

Занятие 25

Микробиологическая диагностика герпесвирусных инфекций.

План занятия:

1. Семейство *Herpesviridae*, общая характеристика (классификация, морфология, культивирование).
 - Вирусы простого герпеса (ВПГ-I и ВПГ-II), морфо-биологические особенности, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение и профилактика вызываемых ими заболеваний.
 - Вирус ветряной оспы - опоясывающего герпеса (*Varicella-zoster*), морфо-биологические особенности, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение и специфическая профилактика вызываемых заболеваний.
 - Вирус Эпштейн-Барра, морфо-биологические особенности, патогенез и микробиологическая диагностика вызываемых заболеваний.
 - Цитомегаловирус, морфо-биологические особенности, патогенез, микробиологическая диагностика и лечение вызываемых им заболеваний.
 - Другие вирусы герпеса человека (ВГЧ-6, ВГЧ -7, ВГЧ -8), их морфо-биологические особенности, патогенез, микробиологическая диагностика вызываемых им заболеваний.

Герпес-вирусы (*Herpesviridae* от греч. herpes — ползучий) — семейство крупных оболочечных ДНК-содержащих вирусов, вызывающих поражения ЦНС, кожи, слизистых оболочек и внутренних органов. Различают восемь вирусов герпеса, патогенных для человека:

- 1) вирус простого герпеса — ВПГ тип 1 (*Herpes simplex virus* тип 1 — HSV-1), или герпес-вирус человека ГВЧ-1;
- 2) вирус простого герпеса — ВПГ тип 2 (*Herpes simplex virus* тип 2 — HSV-2), или герпес-вирус человека ГВЧ-2;
- 3) вирус ветряной оспы — опоясывающего герпеса (*Varicella-zoster virus* — VZV), или герпес-вирус человека ГВЧ-3;
- 4) вирус Эпштейна–Барр — ВЭБ (*Epstein—Barr virus*, EBV), или герпес-вирус человека ГВЧ-4;
- 5) цитомегаловирус — ЦМВ, или герпес-вирус человека ГВЧ-5;
- 6) герпес-вирус человека тип 6 — ГВЧ-6 (*Human herpesvirus* — HHV6), или герпес вирус человека ГВЧ-6;
- 7) герпес-вирус человека тип 7 — ГВЧ-7 (*Human herpesvirus* — HHV7);
- 8) герпес-вирус человека тип 8 — ГВЧ-8 (*Human herpesvirus* — HHV8).

Семейство *Herpesviridae* включает три подсемейства, отличающихся по структуре генома, тканевому тропизму, цитопатологии и локализации латентной инфекции

1. Подсемейство *Alphaherpesvirinae* включает вирусы герпеса (ВПГ-1, ВПГ-2, VZV), для которых характерен быстрый рост. Они размножаются в эпителиальных клетках, вызывая цитолитическое действие. В нейронах служат причиной латентной, персистирующей инфекции.
2. Подсемейство *Betaherpesvirinae* включает вирусы герпеса (ЦМВ, ГВЧ-6, ГВЧ-7), для которых характерен медленный рост (латентная инфекция) в клетках эпителия

слюнных желез, в glandaх, почках, лимфоцитах. Они оказывают цитомегалическое (ЦМВ) и лимфопролиферативное действие.

3. Подсемейство *Gammaherpesvirinae*. Вирусы (ВЭБ) растут в лимфобластоидных клетках, оказывают лимфопролиферативное действие. Вызывают латентную инфекцию в лимфоидной ткани, лимфоцитах, эпителиальных клетках рта и глотки, слюнных желез. ВЭБ вызывает размножение В-лимфоцитов и персистирует в них.

Структура. Вирион герпес-вируса имеет овальную форму, диаметр 150–200 нм. ДНК вируса окружена икосаэдрическим капсидом, состоящим из 162 капсомеров. Снаружи вирус окружает оболочка с гликопротеиновыми шипами, сформированными из внутреннего слоя ядерной мембраны клетки. Пространство между капсидом и оболочкой называется тегумент. Геном — двунитевая линейная ДНК.

