

Занятие 15.

Микробиологическая диагностика респираторных вирусных инфекций (семейства Adenoviridae и Coronaviridae, род Rhinovirus) и оспы (семейство Poxviridae)

prof. Akif Qurbanov

Обсуждаемые вопросы

- Семейство *Adenoviridae* и общая характеристика аденовирусов человека (морфобиологические, антигенные особенности, классификация, вызываемые ими заболевания. Микробиологическая диагностика аденовирусных инфекций.
- 2. Семейство *Coronaviridae*, общие свойства, вызываемые ими заболевания и микробиологическая диагностика.
- 3. Род *Rhinovirus*, общая характеристика, вызываемые ими заболевания и микробиологическая диагностика.
- 4. Семейство *Poxviridae*, общая характеристика. Вирус обезьяньей оспы. Патогенетические особенности. Микробиологический диагноз.

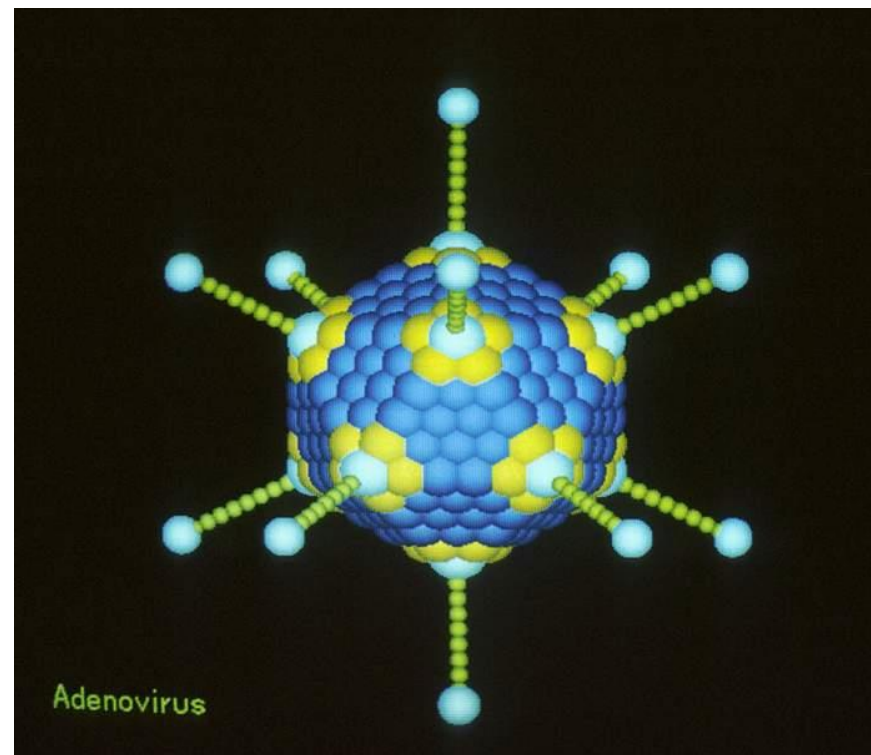
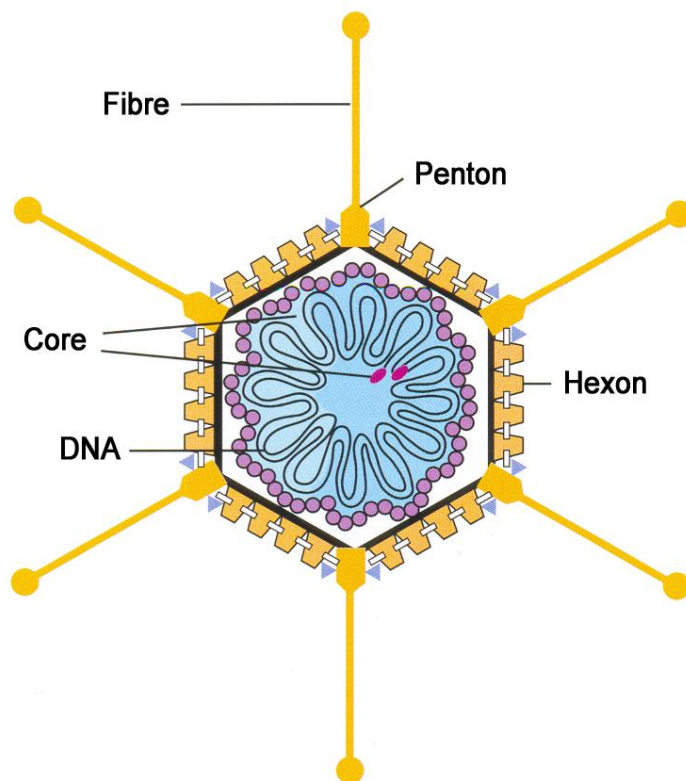
Цель занятия :

- ознакомить с морфо-биологическими особенностями аденовирусов, коронавируса, риновирусов, поксвирусов и предоставить информацию о лабораторных методах диагностики заболеваний, вызываемых этими вирусами.

