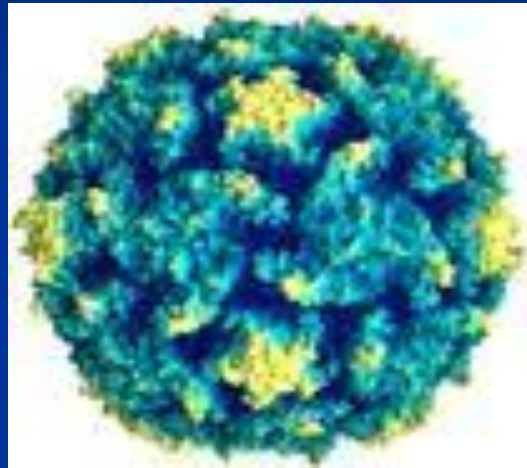


Энтеровирусы,
Вирусы гепатитов А и Е



ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №14

Частная микробиология

Для студентов ОмГМА

Энтеровирусы, вирусы гепатитов А и Е. Ротавирусы.

- Большая часть острых кишечных инфекций (ОКИ) вызывается вирусами. Вирусов - возбудителей ОКИ известно более 120, среди них - энтеровирусы, ротавирусы, коронавирусы, калицивирусы, астровирусы и другие.

Семейство *Picornaviridae*

Название семейства происходит от *pico* (лат. - маленький) и *RNA* (РНК), т.е. маленькие РНК - вирусы

- Насчитывает более 230 представителей
- +РНК-содержащие
- Это мелкие “голые” вирусы (Диаметр вируса 30 нм).
- Геном образован несегментированной позитивной +РНК.
- Вирус состоит из икосаэдрического с кубической симметрией капсида, окружающего инфекционную однонитевую плюс РНК с протеином VPg.
- Капсид состоит из 12 пятиугольников (пентамеров), каждый из которых состоит из 5 белковых субединиц – протомеров, последние образованы 4 вирусными полипептидами: VP1, VP2, VP3, VP4.
- Вирус репродуцируется в цитоплазме клеток,
- Репликация вРНК осуществляется по схеме: вРНК кРНК вРНК.
- Высвобождаясь из клетки - вызывает ЦПД и лизис клетки, под агаровым покрытием вызывает бляшкообразование.

Семейство *Picornaviridae*

Семейство *Picornaviridae* объединяет
четыре рода:

- *Enterovirus* (111 серотипов),
- *Hepatovirus* (2 серотипа 1 – человека, 1 – обезьяны)
- *Cardiovirus* (2 серотипа)
- *Rhinovirus* (105 серотипов) - возбудители ОРВИ
- *Aphthovirus* (7 серотипов) – в т.ч. вирус ящура
- Новые рода: *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*

◆ Род энтеровирусов *Enterovirus*

- - группа вирусов, обитающая преимущественно в кишечнике человека и вызывающая разнообразные по клинике заболевания.
- Род объединяет несколько групп вирусов:
 - *полиовирусы* (1 - 3 типов),
 - *вирусы Коксаки А* (24 серовара),
 - *вирусы Коксаки В* (6 сероваров) и
 - *ЕСНО* (34 серовара) – кишечные цитопатогенные человеческие вирусы сироты,
 - *Энтеровирусы* (серотипы 68, 69, 70, 71, 72) – *72 возбудитель гепатита А* (II класс. - виды А, В, С и D с их серотипами)

◆ Род энтеровирусов

- Это мелкие, сферической формы 20-30 нм вирусы с одноцепочечной +РНК с кубическим капсидом.
- Нет суперкапсида, нет липидов и углеводов, устойчивы к эфиру и др. растворителям
- Все энтеровирусы кислотоустойчивы (могут выживать в кислой среде желудка).
- Отсутствие оболочки обуславливает их устойчивость к действию жировых растворителей и желчных кислот (особенно устойчивы полиовирусы).
- Патогенные виды поражают ЖКТ, ЦНС, ОД, кожа, слизисты
- Источник - больной и бактерионосители
- Механизм заражения: фекально-оральный, воздушно-капел.
- Пути передачи: алиментарный, контактно-бытовой
- Сезонность - летне-осенняя.
- Выделяют вирусы из кишечника, носоглотки, ликвора и крови, обнаружение в сточных водах,
- Характерно широкое носительство и преимущественное поражение детского населения.

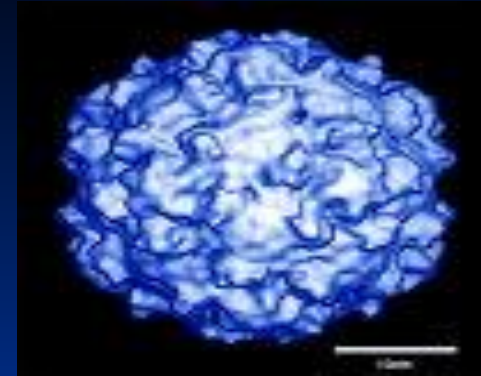
◆ Род энтеровирусов

- Культивируются (репродуцируются) на первичных и перевиваемых культурах клеток (кроме Коксаки А).
- Вызывает ЦПД, лизис клеток и образованием бляшек.
- Антигенная структура – имеют общие для всего рода группоспецифические и типоспецифические антигены.
- Резистентность: рН= от 2,5 до 11,0. Месяцами сохраняются в воде, почве, на ООС..., гибнут под УФИ и при кипячении – через несколько секунд; дезинфектанты - малоэффективны.
- Восприимчивость у животных разная.
- Иммуниет стойкий типоспецифический

❖ Вирусы полиомиелита.