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает герпетическую инфекцию, или простой герпес (*herpes simplex*), характеризующийся везикулезными высыпаниями на коже, слизистых оболочках, поражением ЦНС и внутренних органов, а также пожизненным носительством (персистенцией) и рецидивами болезни.

Различают ВПГ 1-го и 2-го типа, которые распространены повсеместно, поражают большую часть населения Земли и существуют в организме в латентной форме до момента реактивации. ВПГ-1 поражает преимущественно область рта, глаз, ЦНС; ВПГ-2 — гениталии, за что и получил название генитального штамма.

Структура. Геном ВПГ кодирует около 80 белков, необходимых для репродукции вируса и взаимодействия последнего с клетками организма и иммунным ответом. ВПГ кодирует 11 гликопротеинов, являющихся прикрепительными белками (gB, gC, gD, gH и gL), белками слияния (gB), структурными белками, иммунными белками «уклонения» (gC, gE, gI) и др. Например, С3-компонент комплемента связывается с gC, а Fc-фрагмент IgG — с gE/gI-комплексом, маскируя вирус и вирусинфицированные клетки. Существуют гликопротеины, имеющие общие антигенные детерминанты (gB и gD) для ВПГ-1 и ВПГ-2.

Репродукция и культивирование. ВПГ может инфицировать большинство типов клеток человека и клеток других видов. Он вызывает литические инфекции фибробластов, эпителиальных клеток и латентные инфекции нейронов.

Для культивирования вируса применяют куриный эмбрион и культуру клеток, на которой он вызывает ЦПЭ в виде появления гигантских многоядерных клеток с внутриядерными включениями.

Резистентность. Погибает через несколько часов на поверхности предметов обихода, чувствителен к солнечным и УФ-лучам, жирорастворителям, детергентам. Сохраняется в течение месяца при температуре 4°C.

Эпидемиология. У 80–90% взрослых людей обнаруживаются антитела к ВПГ. Источник инфекции — больной или вирусоноситель. ВПГ-1 и ВПГ-2 передаются преимущественно контактным путем (с везикулярной жидкостью, при поцелуях — со слюной, половых контактах — с секретами слизистых оболочек, со спермой), через предметы обихода, реже — воздушно-капельным путем, через плаценту, при рождении ребенка. Возможна реактивация вируса при снижении иммунитета (рецидивирующий герпес). Начальное инфицирование ВПГ-2 происходит в жизни позже, чем инфицирование ВПГ-1, и коррелирует с возрастанием половой активности.

ВПГ-1 чаще поражает слизистые оболочки ротовой полости и глотки, вызывает энцефалиты, а ВПГ-2 — гениталии (генитальный герпес).

Патогенез. Различают первичный и рецидивирующий простой герпес. Чаще вирус вызывает бессимптомную или латентную инфекцию.

Первичная инфекция. Обычно появляются везикулы с дегенерацией эпителиальных клеток. Основу везикулы составляют многоядерные клетки (иногда называемые Тцанк-клетками), выявляемые в препаратах, окрашенных по Гимзе. Пораженные ядра клеток содержат эозинофильные включения (тельца Каудри). Верхушка везикулы через некоторое время вскрывается, и формируется язвочка, которая вскоре покрывается струпом с образованием корочки с последующим заживлением.

Минуя входные ворота эпителия, вирусы проходят через чувствительные нервные окончания с дальнейшим передвижением нуклеокапсидов вдоль аксона к телу нейрона в чувствительных ганглиях. Репликация вируса в нейроне заканчивается его гибелью. Некоторые вирусы герпеса, достигая ганглионарных клеток, способны приводить к развитию латентной инфекции, при которой нейроны не гибнут, но содержат в себе вирусный геном. Большинство людей (70–90%) являются пожизненными носителями вируса, который сохраняется в ганглиях, вызывая в нейронах латентную персистирующую инфекцию.

В латентно инфицированных нейронах около 1% клеток в пораженном ганглии несет вирусный геном. При этом вирусная ДНК существует в виде свободных циркулярных эписом (около 20 копий в клетке). ВПГ-1 обнаруживается в тригеминальных и других ганглиях, а ВПГ-2 — в сакральных ганглиях.

Реактивация герпес-вирусов и обострение (рецидив) вызываются различными факторами (переохлаждение, лихорадка, травма, стресс, сопутствующие заболевания, действие УФ и др.), снижающими иммунитет.

