

Занятие 25.

Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых
вирусами семейства Herpesviridae

prof. Akif Qurbanov

Обсуждаемые вопросы:

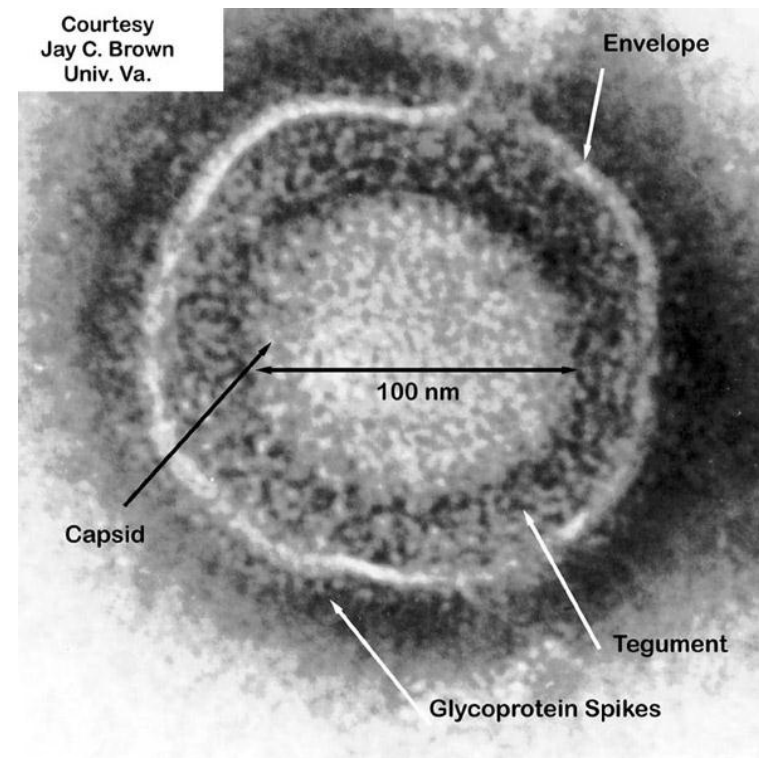
- 1. Семейство *Herpesviridae*, общая характеристика (классификация, морфология, культивирование).
- Морфобиологические особенности вирусов простого герпеса (ВПГ-I и ВПГ-II), эпидемиология, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение и профилактика вызываемых ими заболеваний.
- Вирус ветряной оспы - опоясывающего лишая (*Varicella-zoster*), морфобиологические особенности, эпидемиология, патогенез, микробиологическая диагностика, лечение и специфическая профилактика вызываемых им заболеваний.
- Вирус Эпштейна-Барр, морфобиологические особенности, эпидемиология, патогенез и микробиологическая диагностика инфекционного мононуклеоза
- Цитомегаловирус, морфобиологические особенности, эпидемиология, патогенез, микробиологическая диагностика и лечение вызываемых им заболеваний.
- Другие вирусы герпеса человека (ВГЧ-6, ВГЧ -7, ВГЧ -8)

Цель занятия:

- дать информацию студентам о морфобиологических особенностях вирусов, относящихся к семейству *Herpesviridae*

Семейство *Herpesviridae* (герпесвирусы)

- Первый представитель этого семейства – вирус простого герпеса вызывает везикулезные высыпания на коже и слизистых оболочках с последующим их переходом в эрозии.
- Название семейства отражает производимый вирусами патологический эффект (от греч. «герпес» - «ползучий»)

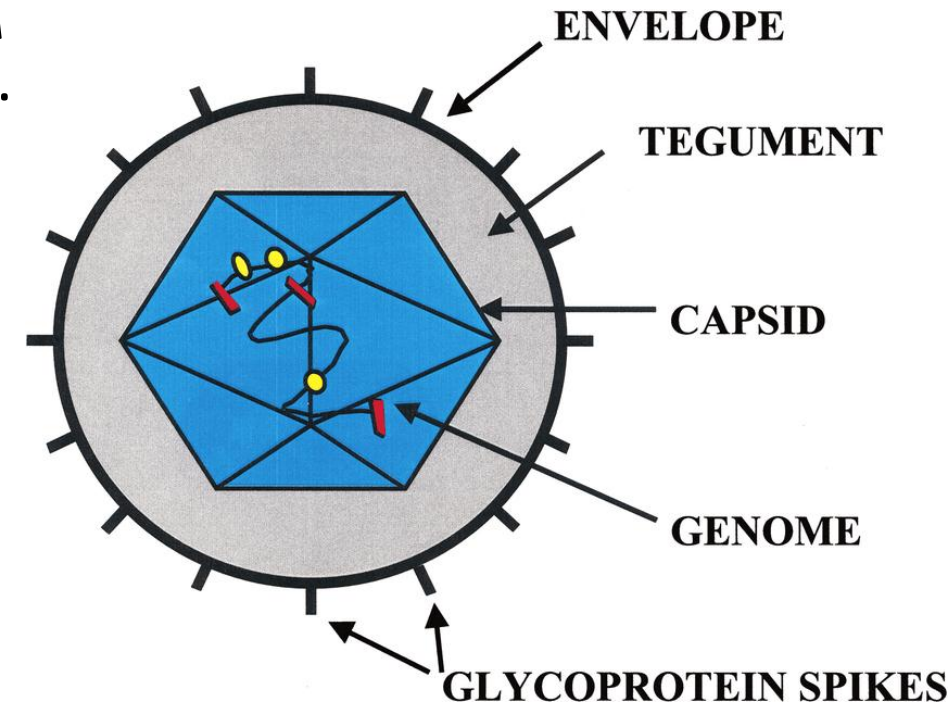


Классификация герпес-вирусов

- Различают 8 типов вирусов герпеса , патогенных для человека :
- 1- вирус простого герпеса – ВПГ тип 1 (Herpes simplex virus 1 - HSV-1);
- 2- вирус простого герпеса – ВПГ тип 2 (Herpes simplex virus 2 - HSV-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 6 - HHV-6)
- 7-Герпес-вирус человека тип 7 – ГВЧ-7 (Human herpesvirus 7 - HHV-7)
- 8-Герпес-вирус человека тип 8 – ГВЧ-8 (Human herpesvirus 8 - HHV-8)