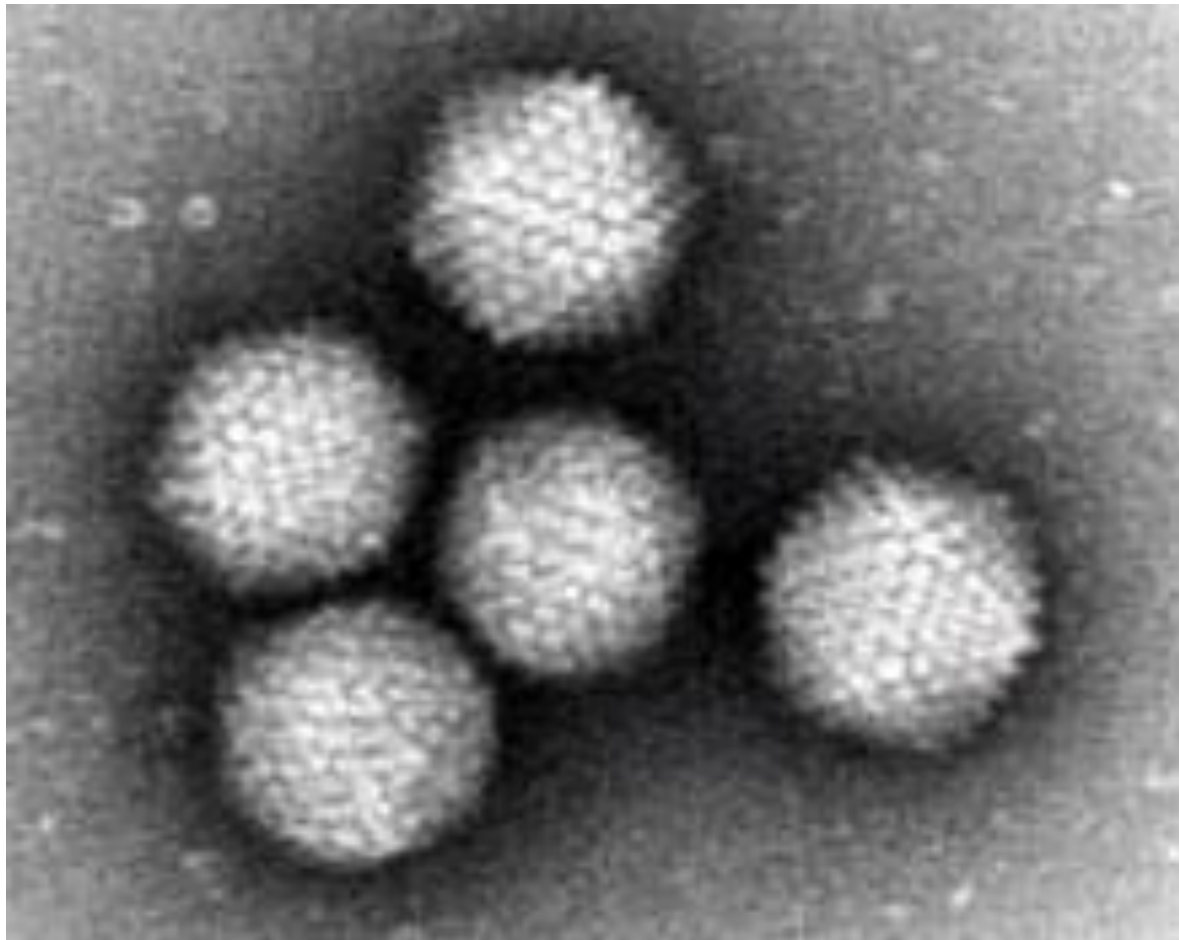
Аденовирусы

- Семейство *Adenoviridae* состоит из двух родов: род *Mastadenovirus* — аденовирусы млекопитающих 80 серотипов, род *Aviadenovirus* — аденовирусы птиц 14 серотипов. Аденовирусы, вызывающие заболевания у человека, являются представителями рода *Mastadenovirus*.
- Аденовирусы — простые вирусы без внешней оболочки, диаметром около 70–90 нм. Капсид имеет икосаэдрическую симметрию и состоит из 252 капсомеров. 240 капсомеров имеют форму гексона (шестиугольника), они образуют нити (гранулы) на поверхности вириона. 12 капсомеров имеют пентонную (пентагональную) форму, от этих пентонов наружу отходят фибриллы (выпячивания), образующие вертикали (уголки) на поверхности вириона.
- Геном аденовирусов состоит из линейной двухцепочечной молекулы ДНК.

Аденовирусы



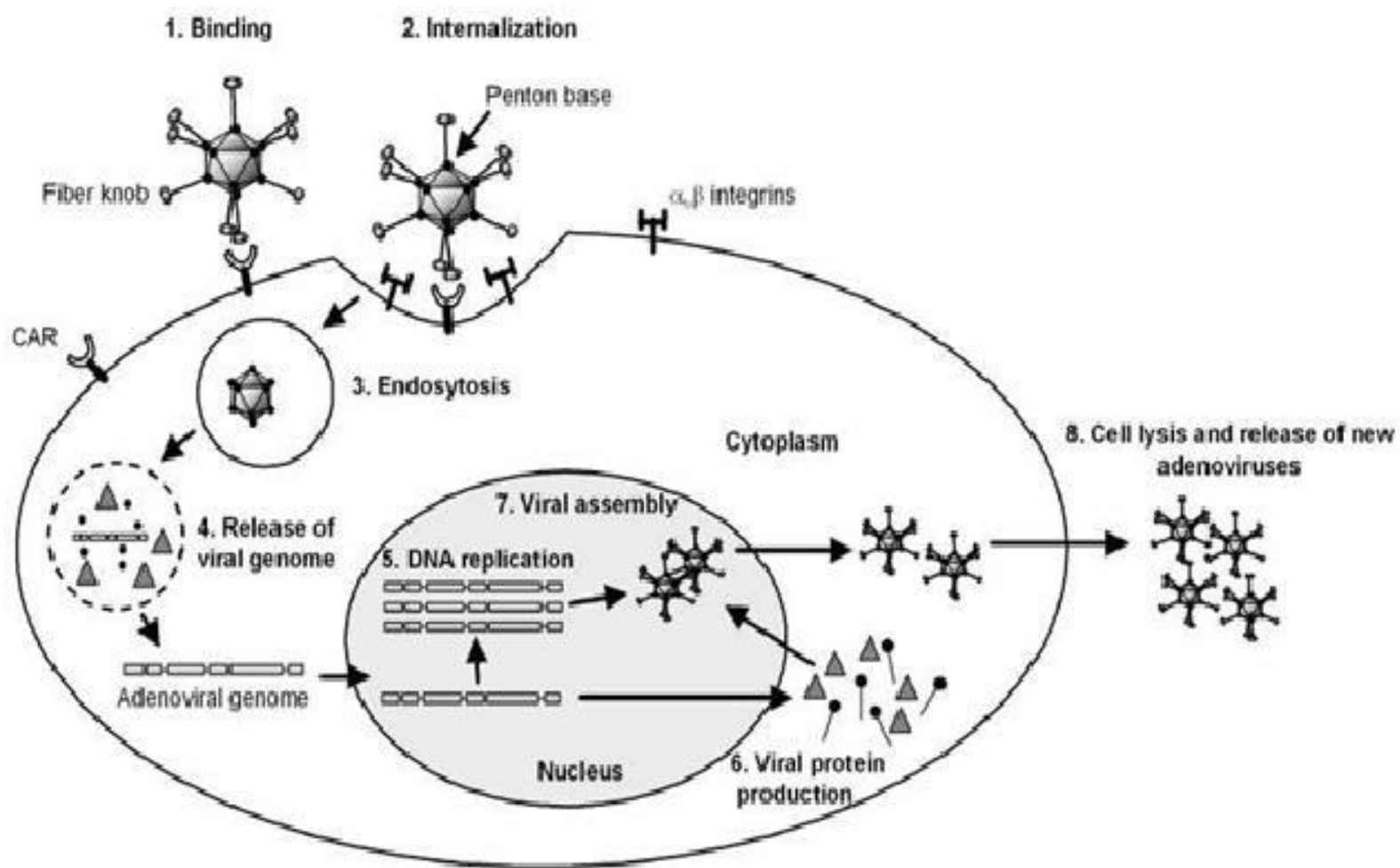
Аденовирусы



Аденовирусы

- **Антигенная структура и классификация** - гексоновые и пентонные капсомеры составляют основные поверхностные белки вириона. Эти белки содержат антигены с групповой и типовой специфичностью.
- Аденовирусы человека делятся на 6 групп (А, В, С, D, Е, F) по своим физическим, химическим и биологическим характеристикам.

Аденовирусы (репродукция)



Аденовирусы (культивация)

- Аденовирусы можно культивировать в культурах клеток человеческого происхождения, особенно в первичных клетках почечного эпителия и трансплантированных клеточных культурах. Вирус оказывает цитопатическое действие за счет набухания, роста и агрегации клеток, а некоторые виды образуют внутриядерные включения в инфицированных клетках.

Аденовирусы

- Аденовирусы более устойчивы к факторам окружающей среды. Сохраняет свою активность в течение двух месяцев при 4°C, в течение нескольких минут при 56°C, не инактивируются эфиром и хлороформом.

Аденовирусы

- Источник инфекции и пути заражения. Аденовирусы в основном вызывают острые респираторные заболевания у человека. Источником инфекции являются больные острой и латентной аденовирусной инфекцией. Заражение происходит воздушно-капельным, контактным, иногда фекально-оральным путем.

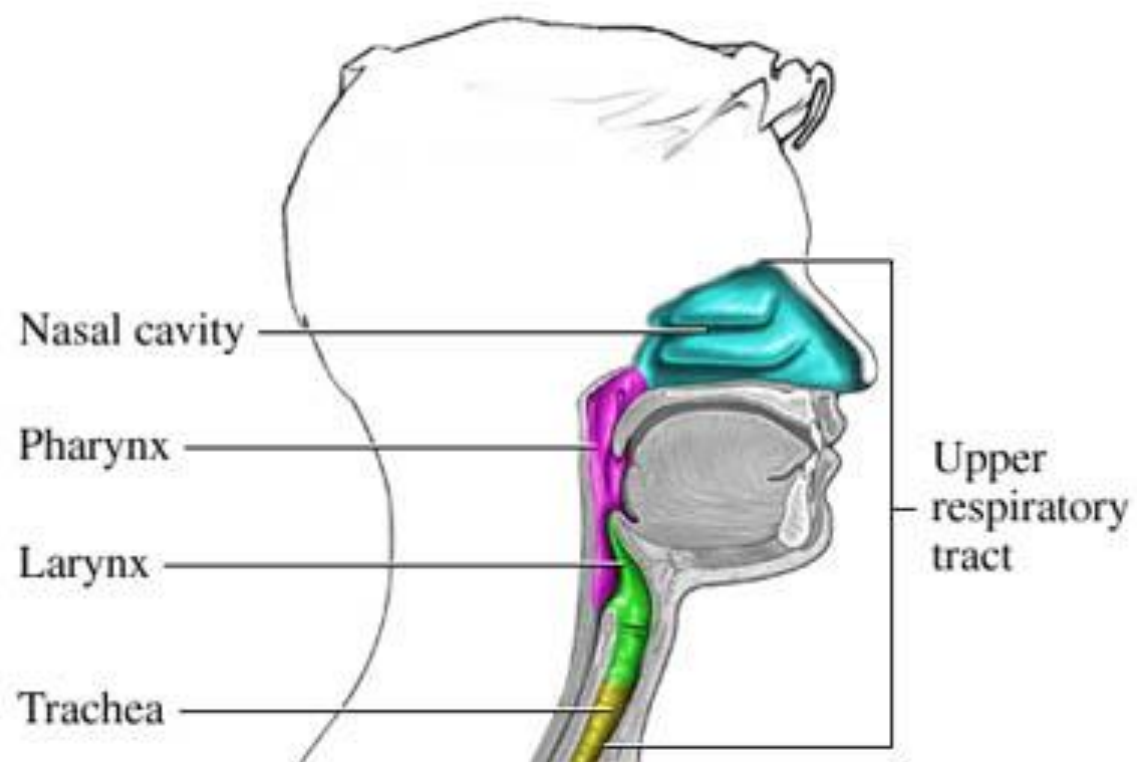
Аденовирусы (патогенез)

