

**FAMILIA HERPESVIRIDAE.
MICROBIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL
DE LABORATOR AL INFECȚIILOR
CAUZATE DE HERPESVIRUSURI**



FAMILIA HERPESVIRIDAE

- Virusurile herpetice - agenți patogeni ai omului, primatelor și altor mamifere (porci, cai, vite), ai păsărilor (găini, curceni, etc), peștilor și broaștelor, reunind peste 100 de virusuri.

Clasificarea virusurilor herpetice de interes medical:

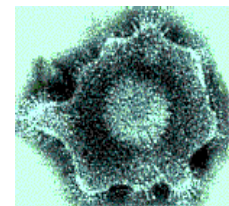
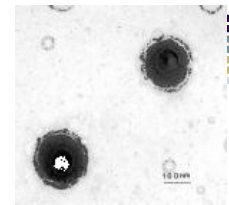
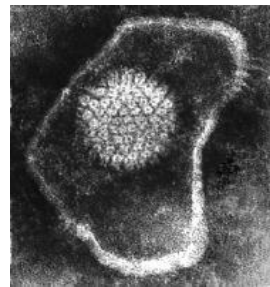
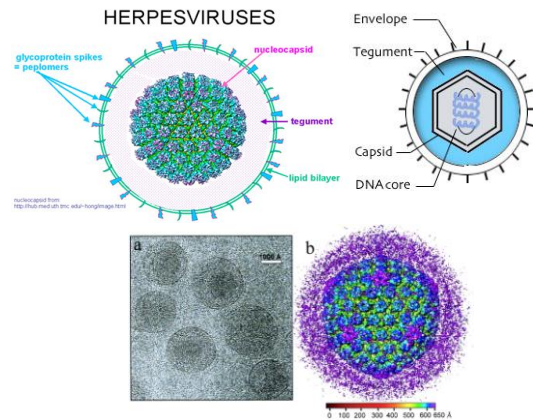
- **Subfamilia Alphaherpesvirinae**
genul Simplexvirus (HSV-1, HSV-2)
genul Varicellovirus (VZV)
- **Subfamilia Betaherpesvirinae**
genul Cytomegalovirus (CMV)
genul Roseolovirus (HHV-6/7)
- **Subfamilia Gammaherpesvirinae**
genul Lymphocryptovirus (EBV)
genul Rhadinovirus (HHV-8)



| Viruses of Humans | Common Name | Subfamily |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------|
| Human herpesvirus 1 | Herpes simplex type1 | alpha |
| Human herpesvirus 2 | Herpes simplex type 2 | alpha |
| Human herpesvirus 3 | Varicella-zoster | alpha |
| Human herpesvirus 4 | Epstein-Barr | gamma |
| Human herpesvirus 5 | Cytomegalovirus | beta |
| Human herpesvirus 6/7 | exanthum subitum roseola infantum | beta |
| Human herpesvirus 8 | Kaposi's Sarcoma-assoc. | gamma |

CARACTERE GENERALE ALE HERPESVIRUSURILOR

- **Structura virionului**
Virion sferic, 150-200 nm diametru, constituit din:
 - **centru dens**, de forma unui mosor (bobină), de natură proteică, pe care este înfășurat acidul nucleic;
 - **genomul viral – ADNc.**, constituit din 80-100 gene
 - **capsida** de simetrie icosaedrică, formată din 162 capsomere;
 - **tegument** – structură proteică fibrilară, situată între capsidă și supercapsidă;
 - **peplos (supercapsida)**, dublu strat lipidic, pe suprafața căreia proemină spiculi scurți, constituiți din 5-8 glicoproteine, responsabile de adeziune și fuziune
 - Enzime (ADN-polimeraza ADN-dependență, timidin-kinaza, ribonucleotid-reductaza, serin-proteaza)