Структура герпес-вирусов

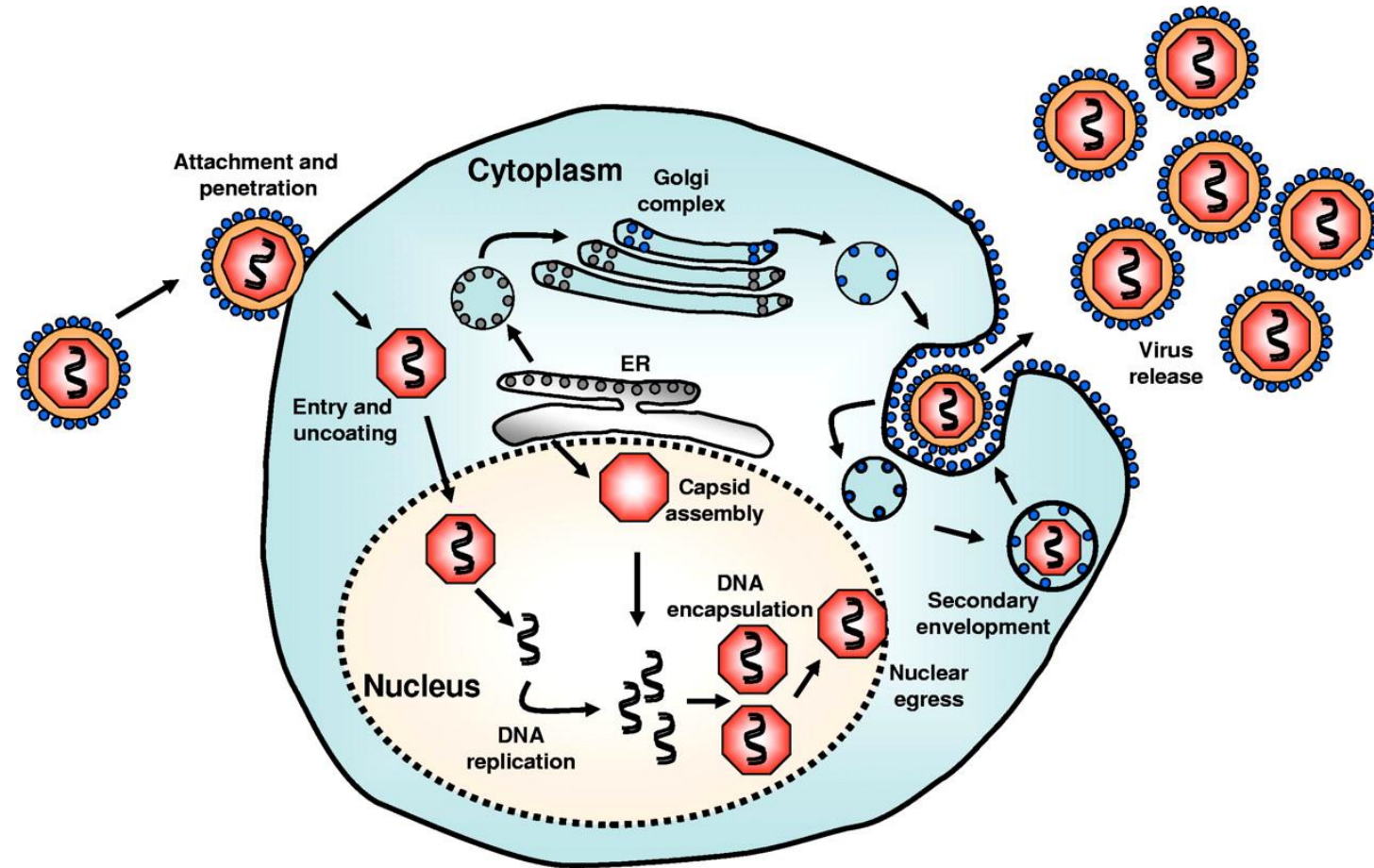
- Герпес-вирусы относятся к крупным оболочечным ДНК-содержащим вирусам , диаметр 150-200 нм .
- Вирион имеет овальную форму. В центральной части вириона находится ДНК , окруженная **икосаэдрическим капсидом** , состоящим из 162 капсомеров.
- Снаружи вирус окружает оболочка с гликопротеиновыми шипами . Пространство между капсидом и оболочкой называется **тегумент** , где содержатся вирусные белки и ферменты , необходимые для инициации репликации вируса .
- **Геном** – **двунитевая линейная ДНК** .



Репликация герпесвирусов

- Поверхностные гликопротеины вириона связываются с рецепторами клетки хозяина .
- Транскрипция вирусного генома (ДНК) происходит в ядре , образовавшиеся иРНК проникают в цитоплазму, где синтезируются не только белки с регулирующей активностью, но и структурные белки , включая капсидные и гликопротеины.
- Формирующийся капсид заполняется вирусной ДНК , синтезированные гликопротеины и нуклеокапсид диффузно прилегают к ядерной оболочке , где формируется суперкапсид.
- Вирионы почкуются через модифицированные мембраны ядерной оболочки и затем, перемещаясь через аппарат Гольджи, выходят из клетки путем экзоцитоза или лизиса клетки.
- Большинство зрелых вирионов покидают клетку, некоторые же сохраняясь внутри клеток, вызывают характерный для некоторых герпесвирусов цитопатический эффект, то есть образование многоядерных клеток – **симпластов**

Схема репродукции герпесвирусов

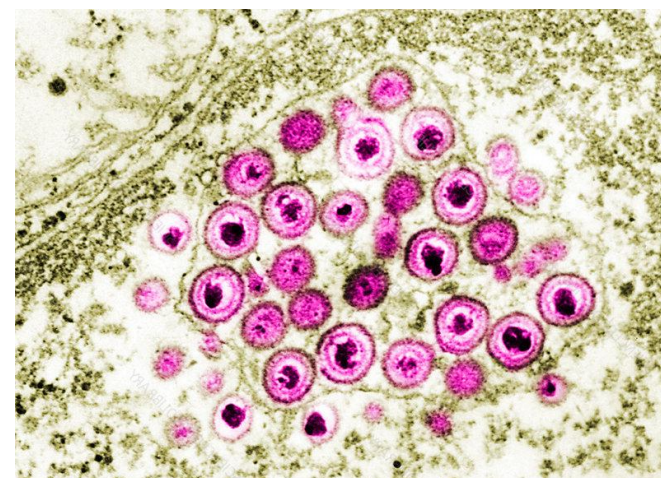
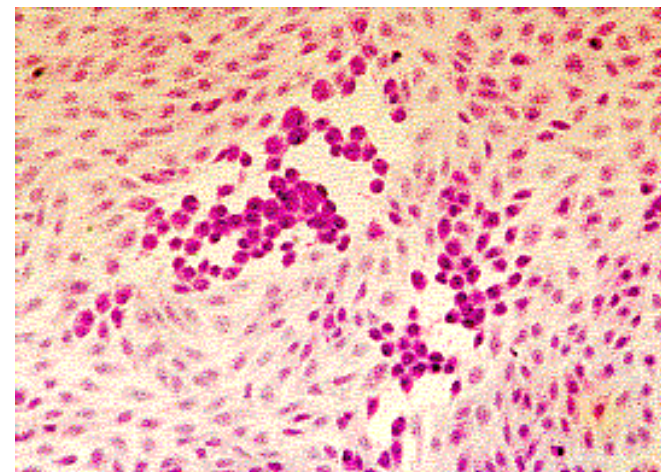


Вирус простого герпеса

- Вирус простого герпеса (*Herpes simplex virus*) относится к семейству *Herpesviridae* роду *Simplexvirus* . Различают два типа вируса простого герпеса:
- 1-ый тип вируса простого герпеса (ВПГ-1) – чаще поражает слизистые оболочки ротовой полости , глаз , ЦНС ;
- 2-ой тип вируса простого герпеса (ВПГ-2) - поражает половые органы.