Клиника. Инкубационный период длится 2–12 дней. Болезнь начинается с возникновения на пораженных участках зуда, появления отека и пузырьков, заполненных жидкостью. В месте образования везикулы пациенты ощущают сильную, жгучую боль. После подсыхания пузырьков и отторжения корочек рубцы не образуются. ВПГ поражает кожу (везикулы, экзема), слизистые оболочки рта, глотки (стоматит) и кишечника, печень (гепатиты), глаза (кератит и др.) и ЦНС (энцефалит, менингоэнцефалит). Рецидивирующий герпес обусловлен реактивацией вируса, сохранившегося в ганглиях. Он характеризуется повторными высыпаниями и поражением органов и тканей.

Генитальная инфекция является результатом аутоинокуляции из других пораженных участков тела; но наиболее часто встречающийся путь заражения — половой, включая уrogenитальные контакты. Поражение проявляется в образовании везикулы, которая довольно быстро изъязвляется. Чаще поражаются у мужчин головка и тело полового члена, а у женщин — половые губы и вагина, возможно также распространение процесса и на шейку матки.

Вирус простого герпеса, в основном ВПГ-2, проникает во время прохождения новорожденного через родовые пути матери, вызывая неонатальный герпес (герпес новорожденных). Неонатальный герпес обнаруживается на 6-й день после родов, т.е. с момента заражения. Вирус диссеминирует во внутренние органы с развитием генерализованного сепсиса. Основная мера предупреждения заболевания неонатальным герпесом — выявление генитального герпеса у матери и его лечение; кесарево сечение также снижает риск заражения ребенка.

Иммунитет. Основным иммунитетом при простом герпесе — клеточный. NK-клетки играют важную роль в ранней противомикробной защите. Гликопротеины вызывают

образование вируснейтрализующих антител, которые подавляют межклеточное распространение вирусов, но не препятствуют персистенции вирусов в клетках и возникновению рецидивов.

Микробиологическая диагностика. Для диагностики используют содержимое герпетических везикул, слюну, соскобы с роговой оболочки глаз, кровь, цереброспинальную жидкость и мозг при летальном исходе. В окрашенных мазках наблюдают гигантские многоядерные клетки (синцитий), клетки с увеличенной цитоплазмой и внутриядерными включениями Каудри. Для выделения вируса исследуемым материалом заражают клетки HeLa, Her-2, человеческие эмбриональные фибробласты. ЦПЭ проявляется округлением клеток с последующим прогрессирующим поражением всей культуры клеток. Заражают также куриные эмбрионы или мышей-сосунков, у которых после внутримозгового заражения развивается энцефалит. Выделенный вирус идентифицируют в РИФ и ИФА с использованием моноклональных антител.

Серодиагностику проводят с помощью РСК, РИФ, ИФА и РН по нарастанию титра антител больного. ИБ также способен выявлять типоспецифические антитела.

При экспресс-диагностике в мазках-отпечатках из высыпаний, окрашенных по Романовскому–Гимзе, выявляются гигантские многоядерные клетки с внутриядерными включениями. Для идентификации вируса используют ПЦР.

Лечение. Для лечения применяют препараты интерферона, индукторы интерферона и противовирусные химиотерапевтические препараты (ацикловир, фамцикловир, валацикловир, идоксуридин, видарабин, теброфеновую и флореналевую мазь и др.).

Профилактика. Специфическая профилактика рецидивирующего герпеса осуществляется в период ремиссии многократным введением инаktivированной культуральной герпетической вакцины из штаммов ВПГ-1 и ВПГ-2.

Вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса вызывает две болезни (ветряную оспу и опоясывающий лишай). Ветряная оспа (varicella) встречается главным образом у детей, протекает с лихорадкой, интоксикацией, сыпью в виде везикул с прозрачным содержимым. Опоясывающий герпес (herpes zoster), или опоясывающий лишай, — эндогенная инфекция взрослых, перенесших в детстве ветряную оспу. Болезнь проявляется в виде везикулезной сыпи по ходу нервов.

Культивирование. VZV размножается в ЦПЭ, образует гигантские многоядерные клетки-симпласты.