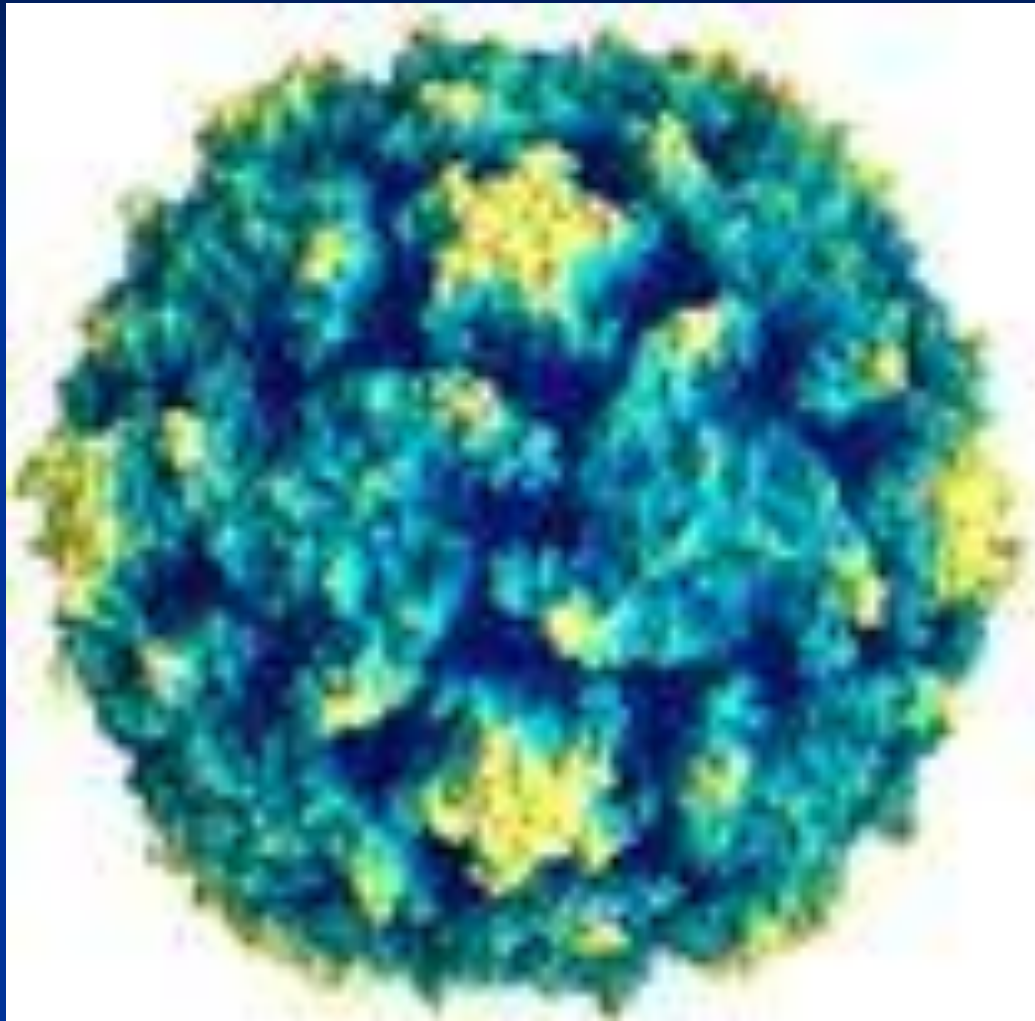
- Семейство Picornaviridae
- Род Enterovirus

Полиовирусы вызывают



- **ПОЛИОМИЕЛИТ** - острую инфекцию с поражением нейронов серого вещества передних рогов спинного мозга и ствола головного продолговатого мозга, в результате чего развиваются вялые параличи и парезы мышц ног, туловища и рук.
- Важнейшее биологическое свойство полиовирусов - тропизм к двигательным клеткам серого вещества спинного мозга (polios - серый, myelitis - воспаление спинного мозга).

❖ Вирус полиомиелита.



Полиовирусы.

- Структура как у всех вирусов рода Enterovirus: +РНК
- Капсид вириона образован четырьмя белками, образующими внешнюю (VP1, VP2, VP3) и внутреннюю (VP4) поверхности капсида.
- Белки оболочки имеют значение в распознавании и прикреплению к клеточным рецепторам, высвобождении вирионной РНК внутри клетки, развитии параличей.

ПОЛИОМИЕЛИТ

- *По антигенным свойствам* полиовирусы подразделяют на три типа, наибольшей вирулентностью и эпидемической активностью обладают полиовирусы 1 типа.
- Все серотипы патогенны для обезьян, клиника сходная с клиникой у человека.
- Естественная восприимчивость человека высока.

❖ Патогенез поражений полиомиелита

- Входными воротами для полиовирусов являются слизистые оболочки ВДП, желудка, тонкого кишечника. Инкубационный период 7-14 дней.
- После размножения в эпителиальных клетках вирус проникает в регионарные лимфатические узлы, затем - в кровь (первичная вирусемия). Эти первые стадии характеризуют “малую болезнь”, которая может протекать практически бессимптомно (легкое недомогание, кратковременное повышение температуры и обильное выделение возбудителя из носоглотки и с фекалиями).
- Этот период может заканчиваться формированием постинфекционного иммунитета и выздоровлением, что и происходит в большинстве случаев.

❖ Патогенез поражений **полиомиелита**

- Если полиовирус преодолевает гематоэнцефалитический барьер и поражает нейроны передних рогов спинного мозга, продолговатого мозга и варолиевого моста, несущие рецепторы к полиовирусам, развивается “большая болезнь” - паралитические формы.
- Среди них - **спинальный полиомиелит** обычно с ассиметричными поражениями нижних конечностей, **бульбарный полиомиелит** в ряде случаев с поражениями центров, контролирующих дыхательные мышцы, а также сочетанные спинально - бульбарные поражения.
- В случае накопления в крови вируснейтрализующих At, блокирующих проникновение вируса в ЦНС, её поражение не наблюдается.