- Начальная репродукция вируса происходит в слизистых оболочках дыхательных путей, конъюнктиве, кишечнике и лимфоидной ткани регионарных лимфатических узлов.
- По характеру поражения чувствительных клеток различают продуктивный, абортивный и персистирующий типы инфекции. Продуктивная инфекция сопровождается высвобождением популяции вирионов и гибелью клеток-хозяев. Абортивная инфекция наблюдается в случаях заражения клеток со слабой чувствительностью, когда вирионы не выделяются из клетки. Персистентная инфекция наблюдается при ослаблении скорости репродукции вируса. Такая инфекция имеет хроническое и бессимптомное течение.

Аденовирусы (клинические проявления)

- Симптомы заболевания обычно наблюдаются после инкубационного периода продолжительностью 4-5 дней.
- Респираторные инфекции вызываются аденовирусами группы С. Аденовирусы серотипов 3, 7 и 21 вызывают аденовирусную пневмонию. Вирусные серотипы 3 и 7 вызывают фарингоконъюнктивальную лихорадку. Аденовирусы серотипов 8, 19 и 37 вызывают эпидемический конъюнктивит, а серотипы 40 и 41 – гастроэнтерит.

Аденовирусные инфекции



Аденовирусы (микробиологическая диагностика)

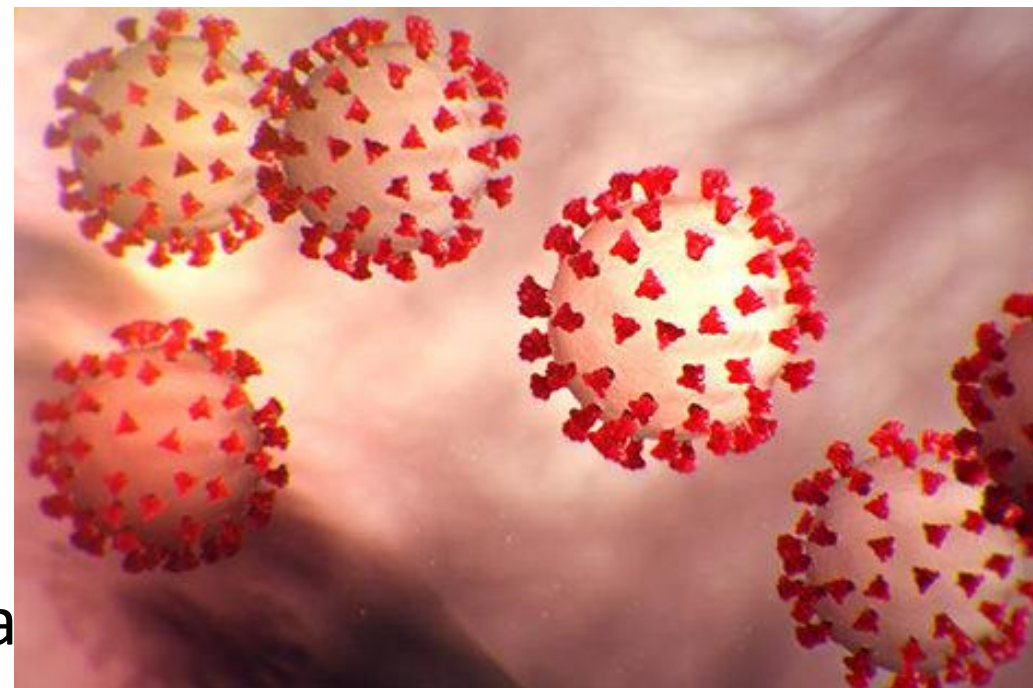
- В качестве материала для исследования используют выделения из носоглотки, зевоу, конъюнктивальное отделяемое, кал и мочу.
- Аденовирусы могут быть получены в культурах эпителия почек эмбрионов человека. Идентифицировать вирусы в культуре клеток можно по характеру цитопатического действия и идентифицировать их по ИФР, ИФА, РТГА, РН. Аденовирусы можно обнаружить с помощью ПЦР в образцах тканей, а также в биологических жидкостях.

Аденовирусы

- Лечение – специфического противовирусного лечения аденовирусных инфекций не существует. Проводится симптоматическое лечение.
- Специфическая профилактика – пероральная вакцина, изготовленная из аденовирусов типов 4 и 7, используется в США с 1971 года. После вакцинации вирусы размножаются в эпителии кишечника и индуцируют вируснейтрализующие антитела. Производство этой высокоэффективной вакцины прекращено с 1999 года из-за онкогенных свойств аденовирусов.

Семейство *Coronaviridae* (коронавирусы)

- Представитель семейства *Coronaviridae* впервые был выделен от больного острым ринитом .
- Коронавирусы широко распространены в природе, вызывают различные заболевания у человека и животных .
- Особенности коронавирусов человека изучены недостаточно из-за трудностей культивирования.