Резистентность. Вирус неустойчив в окружающей среде, чувствителен к жирорастворителям и дезинфицирующим средствам.

Эпидемиология. Ветряная оспа — антропоноз. Чаще болеют дети в возрасте от 2 мес. до 10 лет. Источник инфекции — больной ветряной оспой или вирусоноситель. Период заразительности длится с конца инкубационного периода и в течение 5 дней с момента появления сыпи; больной опоясывающим герпесом иногда бывает заразен. Вирус передается воздушно-капельным путем, через контакт с везикулами кожи; возможна трансплантационная передача. Он длительно персистирует в клетках человека, обуславливая латентную инфекцию.

Опоясывающим герпесом болеют в основном взрослые; болезнь развивается в результате реактивации вируса, персистирующего в организме, т.е. вируса, сохранившегося после перенесенной в детстве ветряной оспы.

Патогенез. Возбудитель проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей и током крови заносится в различные органы и ткани, но главным образом в эпителий кожи (дерматотропное действие) и слизистых оболочек. После первичной

инфекции вирус становится латентным в заднем корешке или ганглии черепно-мозгового нерва.

Клиника. Инкубационный период при ветряной оспе составляет 11–23 дня. Болезнь характеризуется лихорадкой, появлением папулезно-везикулярной сыпи на коже туловища, шеи, лица и конечностей, иногда половых органов и полости рта. Сыпь похожа на высыпания при натуральной оспе (отсюда произошло название болезни). Образовавшиеся круглые пузырьки через 1–3 дня лопаются и подсыхают. После отпадения корок рубцы не остаются (в отличие от натуральной оспы). У детей в возрасте от 2 мес. до 1 года и у взрослых ветряная оспа протекает тяжело, с развитием иммунодефицита; возможны пневмонии, гепатиты, энцефалиты, отиты, пиодермии и другие осложнения. Летальность при ветряной оспе составляет 0,01–0,05%.

Опоясывающий герпес может развиваться в результате реактивации вируса, длительно сохраняющегося в нервных клетках спинного мозга. Этому способствуют различные заболевания, переохлаждение и травмы, снижающие иммунитет. Сопровождается болевым синдромом, появляется сыпь в виде обруча вокруг туловища по ходу пораженных (чаще межреберных) нервов; возможны высыпания по ходу тройничного нерва, на ушной раковине, а также гангренозная (некротическая) форма поражения.

Иммунитет. Заболевание оставляет пожизненный клеточно-гуморальный иммунитет. Однако это не мешает длительному сохранению вируса в организме и возникновению рецидивов.

Микробиологическая диагностика. Для исследования отбирают содержимое высыпаний, отделяемое носоглотки и кровь. Вирус можно выявить в мазках-отпечатках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, по образованию синцития и внутриядерных включений (тельца Липшютца). Культивирование в человеческих диплоидных фибробластах возможно после длительного инкубационного периода. Идентифицируется вирус в РИФ, РСК, ИФА и РН. При серодиагностике применяют ИФА, РСК и РН.

Лечение. Для лечения можно применять ацикловир, видарабин, а также интерфероны, интерфероногены и другие иммуномодуляторы. Элементы сыпи смазывают 1–2% водным раствором перманганата калия или 1–2% раствором бриллиантового зеленого.

Специфическая профилактика. Разработана живая ослабленная вакцина для VZV. В очагах ветряной оспы ослабленным детям можно вводить препараты иммуноглобулина.

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) вызывает лимфопролиферативные болезни, а также инфекционный мононуклеоз, характеризующийся интоксикацией, поражением небных и глоточных миндалин, увеличением лимфатических узлов, печени, селезенки, изменениями в крови.

Структура. ВЭБ имеет вирусный капсидный антиген (VCA); ядерные антигены — nuclear antigens (EBNAs) 1, 2, 3A, 3B, 3C; латентные мембранные протеины (LMPs) 1, 2 и две маленькие Эпштейна–Барр-кодируемые РНК (EBER) молекулы — EBER1 и EBER2. EBNAs и LPs являются ДНК-связывающими белками, считающимися основными для развития инфекции (EBNA-1), immortalization (EBNA-2) и других целей. LMPs — мембранные белки с онкогеноподобным действием.