◆ Клинические формы полиомиелита

1. Паралитическая 1% случаев – чаще вызывает вирус полиомиелита 1 серотипа .
 2. Менингеальная без параличей
 3. Abortивная – лёгкая.
- Характерно двухволновое течение: лёгкое тяжёлое.



◆ Иммуни́тет после перенесённого полиомиелита

- Иммуни́тет: типоспецифический, пожизненный за счёт вируснейтролизующих Ат.
- Среди них важная роль принадлежит местным секреторным Ат слизистой глотки и кишечника IgAs.
- Эффективный местный иммунитет (клетки иммунной памяти) играет роль в прерывании передачи диких вирусов и способствует их вытеснению из циркуляции.
- Пассивный естественный иммунитет сохраняется 3-5 недель после рождения ребёнка.

◆ Эпидемиология и профилактика полиомиелита

- Эпидемии в 1940- 1950гг. Десятки тысяч больных, из них 10% умирали, 40% - инвалидизация.
- Профилактика –массовая иммунизация населения (с 1953г., 1956-58гг получены аттенуированные штаммы всех трёх типов вируса. А.А.Сморозинцев получил первую пероральную живую вакцину из трёх серотипов, которая даёт стойкий общий и местный иммунитет. У вакцины есть недостатки – может вызвать вакциноассоциированный полиомиелит у привитых и контактных с привитыми (особенно у лиц с иммунодефицитом В-клеточного иммунитета, которые также могут до 10 лет быть выделителями вакцинного штамма)
- В 1988г. ВОЗ принято решение о глобальной ликвидации полиомиелита.
- В России с 2002 г. Не регистрируются случаи П.

❖ Микробиологическая диагностика полиомиелита

- Лабораторная диагностика имеет особое значение, особенно при стертых формах, поскольку многие энтеро - и герпетовирусы способны вызывать схожие поражения. Поэтому исследования необходимо проводить одновременно на все эти группы вирусов.

◆ Микробиологическая диагностика

Материал для исследования:

- Кал
- Отделяемое носоглотки
- При летальных исходах – косочки
головного и спинного мозга
- Лимфатические узлы

◆ Микробиологическая диагностика

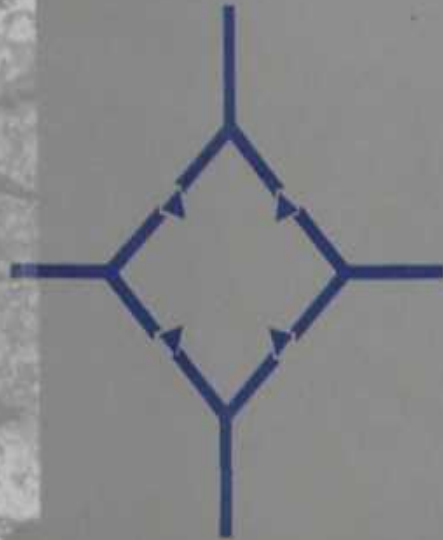
ПОЛИОМИЕЛИТА

- 1. *Вирусологическая диагностика* включает выделение вируса на различных культурах клеток или (в некоторых случаях - Коксаки А) на новорожденных белых мышах, с последующей идентификацией по цитопатическому эффекту, в РН, РТГА, РСК с эталонными сыворотками.
- 2. *Серологическая диагностика* осуществляется в различных реакциях (в настоящее время - ИФА), необходимо исследование в парных сыворотках, выявление специфических IgM - антител.

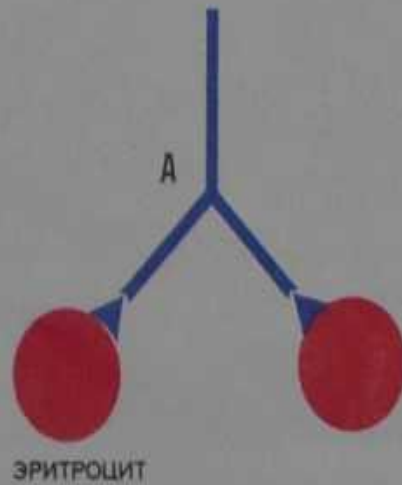
Микробиологическая диагностика полиомиелита

Механизм серологических реакций

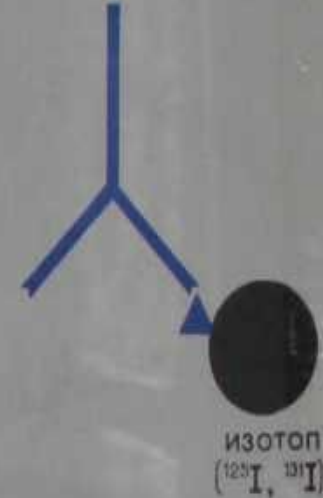
ПРЕЦИПИТАЦИЯ



АГГЛЮТИНАЦИЯ



РАДИОИММУННЫЙ МЕТОД



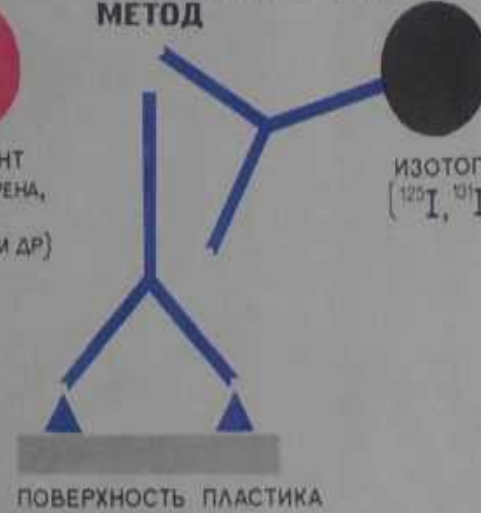
НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД



ТВЕРДОФАЗОВЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД



ТВЕРДОФАЗОВЫЙ РАДИОИММУННЫЙ МЕТОД



РАДИОАЛЛЕРГОТЕСТ



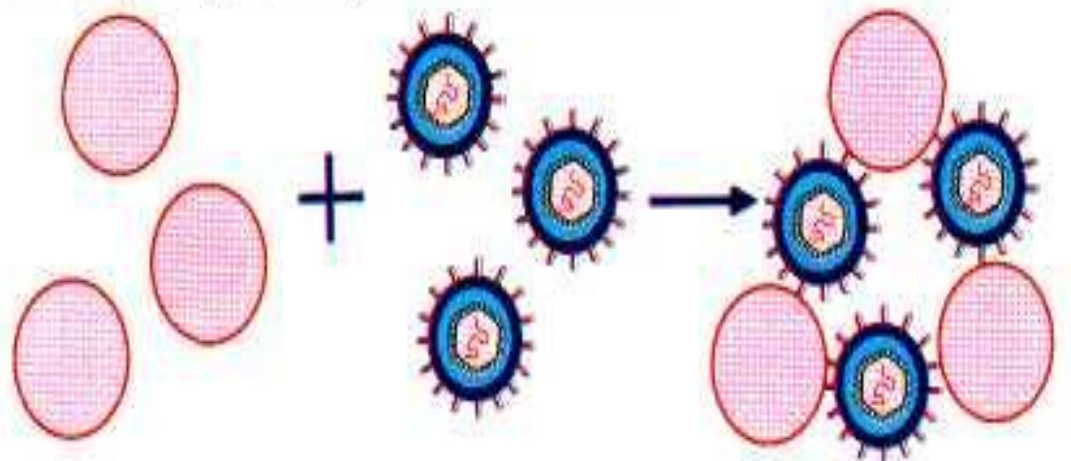
Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Гемагглютинины вирусов
склеивают эритроциты.

Это свойство используют в
реакции гемагглютинации для
индикации и титрования
вирусов, что необходимо для
последующей постановки
РТГА.

РТГА основана на блокаде
антигенов вирусов
(гликопротеиновых «шипов» -
гемагглютининов) антителами
иммунной сыворотки, в
результате чего вирусы
теряют свойство
агглютинировать эритроциты.

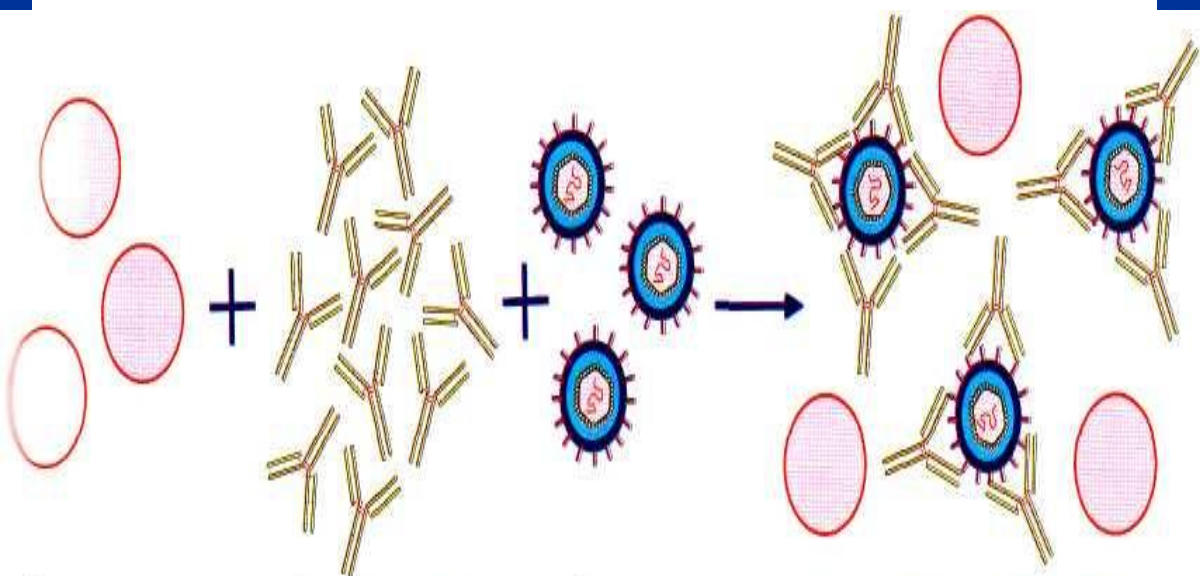
РТГА применяют для
диагностики инфекций,
возбудители которых (вирусы
гриппа, кори, краснухи,
клещевого энцефалита) могут
агглютинировать эритроциты
различных животных.