Культивация вируса простого герпеса

- Для культивирования ВПГ применяют куриный эмбрион (на хорион-аллантоисной оболочке образуются мелкие плотные бляшки) .
- В культуре клеток (HeLa, Нер-2, человеческие эмбриональные фибробласты) вызывают цитопатический эффект в виде появления гигантских многоядерных клеток с внутриядерными включениями – **включения Каудри** .

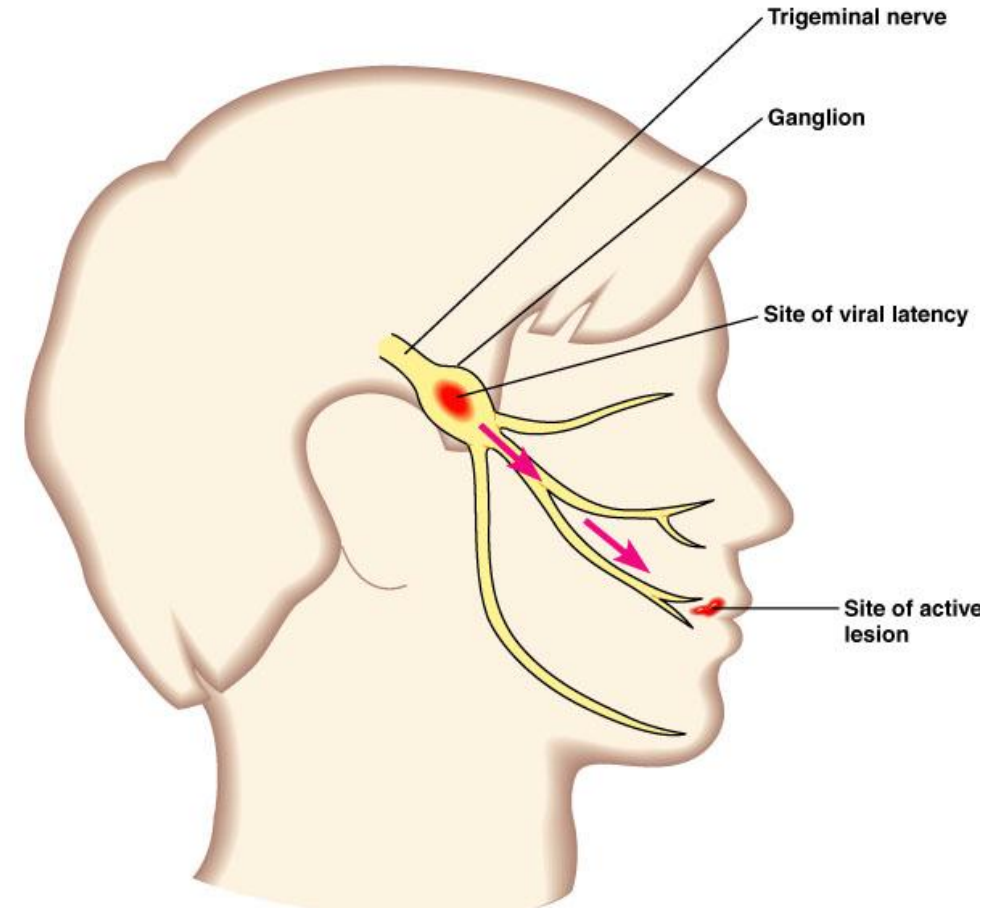


Патогенез

- ВПГ-1 передается преимущественно контактным путем , реже – воздушно-капельным. ВПГ-2 передается контактным путем , при половых контактах . Заражение ВПГ-2 возможно при прохождении плода через родовые пути, реже – трансплацентарно.
- Вирусы проникают через слизистые оболочки и поврежденную кожу . ВПГ-1 реплицируется на слизистых оболочках ротовой полости и глотки , ВПГ-2 - на коже и слизистой оболочке половых путей.
- **Первичная инфекция** протекает умеренно, в основном бессимптомно. Затем вирусы мигрируют в нейроны в результате ретроградного аксонного транспорта и вызывают латентную инфекцию (ВПГ-1 в тройничном ганглии , ВПГ-2 в поясничных и крестцовых ганглиях). 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).
- Большинство людей (около 80%) являются пожизненными носителями вируса, который сохраняется в ганглиях , вызывая в нейронах латентную персистирующую инфекцию.

Патогенез

- Вирусы в латентно инфицированных ганглиях сохраняются на протяжении всей жизни. Реактивация герпес-вирусов вызывается различными факторами (переохлаждение, лихорадка, травма, стресс, сопутствующие заболевания, действие УФ и др.) снижающими иммунитет.
- ДНК герпес-вирусов проходит по аксону обратно к нервному окончанию, где и может происходить развитие инфекции с репродукцией вируса в эпителиальных клетках.



Клинические проявления заболеваний, вызываемых вирусами простого герпеса

- Заболевания, вызываемые вирусами, разнообразны. Различают первичный и рецидивирующий простой герпес.
- **Орофарингеальные герпесвирусные инфекции вызывают ВПГ-1.** Первичная инфекция часто протекает бессимптомно, но у детей в возрасте 1-5 лет проявляется везикулярными и язвенными поражениями слизистой оболочки полости рта и десен (гингивостоматит).
- **Рецидив** заболевания проявляется в виде везикул, в основном в области губ - поэтому его называют губным герпесом (*herpes labialis*)



Клинические проявления инфекций, вызванных ВПГ

- **Генитальный герпес** в основном вызывается ВПГ-2. Поражение проявляется образованием везикул, которые в последствии изъязвляются.
- **Неонатальный герпес**, или герпес новорожденных вызывается в основном ВПГ-2. Заражение может происходить трансплацентарно, при родах, и после родов. Нелеченный неонатальный герпес приводит к летальному исходу примерно в 50% случаев.
- У **иммунодефицитных лиц** риск развития ВПГ-инфекций наиболее вероятен.



Микробиологическая диагностика

- Для диагностики используют содержимое герпетических везикул , слюну , соскобы с роговой оболочки глаз , кровь , цереброспинальную жидкость.
- При экспресс диагностике в мазках-отпечатках из высыпаний, окрашенных по Гимзе, выявляются многоядерные клетки с внутриядерными включениями (Тцанк-клетки)
- Для идентификации вируса используют амплификацию генов вирусной ДНК в реакции ПЦР.
- Для выделения вируса исследуемым материалом заражают культуры клеток HeLa, Нер-2, человеческих эмбриональных фибробластов. Вирусы идентифицируют в РИФ и ИФА с использованием моноклональных антител .
- Серодиагностику проводят с помощью ИФА по нарастанию титра специфических антител. В основном специфические антитела определяют на 4-7 день , на 2-4 неделе отмечается значительное повышение титра антител. IgG в крови сохраняются в течение всей жизни.