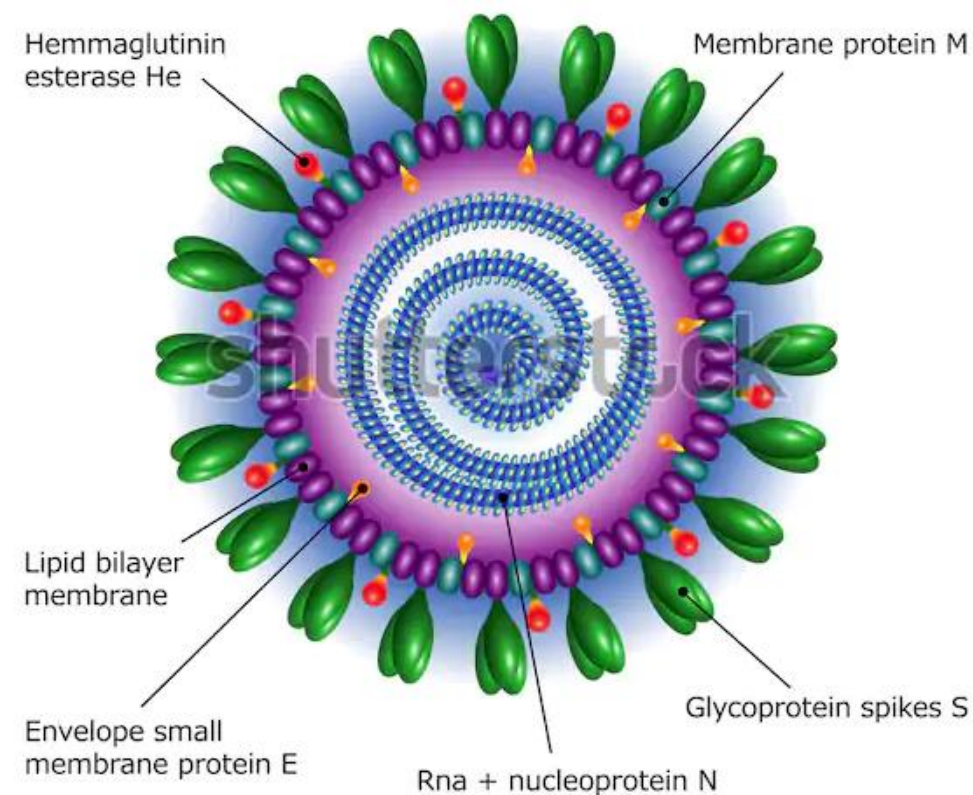


Классификация коронавирусов

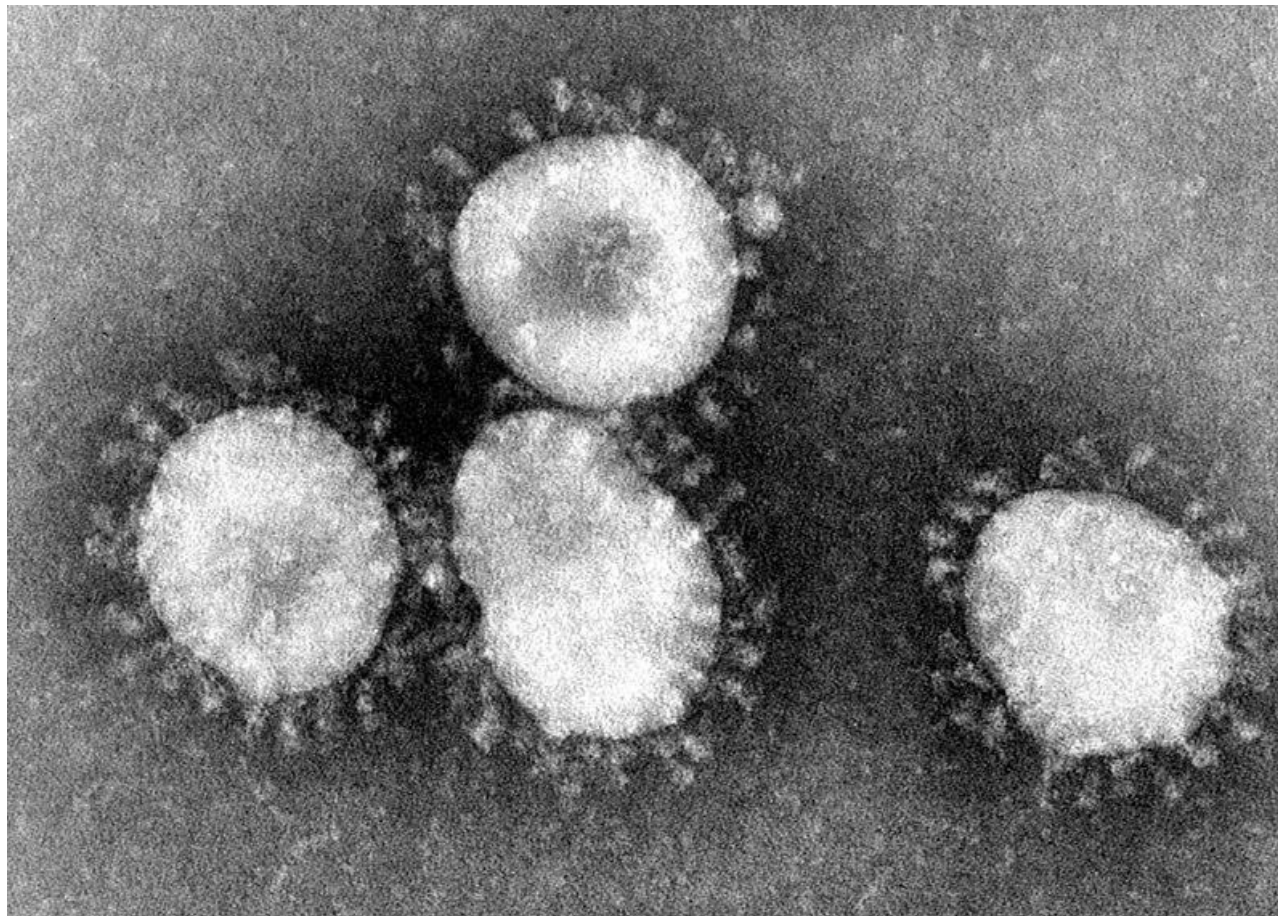
- Семейство *Coronaviridae* включает два рода - *Coronavirus* и *Torovirus*. Торовирусы широко распространены в природе, вызывающие кишечные инфекции. Коронавирусы человека разделены на серотипы, которые называются 229E (1-ая серогруппа) и OC43 (2-ая серогруппа).
- Представитель рода *Coronavirus* вирус SARS (*severe acute respiratory syndrom* – тяжелый острый респираторный синдром) также относится ко 2-ой серогруппе.
- Коронавирусы, выделенные от людей и животных имеют общие антигены.
- В процессе репликации коронавирусы подвергаются **мутациям** и **рекомбинациям**. Не характерная для несегментированных РНК-геномных вирусов столь высокая частота генетической изменчивости является причиной возникновения новых штаммов вирусов.

СТРОЕНИЕ КОРОНАВИРУСОВ

- Коронавирусы - округлые оболочечные вирусы с диаметром 120–160 нм. Сердцевина вириона состоит из спирального нуклеокапсида и одноцепочечной плюс РНК. Нуклеокапсид окружен внешней мембраной. На поверхности внешней оболочки имеют многочисленные выступы длиной 20 нм булавовидной формы или напоминающие лепестки. Наличие гликопротеинов придает вириону вид солнечной короны.
- Структурные белки вириона представлены белком нуклеокапсида (N), связанным с нуклеокапсидом матриксным гликопротеином (M) внешней мембраны, и S-гликопротеином, образующим выступы. Некоторые коронавирусы также содержат гликопротеин (HE), который обладает активностью гемагглютинаина и ацетилэстеразы.