Эритроциты

Вирусы

Гемагглюцинация



Эритроциты

Антивирусные
антитела

Вирусы

Нейтрализация вирусов
антителами и торможение
гемагглюцинации

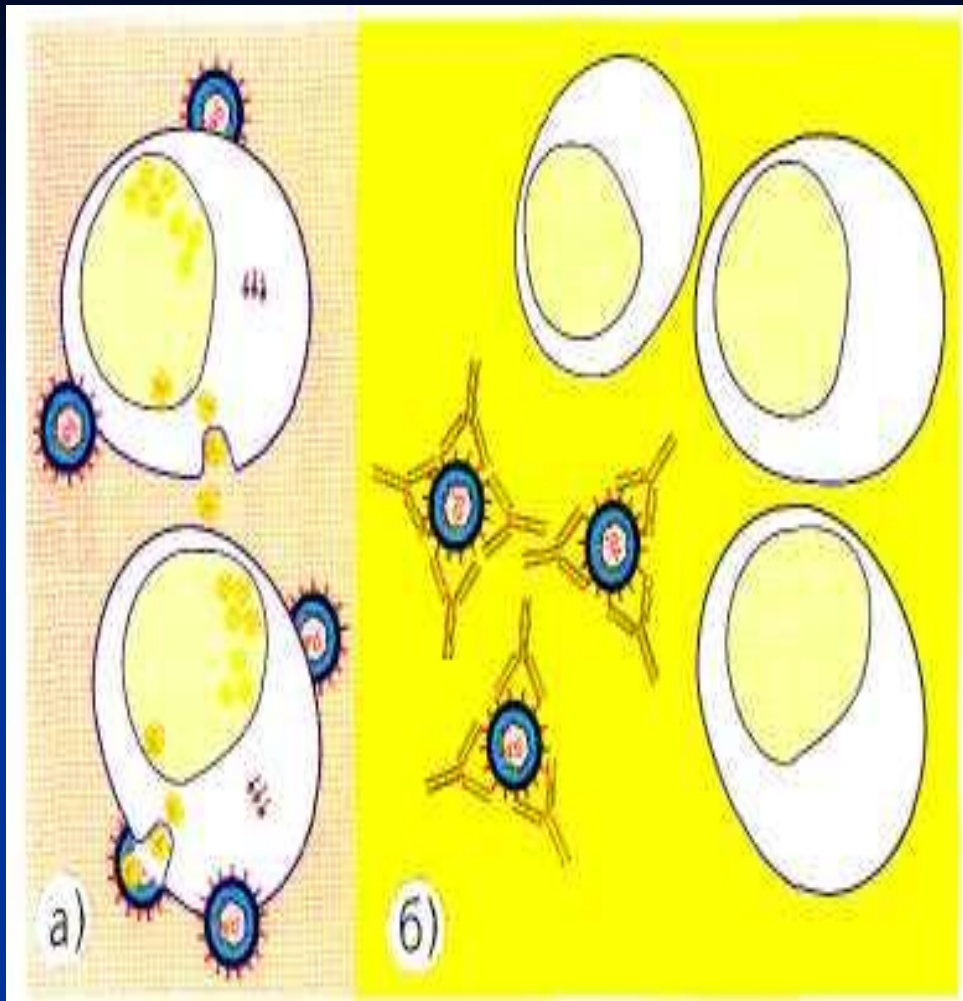
Реакция торможения гемагглютинации

Реакция нейтрализации

Антитела иммунной сыворотки способны нейтрализовать повреждающее действие микробов и их токсинов на чувствительные клетки, что связано с блокадой микробных антигенов антителами, т. е. их нейтрализацией.

Реакцию нейтрализации проводят путем введения смеси антиген-антитело животным или в чувствительные тест-объекты (в культуру клеток, эмбрионы).

Отсутствие у животных и тест-объектов повреждающего действия микроорганизмов, их антигенов, токсинов свидетельствует о нейтрализующем действии иммунной сыворотки и, следовательно, о специфичности взаимодействия комплекса антиген-антитело



Реакция связывания комплемента

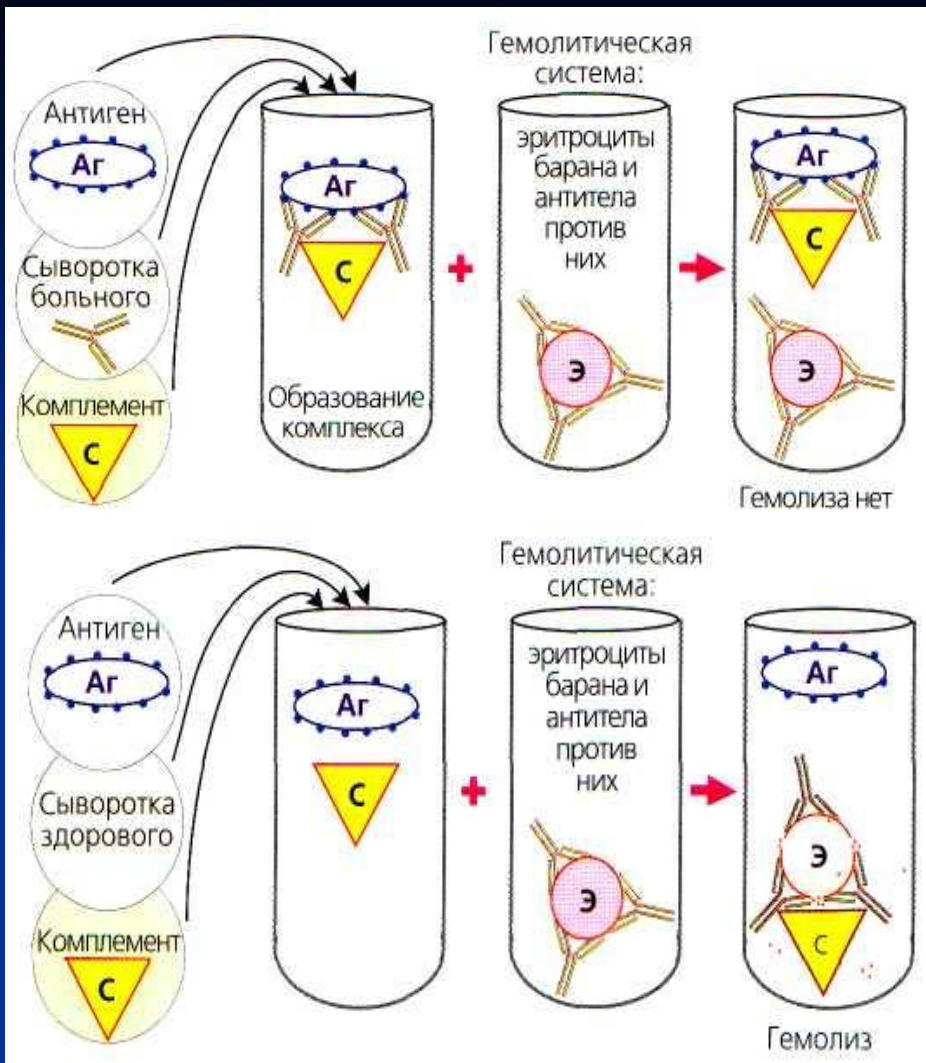
заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (С), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело.

Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным

РСК проводят в две фазы:

1-я фаза - инкубация смеси, содержащей антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) - выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним.



РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса (реакция Вассермана).

Иммуноферментный анализ

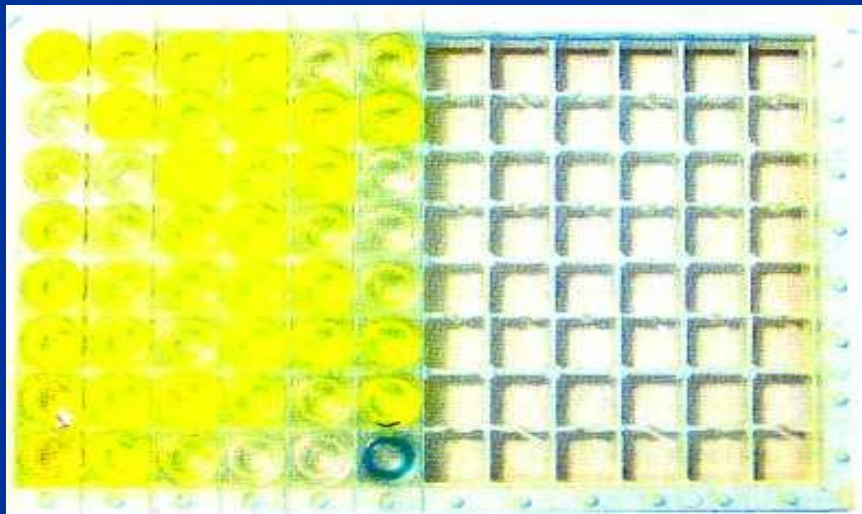
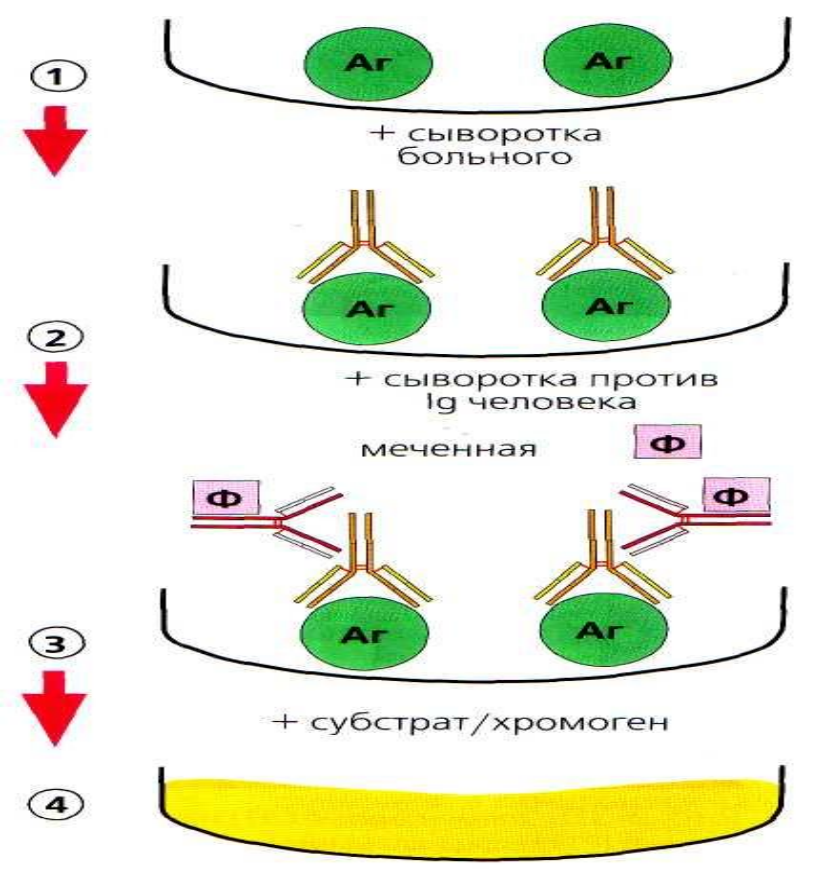
выявление антигенов или антител с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазой или щелочной фосфатазой).

После соединения антигена с меченной ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат пероксидазы - перекись водорода.

Субстрат расщепляется ферментом, что в конечном итоге приводит изменению цвета продукта реакции: интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты.

Твердофазный ИФА — вариант теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшеток из полистирола.



- На фоне резкого снижения и ликвидации полиомиелита наблюдаются полиомиелитоподобные заболевания, вызываемые преимущественно вирусами *Коксаки* и *ЕСНО*.