Лечение и профилактика

- Для лечения герпесвирусных инфекций применяют химиотерапевтические противовирусные препараты (ацикловир, валацикловир, видарабин и др.), ингибирующие синтез вирусной ДНК. Стандартным терапевтическим препаратом является **ацикловир (зовиракс)**.
- Эффективна генно-инженерная вакцина, содержащая гликопротеиновые антигены внешней оболочки вирусов. Вакцина помогает предотвратить первичное заражение.

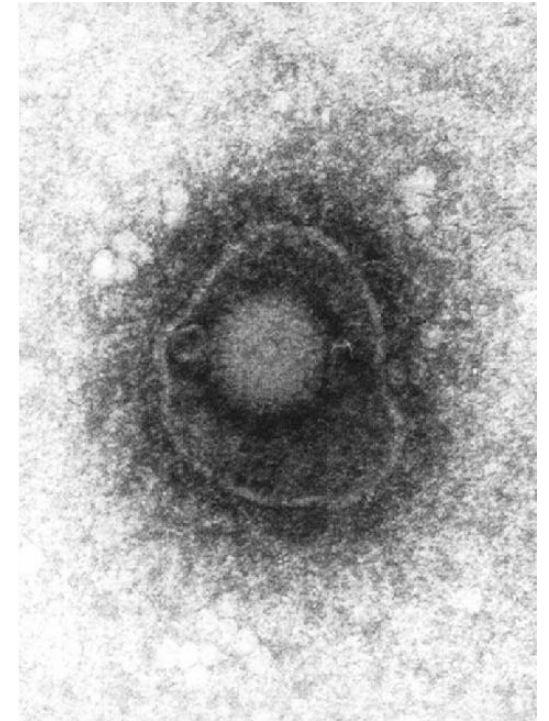


Вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (VZV)

- Вирус герпеса человека типа 3 или Varicella-zoster virus (VZV) относится к семейству *Herpesviridae* роду *Varicellovirus* .
- VZV вызывает две болезни . Первичное заражение приводит к развитию **ветряной оспы (*varicella*)** . После первичной инфекции вирусы пожизненно персистируют в ганглиях черепно-мозговых нервов. Последующая активация вирусов ведет **к** развитию **опоясывающего герпеса (*herpes zoster*)**. Поэтому возбудитель получил название вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (*varicella-zoster virus*) .

Вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (VZV)

- Строение VZV сходно со строением других герпесвирусов .
- Вирус размножается в человеческих эмбриональных фибробластах с образованием внутриядерных включений.
- Вирус неустойчив в окружающей среде, при температуре 60⁰С гибнет в течение 30 мин. , чувствителен к жирорастворителям и дезинфицирующим средствам .



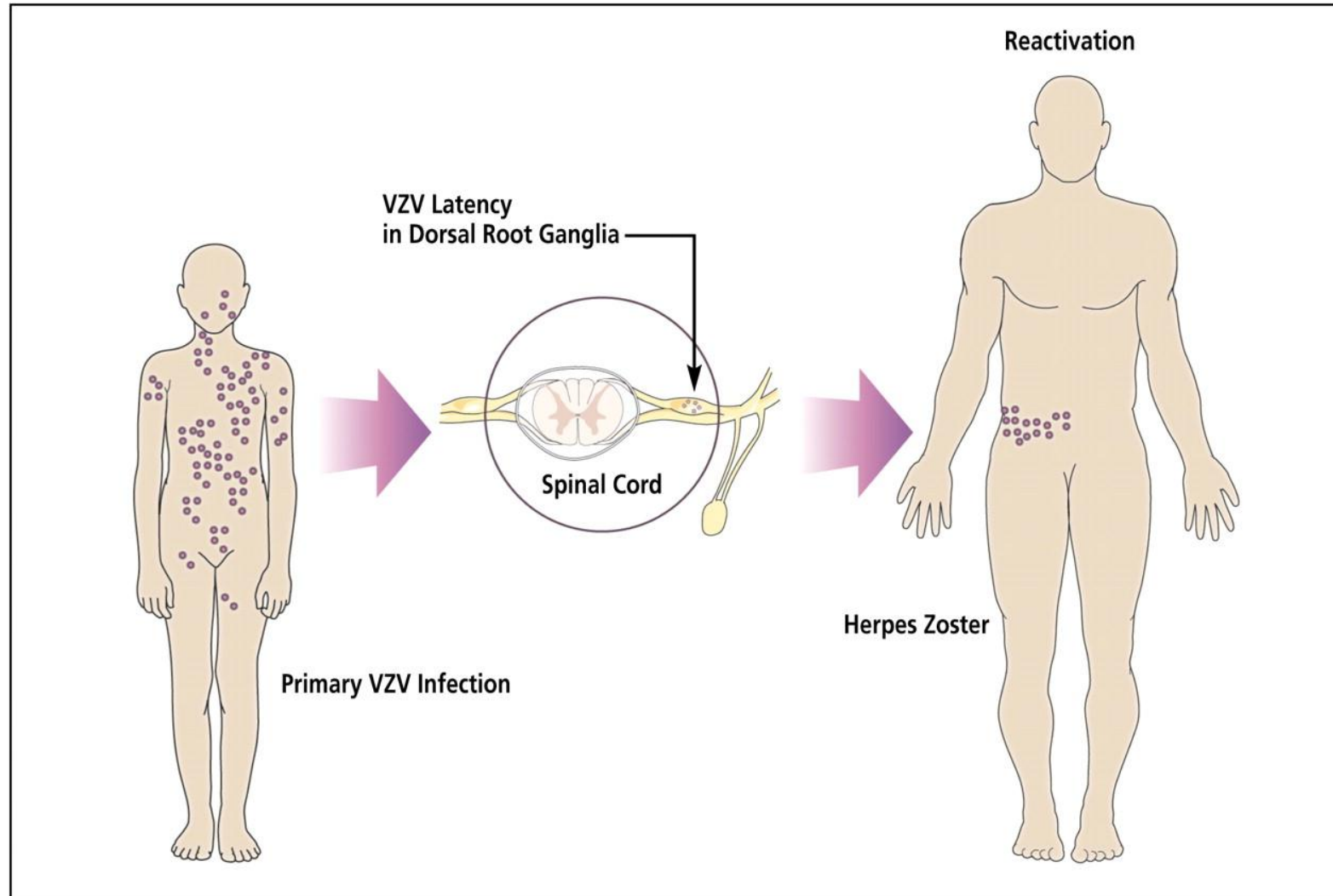
Вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса

- **Ветряная оспа** – антропонозное заболевание, которым чаще болеют дети в возрасте до 10 лет. Источник инфекции – больной ветряной оспой или вирусоноситель; больной опоясывающим герпесом иногда бывает заразен. Вирус передается воздушно-капельным и контактным (через отделяемое везикул) путем. Возможна трансплантационная передача.
- После перенесенного заболевания (ветряной оспы) вирус длительно персистирует в ганглиях черепно-мозговых нервов, обуславливая латентную инфекцию. **Опоясывающим герпесом** болеют в основном взрослые, болезнь развивается в результате реактивации вируса, персистирующего в организме, т.е. вируса, сохранившегося в после перенесенной в детстве ветряной оспы.