Эпидемиология. Источником инфекции являются больной человек или вирусоноситель. Вирус передается воздушно-капельным путем, при контакте через слюну. Антитела к вирусу имеются у большинства населения.

Патогенез и клиника. ВЭБ взаимодействует с молекулой CD21 В-лимфоцита и, проникнув в клетку, вызывает размножение В-лимфоцитов, персистирует в них; обуславливает латентную инфекцию в лимфоидной ткани, эпителиальных клетках рта и глотки, слюнных желез. ВЭБ вызывает бессимптомную, хроническую или острую инфекцию, а также лимфопролиферативные болезни. При реконвалесценции он несколько месяцев выделяется со слизистых оболочек рта и носоглотки.

1. Инфекционный мононуклеоз характеризуется высокой лихорадкой, недомоганием, фарингитом, лимфаденопатией, спленомегалией.

2. Хроническая инфекция может развиваться как циклическая рекуррентная болезнь. Сопровождается низкой лихорадкой, повышенной утомляемостью, головной болью и воспалением горла.

3. Лимфопролиферативные болезни также могут индуцироваться ВЭБ. Вирус является митогеном для В-лимфоцитов. Способствует развитию опухолей. Люди с дефектом Т-клеточного иммунитета могут страдать поликлональной лейкемиеподобной В-клеточной пролиферативной болезнью и лимфомой. Реципиенты трансплантата после иммуносупрессивной терапии являются группой риска для посттрансплантационной лимфопролиферативной болезни вместо развития инфекционного мононуклеоза после контакта с вирусом или реактивации латентного вируса. Подобные болезни развиваются у больных ВИЧ-инфекцией.

Африканская лимфома Беркитта (эндемическая лимфома) ассоциирована с малярией в Африке. Большой процент с лимфомой Ходжкина также содержит последовательности ДНК ВЭБ. Опухолевые клетки носоглоточной карциномы, эндемичной на Востоке, также содержат последовательности ДНК ВЭБ.

4. Волосистая оральная лейкоплакия — характерное для СПИДа поражение слизистой оболочки рта.

Иммунитет клеточный и гуморальный, обусловленный действием антител на вирионы.

Микробиологическая диагностика. Инфекционный мононуклеоз документируется обнаружением атипичных лимфоцитов, лимфоцитозом (моноциты составляют 60–70% белых кровяных клеток с 30% атипичных лимфоцитов). Применяют также вспомогательные реакции (агглютинация эритроцитов барана сывороткой крови больного и др.).

Недавняя ВЭБ-инфекция определяется по различным показателям: появление IgM-антител к вирусному капсидному антигену (VCA); повышение титра EBNA и др. Затем при развитии клинических признаков появляются IgG-антитела к VCA.

Вирус цитомегалии, или цитомегаловирус — ЦМВ (от греч. cytos — клетка, megas — большой), вызывает инфекцию человека, характеризующуюся поражением многих органов и тканей и протекающую разнообразно — от пожизненной латентной инфекции до тяжелой острой генерализованной формы с летальным исходом.

Структура и культивирование. ЦМВ имеет самый большой ДНК-геном среди герпес-вирусов. Реплицируется только в клетках человека (фибробластах, эпителиоцитах и макрофагах). Вызывает латентную инфекцию в мононуклеарных лимфоцитах, клетках стромы костного мозга и других клетках. Культивируется в культуре фибробластов и в диплоидных клетках легких эмбриона человека с образованием гигантских (цитомегалических) клеток с внутриядерными включениями.

Резистентность. Вирус неустойчив, термолабилен, чувствителен к дезинфектантам и жирорастворителям.

Эпидемиология. Более 60% населения имеют антитела против цитомегаловируса. Острая инфекция проявляется у 95% лиц со СПИДом. Механизмы передачи вируса — контактно-бытовой, респираторный, иногда фекально-оральный. Источник инфекции — человек, больной острой или латентной формой. Заражение происходит через кровь, слюну, мочу, сперму, грудное молоко и др. Входными воротами инфекции служат кожа, слизистые оболочки, дыхательные пути и плацента (врожденная цитомегалия). Инфицирование может быть при половых контактах, переливании крови и трансплантации органов.