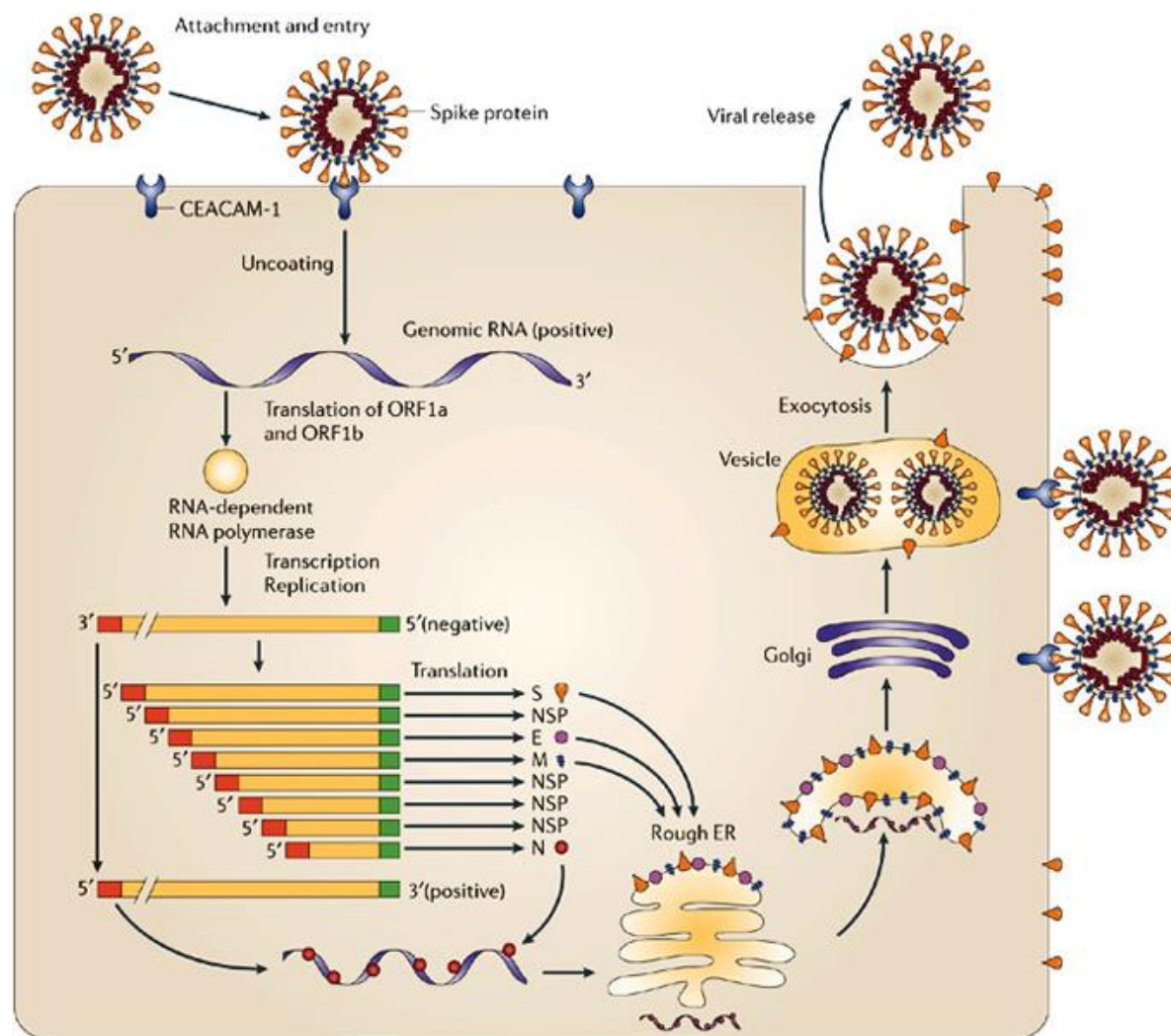
Коронавирусы - электронная микроскопия



РЕПРОДУКЦИЯ КОРОНАВИРУСОВ

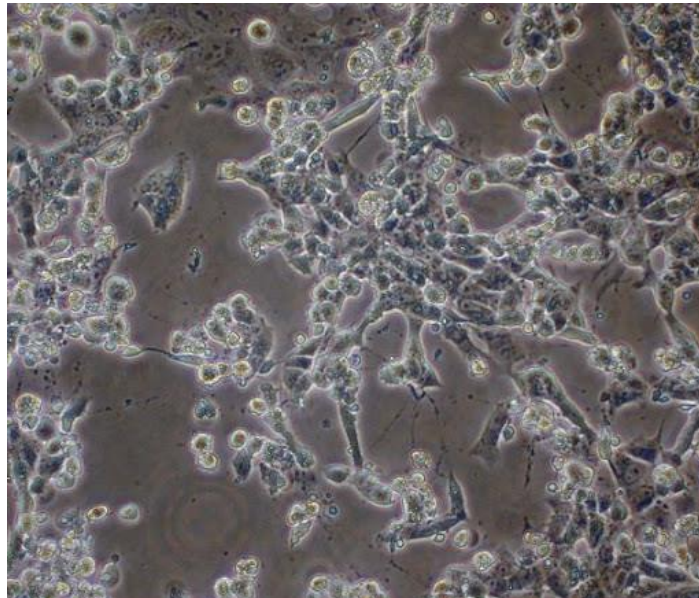
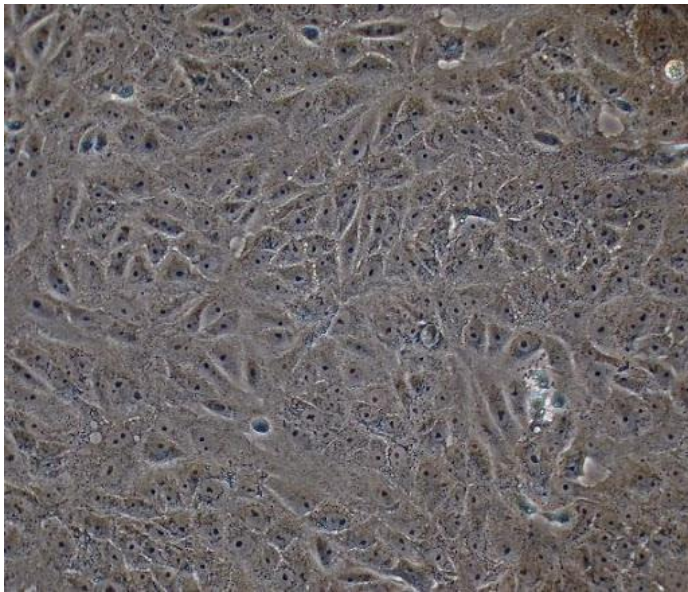
- Коронавирусы репродуцируются в цитоплазме клеток человека и животных – их естественных хозяев.
- После того, как коронавирусы связываются с клеткой через поверхностные S- или HE-гликопротеины, они проникают в клетку путем эндоцитоза и депротенинизируются. Репродукция вирусов происходит в цитоплазме.
- Вирусные частицы отпочковываются от мембран эндоплазматического ретикулума или комплекса Гольджи, в которые встроены вирусные гликопротеины. Сформированные вирионы покидают клетку экзоцитозом или в результате ее разрушения.
- Некоторые коронавирусы вызывают персистирующие инфекции, не вызывающие гибель клетки. Некоторые коронавирусы вызывают слияние клеток посредством S-гликопротеинов.

Схема репродукции коронавирусов



Культивирование коронавирусов

- Коронавирусы человека трудно культивируются в культурах клеток .
- Возможно использование культур клеток эмбриона человека и первичных эпителиальных клеток.
- Вирусы *SARS* и *Covid-19* возможно культивировать на культурах клеток эпителия почки мартышек (*Vero культуры*)
- Возбудители заболеваний птиц размножаются в куриных эмбрионах.



Цитопатический эффект Covid-19 на клеточной культуре *Vero E6* (Франция, 2020 г.)



On the left, a cell layer (***Vero E6***) not damaged by the viruses. **On the right**, a cell layer with a visible cytopathic effect (CPE); the cells infected by the virus have been destroyed.

Устойчивость к факторам внешней среды

- При комнатной температуре сохраняются в течение нескольких дней.
- Устойчивы к низким температурам, хорошо переносят лиофилизацию.
- Вирусы чувствительны к воздействию жирорастворителей , кислот и щелочей , УФ-лучам; при нагревании до 56⁰С погибают через 10-15 мин.

Источник инфекции и пути передачи

- Источник инфекции – больной человек.
- Путь заражения – воздушно-капельный, возможен и контактный путь передачи
- Входные ворота инфекции - верхние дыхательные пути.
- При попадании в пищеварительный тракт возможно развитие гастроэнтеритов.



Патогенез коронавирусной инфекции

- Патогенез коронавирусной инфекции все еще недостаточно изучен
- Проникшие в организм вирусы обычно локализуются во входных воротах – верхних дыхательных путях и вызывают острую респираторную инфекцию
- Возбудители *SARS* и *Covid-19* проникают в нижние дыхательные пути, и вызывают **пневмонию** протекающую с прогрессирующей дыхательной недостаточностью.
- Способность коронавирусов вызывать гастроэнтериты до сих пор не подтверждена, так как вирус не удается выделить из испражнений