Патогенез

- Возбудитель проникает через слизистые оболочки верхних дыхательных путей, возможно – через конъюнктиву.
- После первичной репродукции в регионарных лимфоузлах возбудитель попадает в кровь и разносится по организму, вызывая **первичную вирусемию**.
- После репликации в печени и селезенке вирусы заносятся в различные органы и ткани, но главным образом в эпителий кожи (дерматотропное действие) и слизистых оболочек, вызывая **вторичную вирусемию**. Эпителиальные клетки подвергаются дистрофии, накоплению межтканевой жидкости с образованием пузырьков – **везикул**.
- После первичной инфекции вирус длительно персистирует в заднем корешке спинномозговых нервов или ганглии тройничного нерва. Активированный вирус, находящийся в нервных клетках спинного мозга, по нервным стволам достигает кожи, вызывая **опоясывающий герпес**.

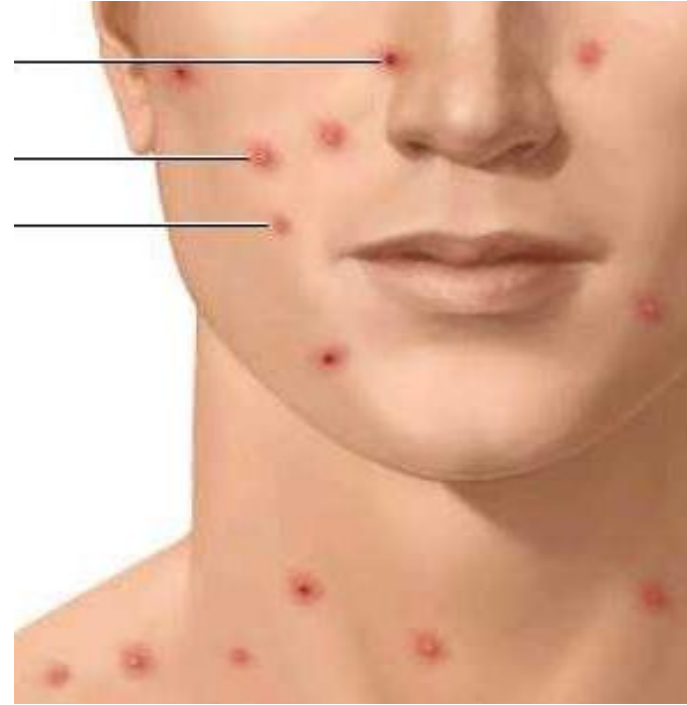
Патогенез



Клинические проявления ветряной оспы

- Инкубационный период при ветряной оспе (*varisella*) составляет 10-21 дня . Болезнь характеризуется лихорадкой , появлением **макулопапуловезикулярной сыпи** на коже туловища, шеи , лица и конечностей. Вначале сыпь появляется в виде макулы, папулы, а затем – в виде везикул с прозрачным содержимым.
- Заболевание у грудных детей, пожилых и лиц с иммунодефицитами протекает тяжело, осложняется пневмонией , гепатитом, энцефалитом, отитом, пиодермией .

Клинические проявления ветряной оспы



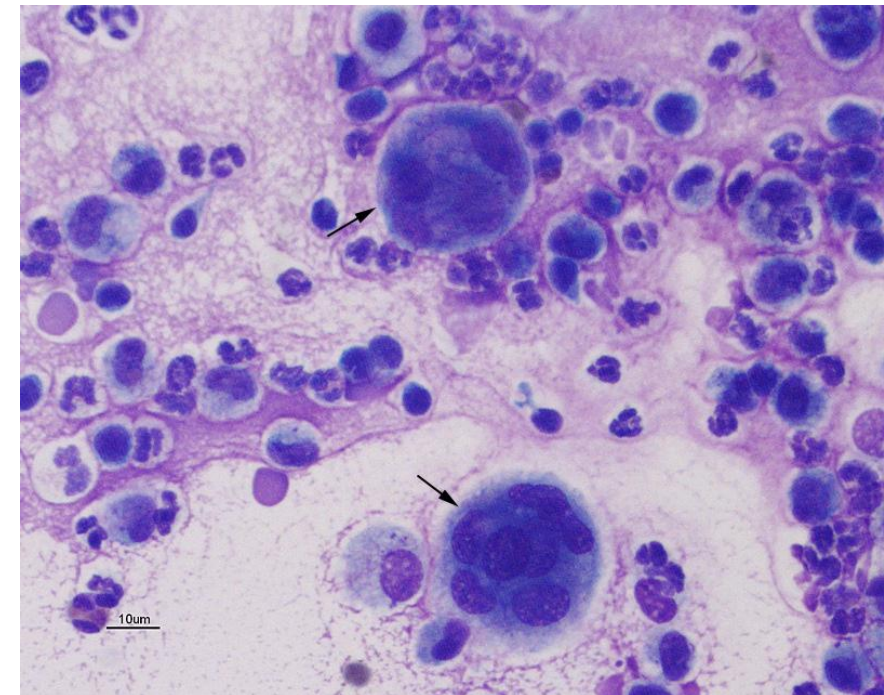
Клинические проявления опоясывающего герпеса

- Опоясывающий герпес (*zoster*) - эндогенная инфекция развивающаяся у лиц, перенесших в детстве ветряную оспу
- Инфекция развивается в результате активации вирусов, персистирующих в ганглиях задних корешков спинномозговых нервов и в ганглиях тройничного нерва. Активации вируса способствуют различные факторы, ослабляющие иммунную систему - болезни, простуды, травмы и т. д. Вирус проникает в кожу по поврежденным нервам (часто межреберным нервам), вызывая высыпания, покрывающие поверхность туловища в виде обруча (отсюда и название болезни).
- Заболевание сопровождается сильными болями. Наиболее частое осложнение опоясывающего герпеса - **постгерпетическая невралгия** может длиться в течение многих месяцев.



Микробиологическая диагностика

- Диагноз выставляется на основании клинических данных .
- Для подтверждения диагноза отбирают содержимое высыпаний , отделяемое носоглотки и кровь. Вирус можно выявить в мазках-отпечатках , окрашенных по Романовскому-Гимзе, по образованию **внутриядерных включений**.
- Вирус плохо реплицируется в культурах клеток , поэтому является маловажным.
- При серодиагностике специфические антитела выявляют РИФ и ИФА .
- **ВПГ-инфекции способствуют синтезу перекрестного иммунитета против VZV**



Лечение

- У детей с нормальным иммунитетом необходимости в противовирусной терапии при ветряной оспе нет.
- Лечение новорожденных и иммунокомпрометированных лиц является необходимым . Эффективным при лечении считается **гамма-глобулин , в составе которого имеются** высокие титры антител против VZV.
- Для лечения применяют ацикловир, видарабин , препараты интерферона и др. иммуномодуляторы.

