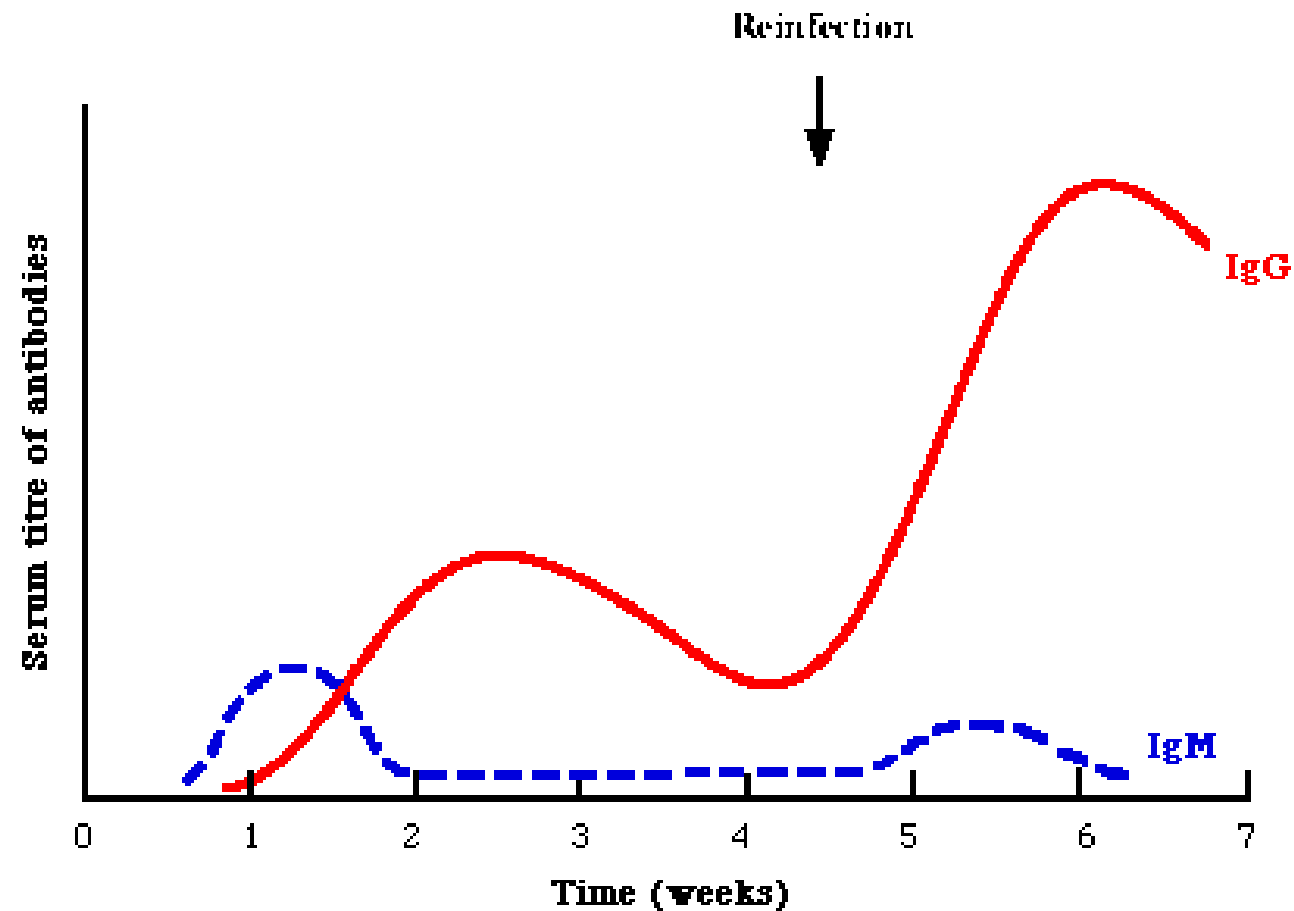
- Вирус краснухи может быть обнаружен вирусологическим методом в материалах, взятых из носоглотки или зева мазком.
- Поскольку он не оказывает заметного цитопатического действия, обнаружить вирус краснухи методом ИФР можно уже через 3-4 дня в инфицированных культурах клеток.



Микробиологическая диагностика краснухи

- **Серологическая диагностика** основана на обнаружении специфических антител к вирусу краснухи (IgG и IgM) в сыворотке крови методом ИФА и считается одним из обязательных тестов при обследовании беременных.
- При выявлении у беременных антител IgG к вирусу краснухи следует изучить динамику нарастания антител в другом образце крови, взятом с 10-дневным интервалом (титр увеличивается в 4 раза и более), а также наличие антител IgM в сыворотке крови следует определить.
- Если через 2 недели после контакта с источником инфекции в сыворотках крови беременной обнаруживается повышение титра IgG, а также IgM, то это свидетельствует о первичном заражении и может считаться показанием к прерыванию беременности.
- В динамике заболевания четырехкратное и более повышение титра антител свидетельствует о недавнем заболевании, а определение специфических антител IgM свидетельствует о наличии заболевания на момент обследования.
- Наличие специфических IgM-антител у плода указывает на внутриутробное инфицирование.

Динамика антител в сыворотке крови при краснухе



Профилактика краснухи

- В настоящее время во многих странах мира используется живая вакцина, изготовленная из ослабленных штаммов вируса в виде моновакцины или ассоциированной вакцины (паротит-корь-краснуха).
- Ассоциированные вакцины предназначены для детей и применяются с 12 месяцев жизни.
- Моновакцины и селективная вакцинация в основном используются для взрослых. Около 95% привитых вырабатывают иммунитет и сохраняют его в течение 20 лет.