Патогенез и клиника. Болезнь развивается в результате первичного инфицирования цитомегаловирусом, но чаще формируется латентная инфекция, сохраняющаяся на протяжении всей жизни. Вирус обладает выраженным тропизмом к эпителию слюнных желез и канальцев почек, где происходит его репродукция. Реактивация вируса нередко происходит у беременных, у лиц после переливания крови, трансплантации органов и при других состояниях, сопровождающихся снижением иммунитета. ЦМВ вызывает разнообразные патологические проявления: латентную инфекцию в почках и слюнных железах, иммунодефицит, нарушение зрения, слуха и умственной деятельности, пневмонию. Цитомегаловирусная инфекция может осложнять течение ряда сопутствующих заболеваний, в том числе способствовать развитию синдрома Гийена–Барре в виде парезов и параличей конечностей в результате демиелинизирующего поражения нервных корешков.

Наибольшую опасность представляет врожденная ЦМВ-инфекция. Около 1% новорожденных инфицируются через плаценту. У них развиваются гепатоспленомегалия, желтуха, поражения органов зрения, кахексия, микроцефалия и другие пороки, приводящие к смерти.

Иммунитет. Формируется гуморальный и клеточный иммунитет.

Микробиологическая диагностика. Исследуют кровь, грудное молоко, мочу, слюну, отделяемое цервикального канала и спинномозговую жидкость. Инфицированные клетки в организме человека характеризуются увеличенными размерами (25–40 мкм) и внутриядерными включениями в виде «глаза совы» (окраска гематоксилином и эозином). Вирус выделяют в культуре клеток. Идентификацию проводят с помощью ПЦР, а также в РИФ и ИФА с использованием моноклональных антител. Антитела (IgM, IgG) к вирусу в сыворотке крови больных определяют посредством ИФА, РСК, РН и др.

Лечение. Для лечения применяют аналоги нуклеозидов (ацикловир, ганцикловир, фоскарнет и др.), иммуномодуляторы (интерферон, левамизол и др.) и индукторы интерферона (полудан и др.), а также нормальный иммуноглобулин человека.

Профилактика. Необходимо оберегать лиц с ослабленным иммунитетом от контактов с инфицированными лицами, детьми с врожденной цитомегалией, которые могут до 5 лет выделять вирус в окружающую среду.

ГВЧ-6 (Herpes lymphotropic virus) был выделен из лимфоцитов крови больных лимфопролиферативными заболеваниями и СПИДом. Это распространенный лимфотропный вирус. Предполагают, что ГВЧ-6 может постоянно инфицировать слюнные железы и выделяться из них. Очевидно, вирус становится латентным после первичного инфицирования и может реактивироваться после иммуносупрессии. Известны две разновидности — ГВЧ-6А и ГВЧ-6В.

ГВЧ-6 вызывает: 1) внезапную экзантему — exanthema subitum у младенцев в возрасте от 6 мес. до 3 лет жизни или roseola infantum с внезапным подъемом температуры (40°C) и таким же спадом через три дня на фоне сыпи; 2) синдром

хронической усталости с субфебрильной температурой, потливостью, артралгией и слабостью. Возможна лимфаденопатия.

ГВЧ-7 был выделен из Т-лимфоцитов здоровых людей, а затем его выделяли от больных СПИДом, синдромом хронической усталости.

ГВЧ-8 герпес-вирус, ассоциированный с саркомой Капоши. Обладает нейроинвазивными свойствами, определяясь в дорсальных спинальных ганглиях у больных саркомой Капоши и в цереброспинальной жидкости у ВИЧ-инфицированных лиц.

Микробиологическая диагностика. ГВЧ-6 или ГВЧ-7 выделяют при совместном культивировании лимфоцитов периферийной крови с митогенактивированными лимфоцитами. В культуре образуются большие многоядерные клетки. Вирионы можно выделить из слюны. Обнаружение с помощью ИФА в сыворотке крови IgM-антител является признаком острой инфекции. Определяют маркерные гены возбудителей в ПЦР.

Лечение. Для лечения применяют аналоги нуклеозидов (ганцикловир, фоскарнет и др.), иммуномодуляторы (интерфероны).