Caractere biologice

- virusuri dermo, limfo și neurotrope
- determină *infecții latente, recurente*
- majoritatea prezintă potențial oncogen
- posedă numeroase enzime ce intervin în multiplicarea virală
- prezintă un spectru foarte larg de gazde și o gamă diversă de forme clinice
- sunt virusuri fragile și se transmit numai prin contact direct



| Human herpes type | Name | Sub Family | Target cell type | Latency | Transmission |
|-------------------|--|---------------------|-----------------------------------|--|--|
| 1 | Herpes simplex-1 (HSV-1) | Alphaherpesvirinae | Mucoc epithelia | Neuron | Close contact |
| 2 | Herpes simplex-2 (HSV-2) | Alphaherpesvirinae | Mucoc epithelia | Neuron | Close contact usually sexual |
| 3 | Varicella Zoster virus (VZV) | Alphaherpesvirinae | Mucoc epithelia | Neuron | Contact or respiratory route |
| 4 | Epstein-Barr Virus (EBV) | Gammapherpesvirinae | B lymphocyte, epithelia | B lymphocytes | Saliva |
| 5 | Cytomegalovirus (CMV) | Betaherpesvirinae | Epithelia, monocytes, lymphocytes | Monocytes, lymphocytes and possibly others | Contact, blood transfusions, transplantation, congenital |
| 6 | Herpes lymphotropic virus | Betaherpesvirinae | T lymphocytes and others | T lymphocytes and others | Contact, respiratory route |
| 7 | Human herpes virus-7 (HHV-7) | Betaherpesvirinae | T lymphocytes and others | T lymphocytes and others | Unknown |
| 8 | Human herpes virus-8 (HHV-8) Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) | Gammapherpesvirinae | Endothelial cells | Unknown | Exchange of body fluids? |

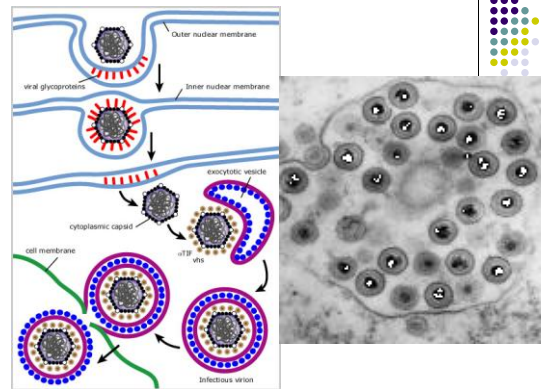
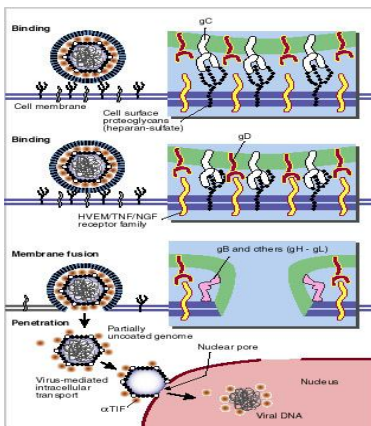
Rezistența la agenți fizici și chimici