❖ Вирусы Коксаки



- образуют группу, близкую к полиовирусам.
- Семейство Picornaviridae, род Enterovirus.
- Вирусы Коксаки групп А и В (29 серотипов)
- В отличие от полиовирусов патогенны для новорожденных мышей,
- отличаясь друг от друга характером вызываемых у них поражений

◆ Вирусы Коксаки

Клинические проявления

- **Вирусы Коксаки группа А** - преимущественные поражения скелетной мускулатуры (диффузный миозит и очаговый некроз поперечно-полосатой мускулатуры). Вызывает герпангину (гепетиформные высыпания на задней стенке глотки), дисфагию, лихорадку; пузырьчатку в полости рта и конечностей, полимиелитоподобные заболевания, диарею у детей.
- **Вирусы Коксаки группы В** - поражения центральной нервной системы (параличи, некроз скелетной мускулатуры, миокарда), полимиелитоподобные заболевания, энцефалит, миокардит, плевродинию, плеврит, лихорадку.

◆ Вирусы Коксаки



◆ Антигенная структура вируса Коксаки

- Вирусы Коксаки не дают перекрестных серологических реакций с полиовирусами,
- группа А имеет 24 серовара,
- группа В - 6 сероваров.
- Серовары не содержат группоспецифического антигена, однако обладают некоторой перекрестной реактивностью.
- Наличие у возбудителей типоспецифических антигенов обуславливает синтез типоспецифических антител. Серовары Коксаки В и некоторые серовары Коксаки А обладают в отличие от полиовирусов гемагглютинирующими свойствами.

Лабораторная диагностика (Вирусы Коксаки)

- Вирусологический метод:
- ✉ Выделение вируса из фекалий, отделяемого носоглотки путём культуры клеток HeLa или почек обезьян
- ✉ заражения мышей сосунков (учёт патологических изменений) .
- Идентификация и принадлежность к сероварам определяют в в РТГА, РСК, РН с типоспецифическими сыворотками, ИФА.
- Эффективных методов специфической профилактики и противовирусной терапии не разработано.

ЕСНО - вирусы

- **вирусы** получили свое название от слов *Enteric* (кишечные) *Cytopathogenic* (цитопатогенные) *Human* (человеческие) *Orphan* (сиротские) вирусы. Они были выделены из кишечника человека, по ряду признаков оказались схожими с полиовирусами и вирусами Коксаки, однако первоначально не были связаны с какими-либо заболеваниями (т.е. оказались “сиротскими”).

ЕСНО - вирусы

Классификация и антигенная структура.

- В настоящее время кишечная группа ЕСНО - вирусов насчитывает 34 серовара.
- Разделение основано на типоспецифичности антигенов вирусного капсида.
- Некоторые антигены обладают перекрестной реактивностью,
- 12 серотипов способно к гемагглютинации

ЕСНО - вирусы

Патогенез

- заболеваний, вызываемых ЕСНО - вирусами сходен с патогенезом полиомиелита.
- Заражение происходит преимущественно фекально-оральным путем.
- Размножение вирусов происходит в эпителиальных клетках слизистых, а также в лимфоидной ткани.
- Способны вызывать “простудные заболевания” (по типу ОРВИ),
- Некоторые серотипы (11, 18 и особенно 19) - кишечные диспепсии, более редко - менингиты, восходящие параличи и энцефалиты,
- отдельные серотипы - гепатиты, конъюнктивиты, увеиты (серотипы 11 и 19).

Группа неклассифицированных энтеровирусов.

- наибольшее значение имеет *энтеровирус 72* - **вирус гепатита А** (*возбудитель болезни Боткина*) - *HAV* (*hepatitis A virus*).
- Вирусные гепатиты представляют большую разнородную по этиологии, но схожую по клиническим проявлениям группу тяжелых (по последствиям) заболеваний, широко распространенных в мире.

Классификация вирусных гепатитов

- Семейство *Picornaviridae*
- Род *Hepatovirus* (2 серотипа 1 – человека, 1 – обезьяны)
- Вирусы гепатита подразделяются на:
 - 📁 Энтеральные - гепатиты А и Е
 - 📁 Парентеральные – гепатиты В, С, D, F и G.

Классификация вирусных гепатитов

- Вирус гепатита А - энтеровирус 72,
- В - гепадновирус,
- С и G - тогавирусы рода Flavivirus,
- D - неклассифицированный вирус,
- Е - калицивирус.
- Из них вирусы гепатитов А и Е характеризуются преимущественно фекально-оральным механизмом передачи,
- В, С и G - парентеральным (гемоконтактным),
- D (дельта) - является дефектным вирусом - сателлитом вируса гепатита В, передаваемым парентерально и вертикально (от матери плоду).

Морфология вируса гепатита А

- Геном образует однонитевая молекула позитивной РНК.
- Диаметр вируса = 27-28нм
- Просто организован, имеет один вирусспецифический антиген. Содержит главный антиген (НА Ag), развитие иммунного ответа к которому обеспечивает прочный пожизненный иммунитет.
- “Голый” капсид с кубическим типом симметрии - икосаэдр.
- Белковая оболочка (капсид) содержит 4 структурных белка - VP1, VP2, VP3, VP4.
- НАV является одним из наиболее устойчивых во внешней среде вирусов.

Культивируют

- На культуре клеток
- Имеет длительный цикл репродукции
- ЦП эффект отсутствует

Гепатит А

- Резистентность:
- Устойчив во внешней среде и к нагреванию:
60⁰ – 12 час; кипячение – 5 минут
- Восприимчивы обезьяны мармозетки и шимпанзе.

Патогенез поражений гепатита А

- Механизма заражения фекально-оральный,
- Реплицируется в эпителии слизистой тонкой кишки и регионарных лимфатических узлах,
- Затем проникает в кровь (**наибольшие титры вируса в крови - в конце инкубационного и в преджелтушный период**),
- Выделяется с фекалиями.
- Затем возбудитель проникает в печень и вызывает **острый диффузный гепатит**, связанный с поражением гепатоцитов (основной мишени для размножения и цитопатогенного действия вируса) и ретикуло-эндотелиальных элементов печени.
- Это сопровождается снижением барьерной и дезинтоксикационной функций печени, нарушениями белкового, углеводного и пигментного обмена, возрастанием уровня в сыворотке крови альдолазы и печеночных (разрушение гепатоцитов) аминотрансфераз (аланин - и аспартат - аминотрансфераз), билирубина.