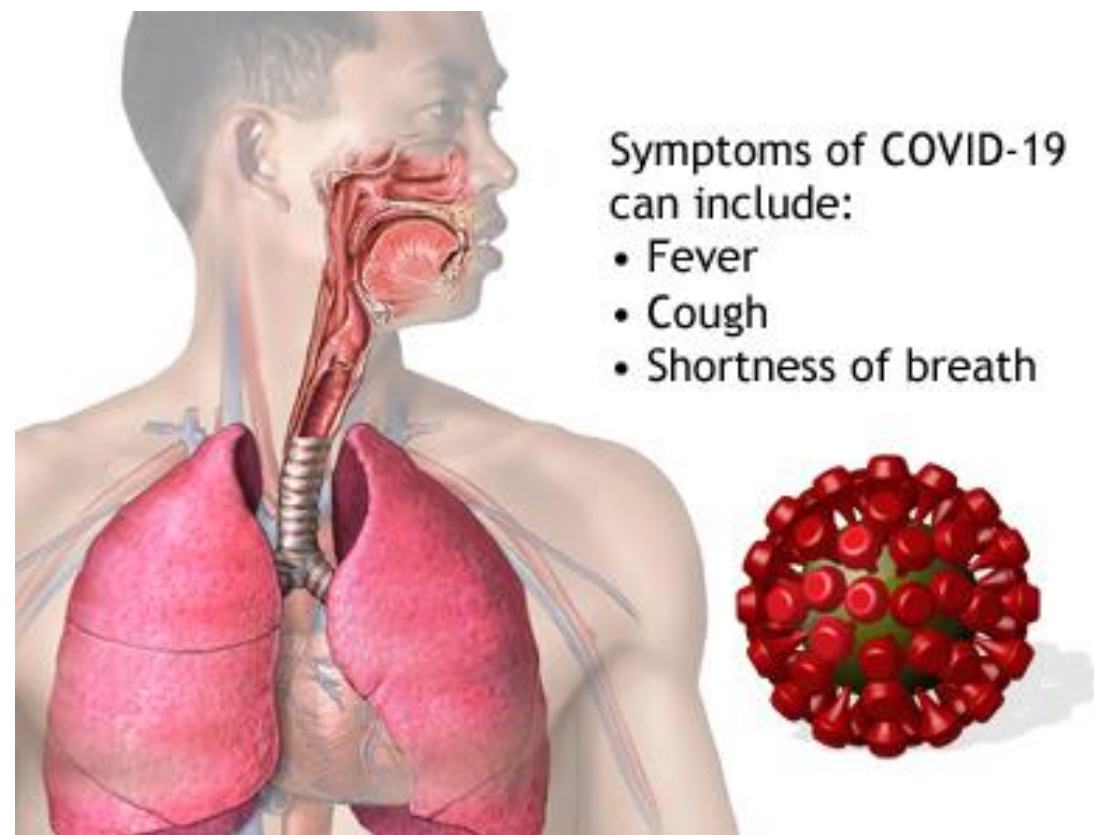
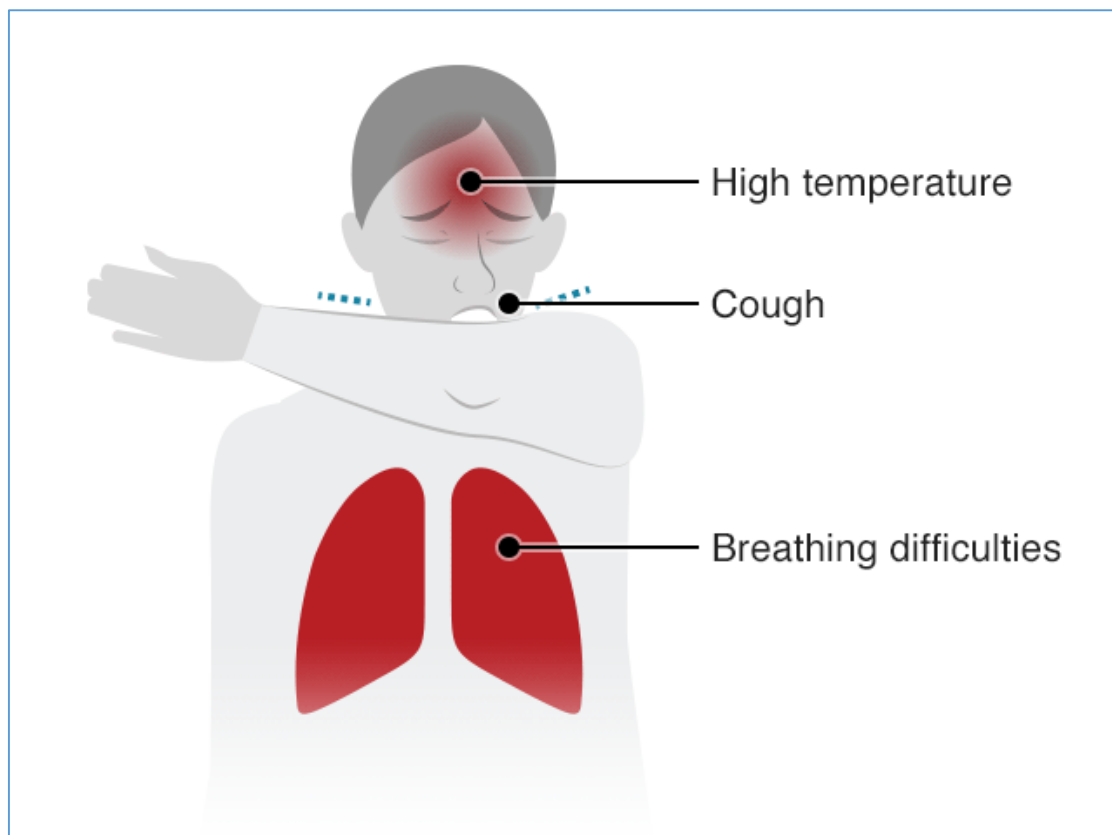
Клинические проявления коронавирусных инфекций

- Инкубационный период при коронавирусных инфекциях составляет 2-5 дней, а длительность заболевания длится около 1 недели. Инфекция сопровождается симптомами простуды, насморком, протекает без температуры.
- **Тяжелый острый респираторный синдром (SARS)** - тяжелый острый респираторный синдром впервые был зарегистрирован в Китае в 2003 году. В течение года болезнь распространилась в 29 странах, и стала причиной смерти 800 человек из более чем 8000 инфицированных. Предположительно что заболевание, естественным резервуаром которого являются летучие мыши, вызвано новыми видами вирусов возникшими в результате генетической рекомбинации между вирусами людей, свиней и домашних птиц в южных провинциях Китая
- Начинаясь с лихорадки, головной боли, кашля и боли в горле после инкубационного периода продолжительностью около 6-ти дней, SARS приводит к пневмонии, при которой развивается дыхательная недостаточность. В некоторых случаях больным требуется искусственная вентиляция легких. Хотя смертность вследствие дыхательной недостаточности достигает около 10%, у людей пожилого возраста она может быть выше.

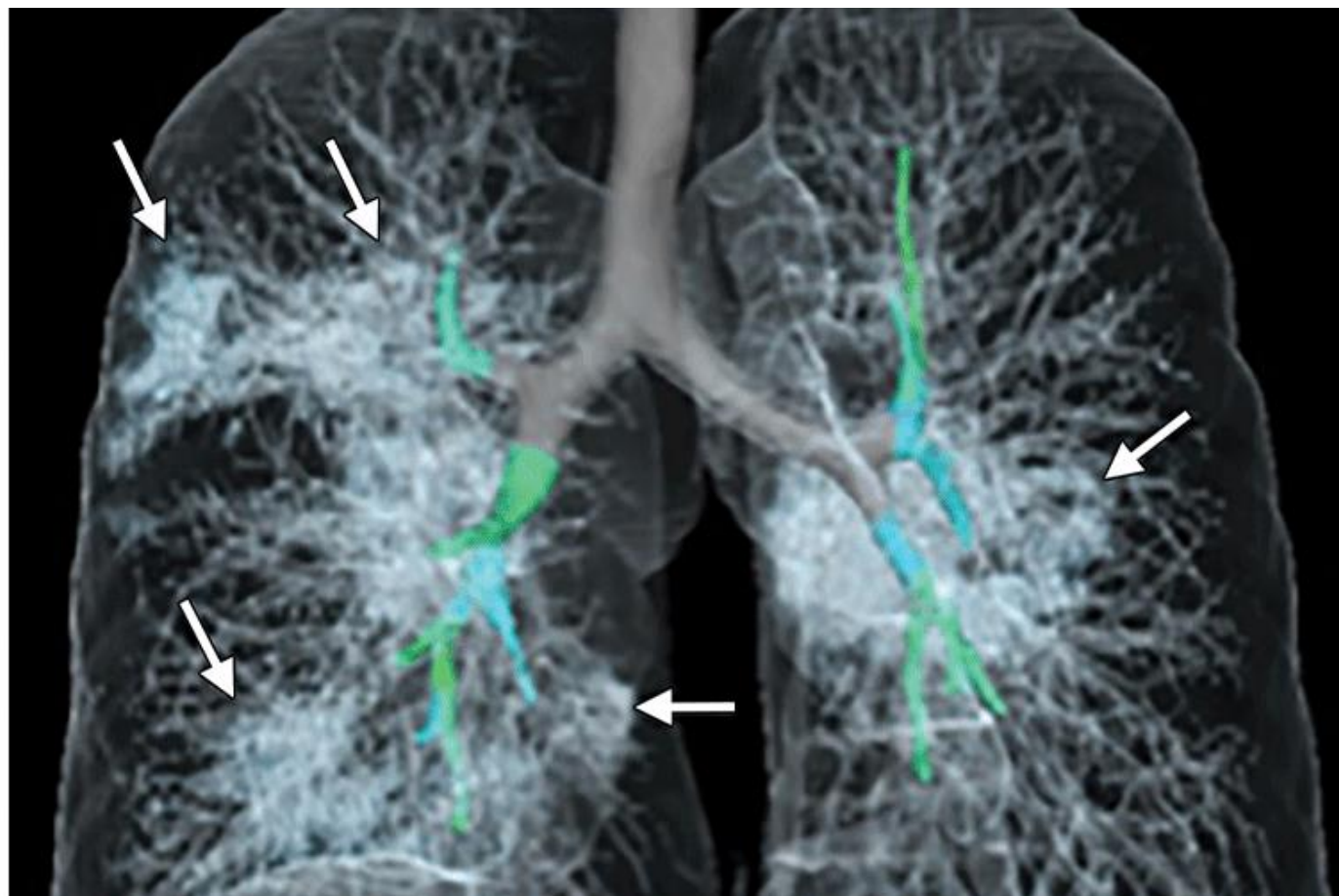
Клинические проявления коронавирусной инфекции