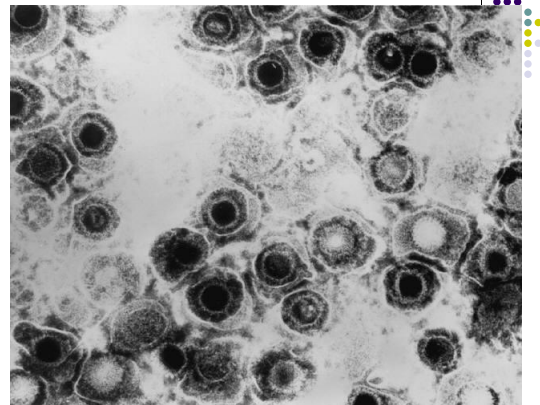
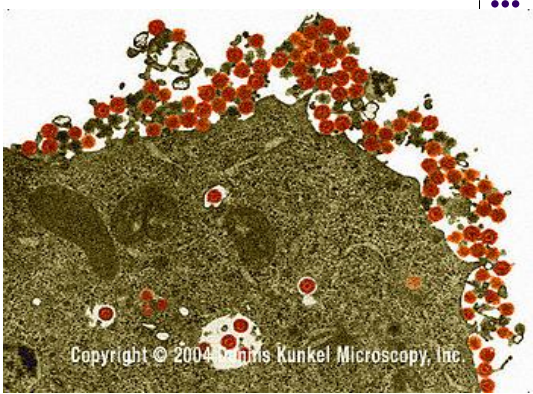
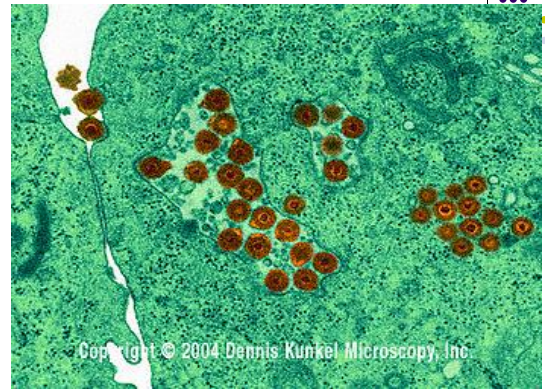
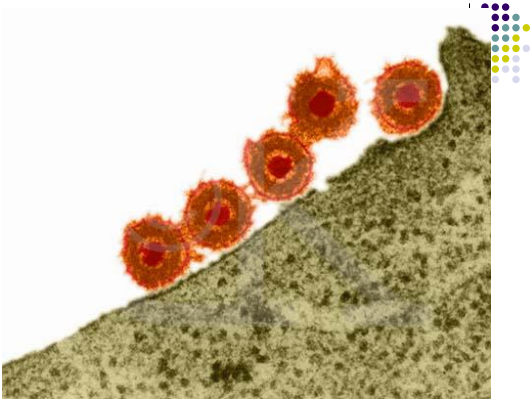
- În stare liofilizată, la 4 grade, virusurile herpetice se mențin ani de zile.
- Relativ instabile la temperaturi ambientale (+ 22 grade C), inactivate de solvenți lipidici, detergenți, dezinfectanți uzuali, pH extreme.
- Prezintă sensibilitate la acțiunea inhibitorilor sintezei ADN (acyclovir, etc).



Multiplicarea virală

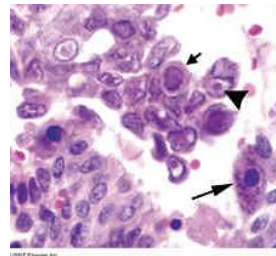
- **Adsorbția virionului** la suprafața celulei-țintă
- **Penetrarea NC** prin fuziunea supercapsidei virale cu membrana celulară
- **Degradarea parțială a capsidei** de enzime celulare și **pătrunderea ADN viral în nucleul celulei**. Sinteza proteinelor celulare se oprește.
- **Biosinteza**: În 3 runde consecutive are loc transcrierea ARNm viral cu sinteza ulterioară a 3 tipuri de proteine: foarte precoce (*alpha, immediate early*), precoce (*beta, early*), care sunt în majoritate enzime și proteine tardive (*gamma, late*), care sunt proteine de structură.
- **Replicarea ADN**
- **Asamblarea NC** are loc în nucleu. Părăsindu-l prin înmugurire, NC se învelesc cu membrana nucleară internă, în care sunt înserate GP virale imature, pe care o „dezbracă” în procesul de înmugurire prin membrana nucleară externă. În citoplasmă NC capătă proteinele tegumentului și sunt ulterior re-invelite în supercapsidă într-o veziculă de exocitoză, în membrana căreia se conțin GP virale mature.
- Virionii sunt **eliberați** prin exocitoză.