Вирус Эпштейна-Барр

- Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ , вирус герпеса человека типа 4) относится к семейству *Herpesviridae* роду *Lymphocryptovirus* .
- Вирус был выделен в 1964 году М.Эпштейном и И.Барр при электронной микроскопии биоптата лимфомы Беркитта .

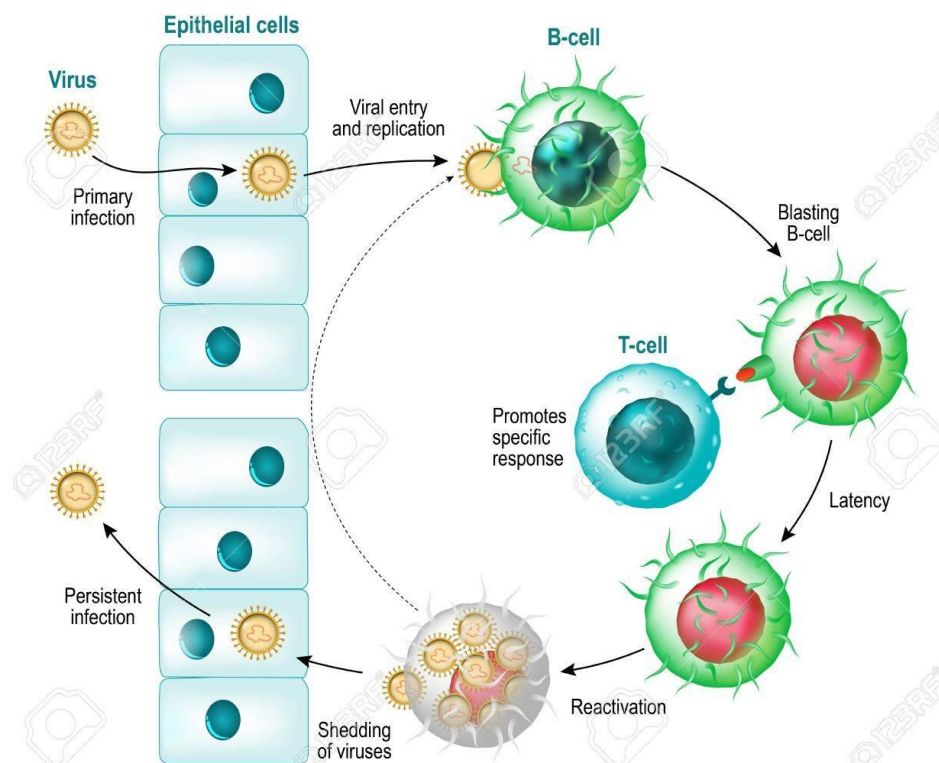
Вирус Эпштейна-Барр

- **Структура и антигены.** ВЭБ структурно и морфологически похож на другие герпесвирусы. По латентным ядерным антигенам (EBNA и EBER) делятся на два типа - ВЭБ-1 и ВЭБ-2 .
- **У ВЭБ-1** имеется EBNA антиген, который делится на шесть типов (EBNA 1, 2, 3А, 3В, 3С, LP) .
- **У EBV-2** имеется EBER антиген .Это маленькие Эпштейн-Барр-кодированные РНК молекулы - EBER1 и EBER 2.
- Вирус имеет латентные мембранные протеины LMP 1 и LMP 2. Эти антигены экспрессируются инфицированными В-лимфоцитами .

Патогенез инфекций , вызываемых ВЭБ

- Источником инфекции являются больной человек или вирусоноситель. Вирус передается воздушно-капельным путем , при контакте через слюну.
- Первичная репликация ВЭБ происходит в носоглотке или эпителиальных клетках слюнных желез.
- Вирус обладает тропизмом к В-лимфоцитам, взаимодействует с рецепторами к С3 компоненту комплемента, находящимися на поверхности В-лимфоцитов и , проникнув в них, разносится по всему организму .

The EBV replication cycle



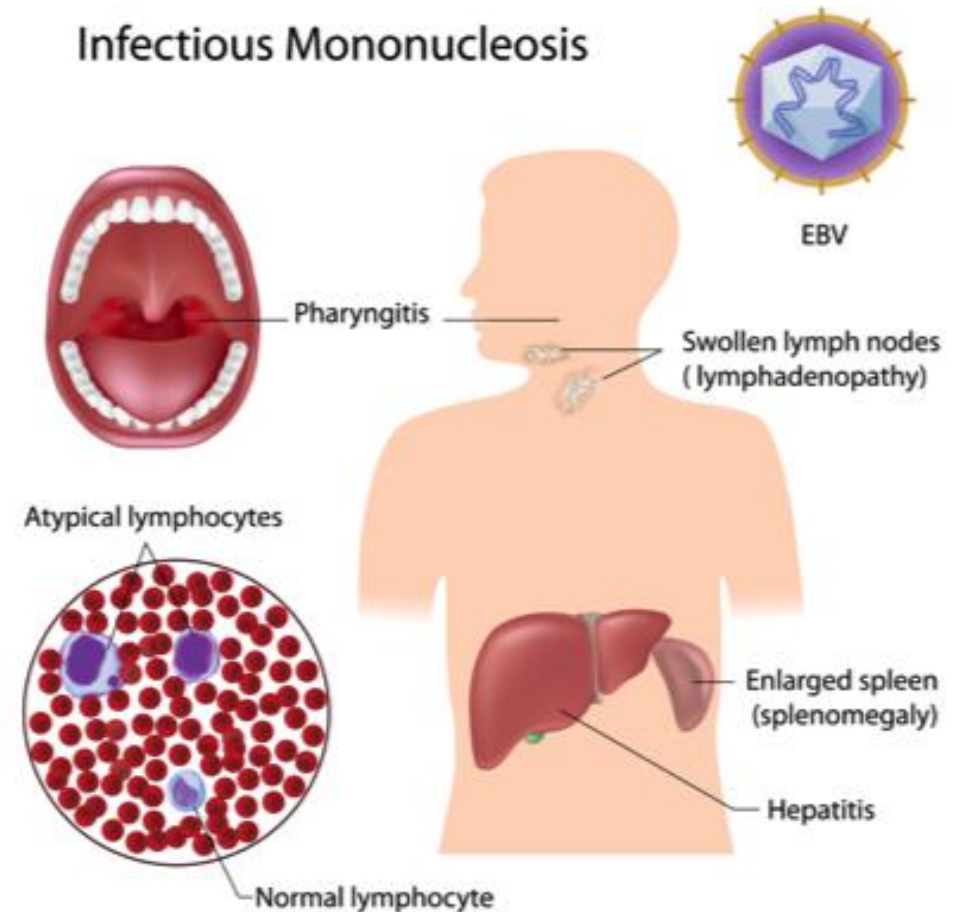
Патогенез инфекций, вызываемых ВЭБ

- Вирусы не реплицируются в В-лимфоцитах, но сохраняются в виде копий внехромосомных ДНК, вызывая латентную инфекцию.
- ВЭБ оказывает трансформирующее действие, **повышает способность В-лимфоцитов к пролиферации**, превращая их тем самым в «бессмертные».
- **Поликлональная стимуляция инфицированных В-лимфоцитов** способствует синтезу различных иммуноглобулинов, в том числе гетерофильных антител (например, к эритроцитам барана). Эти клетки становятся мишенями для цитотоксических Т-лимфоцитов, которые подавляют их пролиферацию.
- Вот почему ослабление клеточного иммунитета по разным причинам (прием иммунодепрессантов, СПИД и т. Д.) увеличивает восприимчивость к **ВЭБ-ассоциированным лимфомам**.