- Новый тип коронавирусной инфекции **Covid-19** - впервые был зарегистрирован в 2019 году в китайском городе Ухане. Всего за несколько месяцев болезнь распространилась во многих странах мира вызвав **пандемию**, в результате которой заразилось 107 454 322 человек, и погибло 2 357 406 человек (*статистика университета Джонса Хопкинса к 11.02.2021)
- Происхождение вируса, естественным резервуаром которого предположительно являются летучие мыши, пока не установлено.
- После инкубационного периода продолжительностью около недели наблюдаются лихорадка, головная боль, кашель, боли в горле, ослабление или потеря обоняния. Обычно Covid-19 не отличается от других респираторных вирусных инфекций, но у пожилых, особенно у людей с сопутствующими заболеваниями, размножение вирусов в альвеолах легких приводит к **пневмонии**, вызывающей дыхательную недостаточность.
- В тяжелых случаях больным требуется искусственная вентиляция легких. Хотя смертность вследствие дыхательной недостаточности достигает около 3-4%, у людей пожилого возраста она может быть выше.
- У 25% пациентов наблюдается **бессимптомное заболевание**

Клинические проявления коронавирусной инфекции



Covid-19 – новый тип коронавирусаной инфекции (двусторонняя пневмония)



Иммунитет

Возможны повторные случаи заболевания(реинфекция) несмотря на формирование гуморального иммунитета, сохраняющегося в течение нескольких лет.

Микробиологическая диагностика коронавирусных инфекций

- Определение вирусов в секретах респираторного тракта возможно при помощи ИФА, РИФ и ПЦР
- РНК вируса *SARS* и *Covid-19* можно обнаружить в крови
- Поскольку культивирование вируса в культуре клеток затруднено, серологический метод является основным в диагностике.
- Повышение титра антител при исследовании парных сывороток в ИФА, может подтвердить коронавирусную инфекцию.



Род *Rhinovirus*

- Род *Rhinovirus* (риновирусы) входят в семейство *Picornaviridae*. Известно более 100 серотипов.
- На основании взаимодействия с клеточными рецепторами риновирусы делятся на две группы:
- Рецепторами для риновирусов **мажорной рецепторной группы** являются межклеточные адгезивные молекулы (*intercellular adhesion molecule* - *ICAM-1*), экспрессируемые на эпителиальных клетках, фибробластах и эндотелиальных клетках
- Риновирусы **минорной рецепторной группы** взаимодействуют с липопротеиновыми рецепторами клеток (*low-density lipoprotein reseptor* - *LDLR*)

Риновирусы

- Размножаются и вызывают цитопатические изменения во многих человеческих культурах клеток.
- Трудно культивируемые риновирусы возможно культивировать в органных культурах эпителия трахеи
- Репликация риновирусов протекает лучше при температуре, близкой к температуре верхних дыхательных путей (33⁰C) .

Патогенез и клинические проявления риновирусных инфекций

- Риновирусы патогенны только для человека и некоторых обезьян (шимпанзе). Источником инфекции являются больные люди. На 2-4 дни болезни вирусы накапливаются в высоких концентрациях в носовом отделяемом и передаются воздушно-капельным путем.
- Риновирусы проникают в организм через верхние дыхательные пути. Репликация вирусов происходит в эпителиальных клетках слизистой оболочки носовой полости (отсюда и название вируса).
- Инкубационный период длится 2-4 дня. Заболевание не отличается от других «простудных» вирусных инфекций и сопровождается заложенностью носа, ринитом и болью в горле. Нарушается или исчезает обоняние. Иногда наблюдаются головная боль, легкий кашель и общая слабость. Заболевание длится неделю. Присоединении вторичных бактериальных инфекций особенно у детей приводит к развитию таких осложнений, как отит, синусит, бронхит и пневмония.

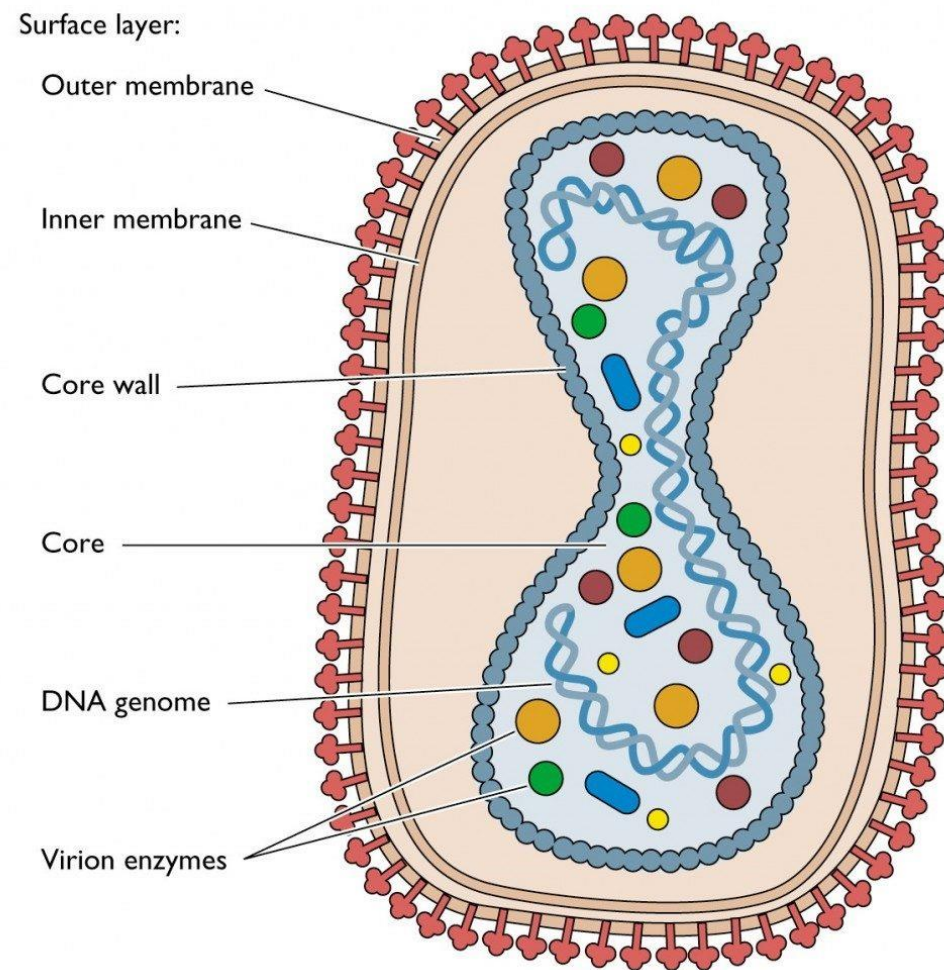
Иммунитет при риновирусных инфекциях

- К концу первой недели заболевания одновременно в сыворотке крови и носовом отделяемом определяются вируснейтрализующие антитела.
- Хотя титр антител постепенно снижается, они определяются в крови в течение долгого времени

Семейство Poxviridae

- Поксвирусы — самые крупные вирусы размером 230х400 нм. Вирион имеет яйцевидную форму, состоит из мембраны, наружной мембраны и ядра (ДНК и белков), расположенного между боковыми тельцами. Геном вириона состоит из двухцепочечной линейной ДНК. Размножение происходит только в цитоплазме, внутри инфицированных клеток наблюдаются тельца Гварниери. Вирионы отпочковываются от плазматической мембраны и высвобождаются при лизисе клетки.