Клинические особенности.

- Наиболее типична острая желтушная циклическая форма,
- Однако преобладают легкие безжелтушные и бессимптомные формы. Для этой инфекции характерно относительно легкое течение, практическое отсутствие вирусоносительства и хронических форм болезни

Лабораторная диагностика

- 1. Определение желчных пигментов и аминотрансфераз в сыворотке крови.
- 2. ИФА для выявления антигенов вируса и IgM - антител к нему.
- Антигены HAV в фекалиях можно выявить только в конце инкубации до появления клинических проявлений.
- Наиболее надежный метод диагностики - обнаружение ранних антиHAV - IgM антител. Они выявляются практически у всех больных независимо от формы заболевания и свидетельствуют о наличии текущей или недавней инфекции.

Специфическая профилактика.

- Используют инактивированные вакцины против вируса гепатита А отечественного (“Геп - А инвак”) и зарубежного (“Хаврикс 1400” фирмы “Смит Кляйн Бичем”) производства. Трехкратная (при рождении, в 1 и 6 месяцев) вакцинация формирует защитный иммунитет у 99% детей.

Вирус гепатита E

Общая характеристика.

- Гепатит E - инфекция, имеющая эпидемиологическое сходство с гепатитом A, известная ранее как “гепатит ни -A, ни -B с фекально-оральным механизмом передачи”.

Морфология вируса гепатита E

- Возбудитель - вирус гепатита E (HEV) относится к семейству *калицивирусов*, однако в последние годы это ставится под сомнение.
- Он имеет сферическую форму,
- Диаметр вириона около 30 нм,
- Суперкапсида не имеет.
- Геном представлен однонитевой нефрагментированной позитивной РНК.
- Антигенного родства с HAV не имеет, отличается меньшей вирулентностью для человека.
- Представители семейства калицивирусов по ряду признаков близки пикорнавирусам.
- Свое название они получили от лат. *calix* - чаша за счет наличия чашеобразных углублений на поверхности капсида.
- Среди представителей семейства - возбудители гастроэнтеритов животных (например, вирус Норфолк), вирус гепатита E.

Эпидемиология вируса гепатита Е

- Вирус имеет фекально-оральный механизм распространения, реализуемый преимущественно при употреблении инфицированной воды.
- Вирус широко распространен в странах с жарким климатом и плохим водоснабжением, при употреблении некачественной воды (из арыков, оросительных каналов, загрязнении грунтовыми водами и т.д.) происходит заражение.
- Вспышки наблюдают в Юго-Восточной Азии, Африке, Южной Америке. Инфекция распространена в Среднеазиатском регионе.
- Особенность - высокая летальность HEV - инфекции у беременных во второй половине беременности.

Лабораторная диагностика гепатита Е.

- Разработаны тест - системы ИФА и иммуноблота для выявления антител к HEV классов IgM и IgG для диагностики в острой стадии болезни и в период реконвалесценции.
- Профилактика ВГЕ - неспецифическая.
Иммунитет - прочный, обусловлен вируснейтрализующими антителами и клетками памяти.

Ротавирусы.

В семейство реовирусов входят рода:

- реовирусов,
- ротавирусов
- орбивирусов.
- Название реовирусов происходит от *respiratory enteric orphan* - “reo”, т.е. респираторные кишечные вирусы.
- Эти вирусы имеют двунитевую фрагментированную РНК, окруженную капсидом с двуслойной оболочкой.

Патогенез реовирусной инфекции

- Реовирусная инфекция характеризуется поражением респираторного и кишечного трактов.
- Основной путь передачи:
 - воздушно - капельный, однако определенное значение имеет и
 - алиментарный, поскольку эти вирусы широко распространены не только у человека, но и у многих видов животных, люди могут получать эти вирусы алиментарным путем - с продуктами питания.

Ротавирусы

- Свое название получили в связи со своеобразием морфологии вируса (лат. rota - колесо).
- Впервые ротавирусы выявлены у детей с острым гастроэнтеритом из эпителиальных клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки.
- Вирионы при электронно-микроскопическом исследовании имеют вид колес диаметром 70 нм с круговым ободком по периферии и отходящими внутрь “спицами”.
- Имеют наружный и внутренний капсид, внутри которого содержится двунитевая фрагментиро-ванная РНК.

Ротавирусы

- К ротавирусам человека серологически близки ротавирус телят (Небраски) и обезьян, которые легче культивировать в клеточных культурах и которые используют в качестве антигенных препаратов для серодиагностики ротавирусной инфекции у людей.
- Ротавирус человека - **фекально-оральный вирус.**
- Он вызывает гастроэнтериты у новорожденных (внутрибольничные вспышки), дошкольников и младших школьников.
- В мире ежегодно регистрируют нескольких миллионов летальных исходов ротавирусного гастроэнтерита у детей. Наиболее опасны больные в первые 3 - 5 дней заболевания в связи с интенсивным выделением вируса с фекалиями.

Ротавирусы

Лабораторная диагностика

- основана на:
- выявлении антигена вируса в фекалиях в ИФА, реакция коаглютинации, РИФ, РНК - зонды, иммунная электронная микроскопия), серологических методах (РСК, РТГА, ИФА), изоляции на культурах клеток.
- Орбивирусы - вирусы клещей и насекомых (например, вирус Кемерово).