Клинические проявления инфекций , вызываемых ВЭБ

(инфекционный мононуклеоз)

- ВЭБ вызывает инфекционный мононуклеоз и лимфопролиферативные болезни , а также некоторые карциномы.
- **Инфекционный мононуклеоз** характеризуется интоксикацией, повреждением неба и миндалин лимфаденопатией, спленомегалией.



Клинические проявления заболеваний , вызываемых ВЭБ

(лимфопролиферативные заболевания)

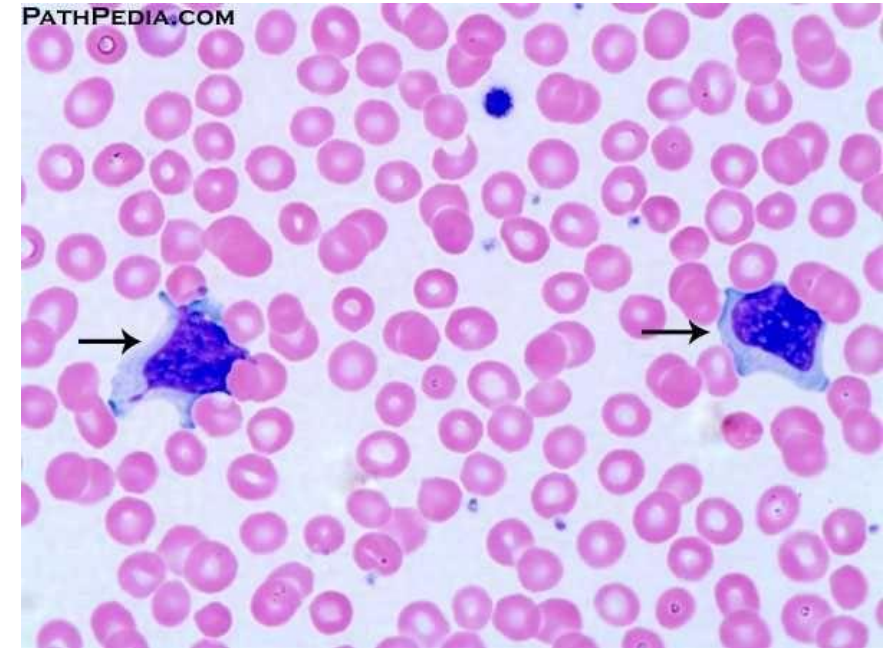
- **Волосистая оральная лейкоплакия** – характерное для СПИДа поражение слизистой оболочки рта.
- **Лимфома Беркитта** ассоциирована с малярией в Африке, относится к злокачественным, быстро прогрессирующим опухолям. Развивается в основном у детей 5-8-летнего возраста, сопровождается деструкцией верхней челюсти. Возможны метастазы в другие органы.
- **Носоглоточная карцинома** эндемичное для Китая заболевание, наиболее встречается среди мужского населения. Опухолевые клетки имеют эпителиальное начало и содержат последовательности ДНК ВЭБ.
- Также у значительного количества больных с **лимфомой Ходжкина** обнаруживаются ДНК ВЭБ.
- **Лимфопролиферативные болезни у лиц с иммунодефицитом** также могут индуцироваться ВЭБ.

Лимфома Беркитта



Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых ВЭБ

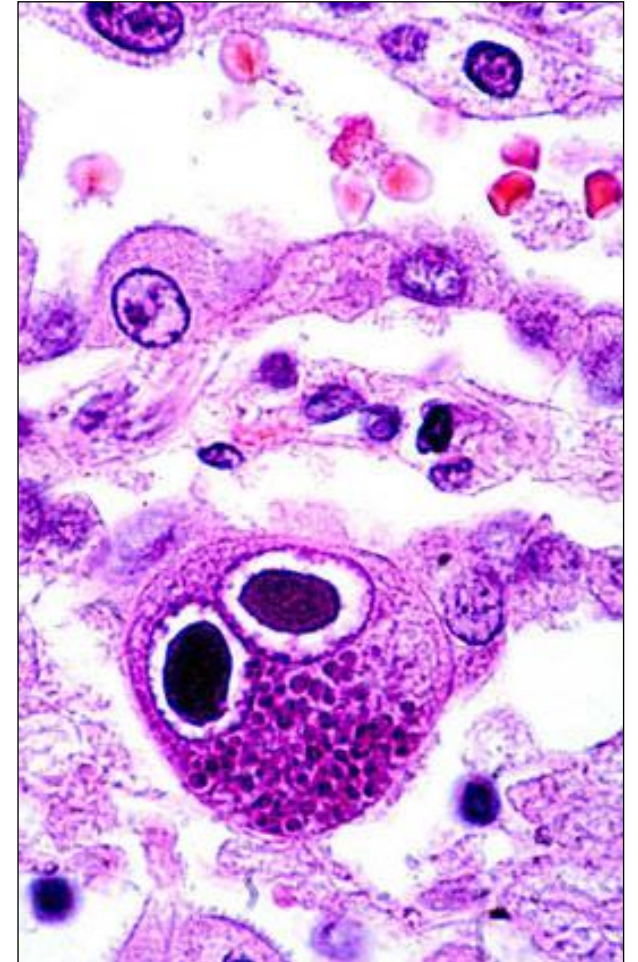
- Инфекционный мононуклеоз документируется обнаружением **атипичных лимфоцитов, лимфоцитозом** (моноциты составляют 60-70% белых кровяных клеток с 30% атипичных лимфоцитов)
- Применяют также вспомогательные реакции для выявления гетерофильных антител (агглютинация эритроцитов барана сывороткой крови больного и др.)
- На ранних стадиях заболевания определяются против капсидного антигена, далее образуются IgG-антитела, которые сохраняются на протяжении всей жизни. Через несколько недель после острой инфекции обнаруживаются антитела к EBNA и мембранным антигенам, которые сохраняются на протяжении всей жизни.