Celula infectată este alterată ireversibil prin:

- Inhibarea rapidă a metabolismului celular
- Fragmentarea cromozomului și apariția incluziilor intranucleare – **corpusculii Cowdry**
- Apariția de sinciții și celule gigante



SUBFAMILIA ALPHAHERPESVIRINAE

- **GENUL Simplexvirus**
- Specii: *Herpes simplex virus tip 1 (HSV-1)*
Herpes simplex virus tip 2 (HSV-2)
- **Cultivare:**
 1. **Culturi celulare** primare umane sau din rinichi de iepure, fibroblaste de embrion de găină, linii celulare HeLa
 2. **Ouă embrionate de găină** (pe membrana chorioalantoică produc pustule – *pocks-uri*)
 3. **Animale de laborator**
 - Șoarece nou-născut (letal)
 - Iepure (keratoconjunctivită după scarificarea corneei)
 - Cobai infectat intraplantar (erupție veziculară locală)



Patogeneza infecțiilor cu HSV

- **Sursa de virus** – omul (90% au Ac anti-HSV1 și 20% anti-HSV2)
- **Transmiterea virusului:**
 - Contact direct prin salivă sau lichidul vezicular, mai rar prin obiecte contaminate recent cu salivă (preponderent HSV 1)
 - Contact sexual (preponderent HSV 2)
 - În timpul nașterii (herpes neonatal, HSV 2)
 - Transplacentar (herpes congenital, HSV 2)
 - Prin intermediul transplantelor de organe infectate
 - Autoinocularea



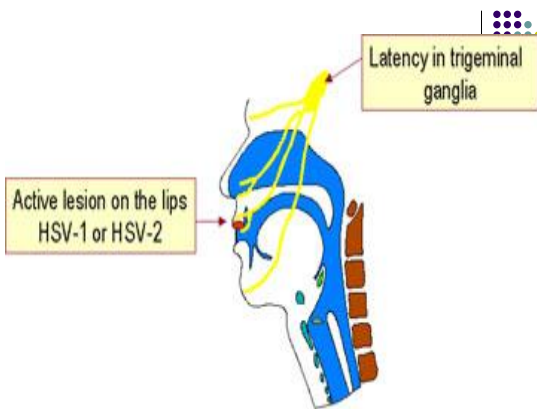
Infecția cu HSV -1

- **Primo-infecția** este precoce, la 1-3 ani, în 90% cazuri – asimptomatică.
- **Manifestări clinice:**
 - **herpesul labial**
 - **gingivostomatită** (erupție veziculară și ulcerosă, adenopatie cervicală, febră)
 - **kerato-conjunctivită** (prezintă riscul ulcerăției corneei și orbirii)
 - **eczema herpeticum** (survine la pacienți cu eczeme cronice, se manifestă ca o dermatită veziculară generalizată)
 - **panarițiu herpetic** (la personalul medical, la copii – autoinoculare)
 - **meningite, meningo-encefalite**, consecutiv infecției pe calea nervilor trigemen sau olfactiv (letalitate 70%).

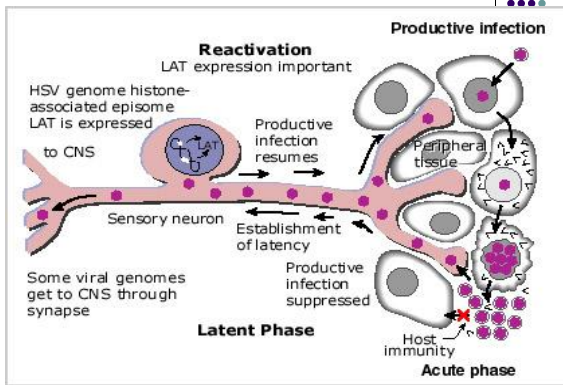




- După infecție (clinică sau asimptomatică) virusul se localizează în ganglionul trigemen, determinând o infecție latentă. Genomul viral persistă sub formă de episom. Replicarea ADN nu are loc, exprimându-se doar câteva gene "de latență".



- **Reactivarea** infecției (herpesul recurent) are loc consecutiv scăderii rezistenței organismului: stress, radiații, frig, infecții, perturbări hormonale, etc. Virusul se propagă centrifug pe cale nervoasă, determinând o infecție locală (frecvent la joncțiunea cutaneo-mucoasă): **herpes labial**, nazal, keratita herpetică (bucchet de vezicule, se acoperă cu cruste în câteva zile, vindecarea survine în 10 zile).