Строение поксвирусов



Оспа обезьян

- Оспа обезьян — редкое заболевание, вызванное заражением вирусом оспы обезьян. Вирус оспы является частью того же семейства вирусов, что и вирус натуральной оспы, вызывающий оспу. Симптомы оспы обезьян сходны с симптомами оспы, но мягче, и оспа обезьян редко приводит к летальному исходу. Это заболевание не связано с ветряной оспой.
- Оспа обезьян была открыта в 1958 году, когда в колониях обезьян, содержащихся для исследований, вспыхнули две болезни, напоминающие оспу. Несмотря на название «обезьянья оспа», источник болезни неизвестен. Однако африканские грызуны и приматы (такие как обезьяны) могут быть переносчиками вируса и заражать людей.
- Первый случай оспы обезьян у человека был зарегистрирован в 1970 г. В преддверии вспышки 2022 года оспа обезьян была зарегистрирована в нескольких странах Центральной и Западной Африки.
- 13 мая 2022 г. ВОЗ была уведомлена об оспе обезьян у двух человек из одной семьи в Соединенном Королевстве.

Оспа обезьян распространяется несколькими путями:

- при тесном контакте, в том числе при прямом контакте с сыпью, зудом или биологическими жидкостями больного, при прикосновении к предметам, тканям (одежда, постельное белье или полотенца) и поверхностям, которыми кто-то пользуется.
- слюной.
- Также беременная женщина может передать вирус своему плоду через плаценту.

Клинические проявления оспы обезьян:

Симптомы обычно появляются в течение 3 недель после заражения вирусом. Сыпь обычно появляется через 1-4 дня после гриппоподобных симптомов. Человек с обезьяньей оспой может передавать ее другим с момента появления симптомов до полного заживления сыпи и образования нового слоя кожи. Заболевание обычно длится 2-4 недели. К основным клиническим признакам относятся:

Температура

Головная боль

Мышечные боли и боль в спине

Увеличение лимфатических узлов

Озноб

Усталость

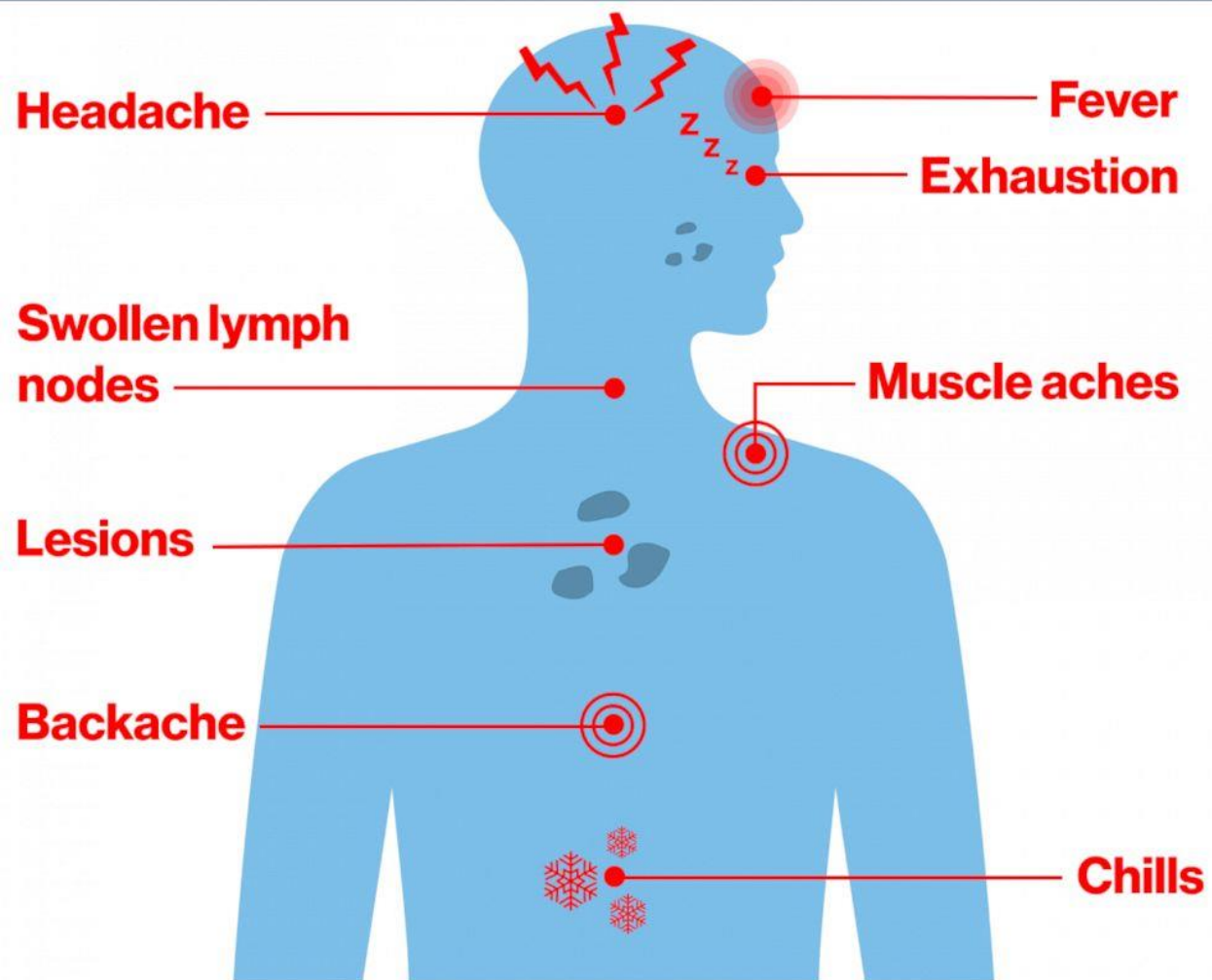
Респираторные симптомы (боль в горле, заложенность носа, кашель)

Сыпь, которая может быть на гениталиях или рядом с ними, анусе, но также может появляться на других участках, таких как руки, ноги, грудь, лицо или рот.

Прежде чем зажить, высыпания проходят несколько стадий, включая зуд.

MONKEYPOX SYMPTOMS

LASTS BETWEEN 2-4 WEEKS



Кожные высыпания при оспе обезьян



Рспа обезьян (везикулы)



Микробиологическая диагностика

В качестве исследуемого материала используются:

Содержимое везикул

носоглоточная слизь

Кровь

поврежденные органы и ткани

Микробиологическая диагностика

- *Электронная микроскопия*
- *Молекулярно-генетический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР)*
- *Серологический метод:*
 - определение вирусного антигена по реакциям гемагглютинации и торможения гемагглютинации
 - Определение антител к ортопоксвирусам методом ИФА, реакции нейтрализации вируса, вестерн-блоттинга и реакции торможения гемагглютинации

Лечение

- Специфического лечения вирусной инфекции обезьяньей оспы не существует. Однако вирусы оспы обезьян и оспы генетически схожи, а это означает, что противовирусные препараты и вакцины, предназначенные для защиты от оспы, могут использоваться для профилактики и лечения инфекций, вызванных вирусом оспы обезьян.
- Противовирусные препараты, такие как Тековиримат (ТРОХХ), могут быть рекомендованы людям, которые могут серьезно заболеть из-за ослабленной иммунной системы.