Цитомегаловирус

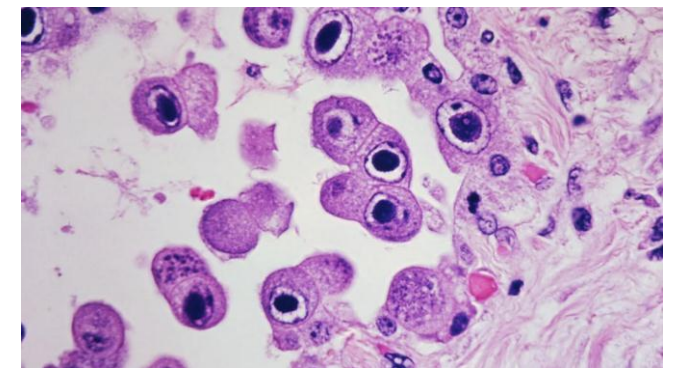
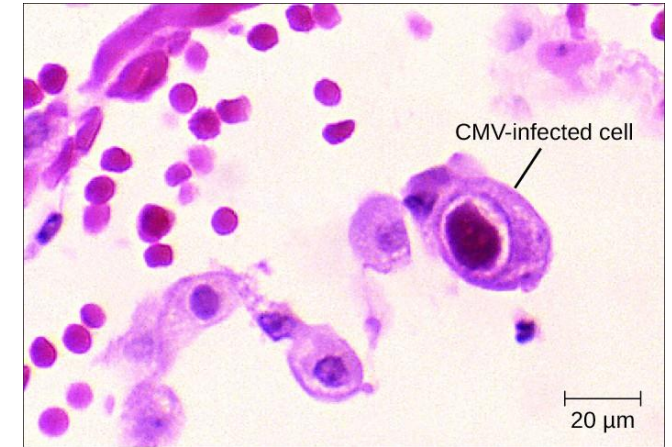
Цитомегаловирус (ЦМВ), или вирус цитомегалии, или вирус герпеса типа 5 относится к семейству *Herpesviridae* роду *Cytomegalovirus*.

- Название вируса указывает на патологические изменения морфологии культуры клеток, возникающие в результате цитопатического действия.
- В пораженных очагах обнаруживаются гигантские клетки размером 25-40 мкм (от греч. *cytos* – клетка, *megas* – большой), содержащие тельца включений. Внутриядерные включения от ядерной мембраны отделены прозрачной неокрашенной зоной и имеют форму в виде **«глаза совы»**.



Цитомегаловирус (особенности)

- ЦМВ имеет самый большой ДНК-геном среди герпес-вирусов. Вирус культивируется в культуре фибробластов человека.
- Вирус вызывает цитопатический эффект с образованием гигантских, или цитомегалических клеток с внутриядерными включениями, который обнаруживается через 30-50 дней после заражения.
- Вирус неустойчив, термолабилен, чувствителен к дезинфектантам и жирорастворителям.



Пути передачи ЦМВ-инфекции

- По некоторым данным, все люди в возрасте до 50 лет инфицированы ЦМВ.
- Источник инфекции – человек, больной острой или латентной формой .
- Заражение происходит через кровь, слюну, мочу, сперму, грудное молоко и др. контактно-бытовым , воздушно-капельным , иногда фекально-оральным путем.
- Инфицирование может быть при половых контактах , переливании крови и трансплантации органов.

Патогенез и клинические проявления ЦМВ-инфекции

- Входными воротами инфекции служат кожа , слизистые оболочки, дыхательные пути и плацента (врожденная цитомегалия).
- Вирус проникает в организм и вызывает системную инфекцию с поражением слюнных желез, легких, печени, почек, моноцитов, Т- и В-лимфоцитов. Инкубационный период 1-2 месяца
- Заболевание сопровождается симптомами, сходными с инфекционным мононуклеозом, но в большинстве случаев протекает субклинически. К основным клиническим симптомам относятся длительная лихорадка, слабость, мышечные боли, нарушение функции печени и лимфоцитоз .
- Точная локализация персистирующего в организме ЦМВ неизвестна, предположительно, что в моноцитах и макрофагах.
- Чаще всего активация вируса наблюдается у беременных и пациентов с иммунодефицитами.

ЦМВ-инфекция у иммунодефицитных лиц

- *У пациентов с иммунодефицитами* ЦМВ-инфекция имеет более тяжелое течение.
- Диссеминированная ЦМВ-инфекция в виде различных осложнений (чаще всего пневмонии) может развиваться после трансплантации органов, у пациентов со злокачественными опухолями и у пациентов со СПИДом.
- Вирус потенциально может вызывать опухоли (аденокарциному предстательной железы и др.)

Врожденная ЦМВ-инфекция

- При первичном инфицировании а также при реактивации вируса у беременных может произойти внутриутробное заражение плода. У новорожденных развивается гепатоспленомегалия, желтуха, кахексия, микроцефалия и другие пороки, приводящие к смерти примерно в 20% случаев.
- У большинства рожденных жизнеспособными детей до 2 лет, наряду с ослаблением зрения и слуха (иногда, глухота) наблюдаются **различные патологии центральной нервной системы**



Микробиологическая диагностика ЦМВ-инфекции

- Антитела(IgM и IgG) к вирусу в сыворотке крови больного определяют посредством **ИФА** . Обнаружение IgG указывает на перенесенную инфекцию и возможность потенциальной активации вируса, тогда как IgM указывает на текущую инфекцию (или активацию инфекции).
- Вирус в крови и моче выявляют с помощью **ПЦР**.
- Вирус-позитивные лейкоциты у пациентов можно определить **РИФ** с использованием моноклональных антител .
- Из за длительных сроков культивирования в клинической лаборатории не проводится культивирование вируса в культуре клеток.



Лечение цитомегаловирусной инфекции

- Для лечения используют аналоги нуклеозидов - **ганцикловир**
- Назначение **ацикловира** и **валацикловира** облегчает течение ЦМВ-инфекции, развившейся после пересадки костного мозга и почек
- Из-за полученных противоречивых результатов ограничено применение **цитомегаловирусного иммуноглобулина**, содержащего высокие титры антител против ЦМВ, применяемого для облегчения течения ЦМВ-инфекций после трансплантации органов



Другие герпесвирусы человека

- **ГВЧ 6 типа** лимфотропный вирус, поражающий Т-лимфоциты. Заражение ГВЧ-6 происходит в раннем детстве. Вызывает **внезапную экзантему** (*roseola infantum*) или **«шестую болезнь»**, сопровождаемую внезапным повышением температуры на фоне экзантемы.
- **ГВЧ- 7 типа** заражает в раннем детстве, персистирует в слюнных железах и выделяется со слюной. Предположительно ГВЧ-7 вызывает **синдром хронической усталости** с субфебрильной температурой, потливостью, артралгией и слабостью.
- **ГВЧ-8 типа** выделен при изучении ткани больных саркомой Капоши у ВИЧ-инфицированных и получил название **герпес-вирус, ассоциированный с саркомой Капоши**