Infecția cu HSV -2

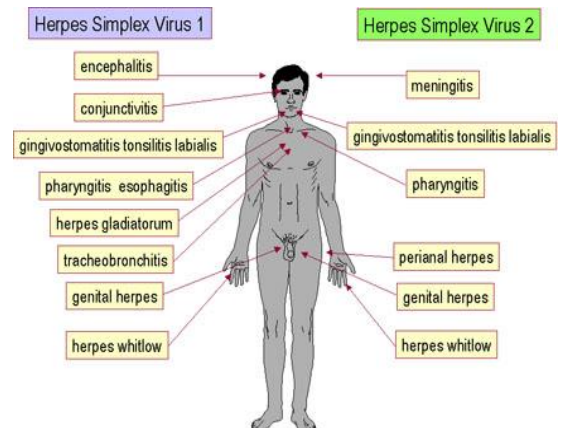
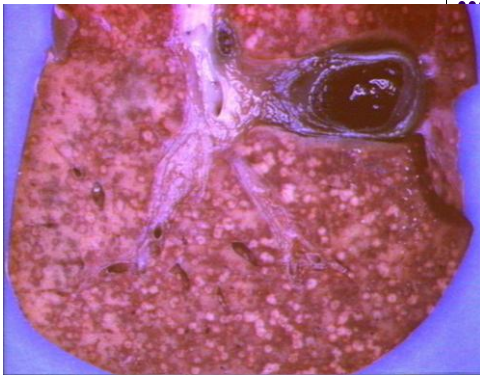
- Determină preponderent infecții genitale.
- **Primo-infecția** are loc la persoane de 15-25 ani (primele contacte sexuale) sau la nou-născuți (herpes congenital, neonatal).
- 75% cazuri primo-infecția este inaparentă.

Manifestări clinice:

- **herpesul genital** (leziuni veziculo-ulcerative ale penisului, vulvei, vaginului, colului uterin, perineului, feselor, proctita herpetică).
- După infecția primară virusul rămâne latent în ganglionii lombari și sacrali, determinând recurențe, cu aceeași localizare, care sunt mai puțin severe.
- **herpesul neonatal.** Contractat de nou-născut la naștere sau de la personalul medical cu herpes oral sau panarițiu herpetic. Se manifestă prin **septicemie** sau **conjunctivită**. Netratat progresează cu diseminare viscerală și deces (65%). Infecția poate fi asimptomatică.
 - **infecție congenitală.** Transmiterea transplacentară determină malformații congenitale, vicii.
 - **cancer** de col uterin și vulvar

- *La gazde imunocompromise infecția cu HSV evoluează grav, cu diseminare masivă și afectarea organelor interne. Recurențele sunt mai frecvente, cu ulcerare, necroză, extindere.*

- **Răspuns imun:** umoral și celular, se instalează după 1-3 săptămâni de la infecție. Ig M apar și în reactivări și sunt martor de multiplicare virală. Ig nu sunt protectoare, reactivările au loc în prezența Ac. Imunitatea celulară joacă rolul principal în controlul infecției cu HSV.



Diagnosticul de laborator al infecției cu HSV

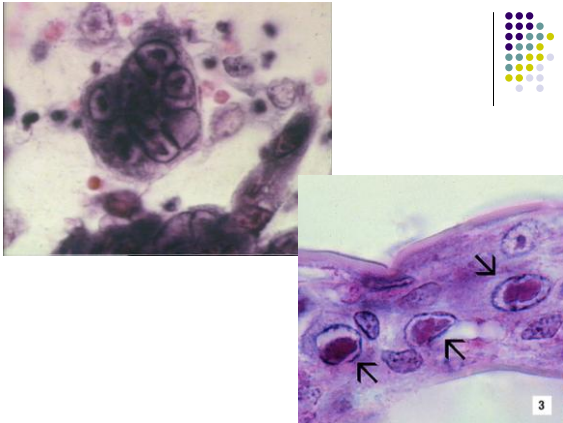
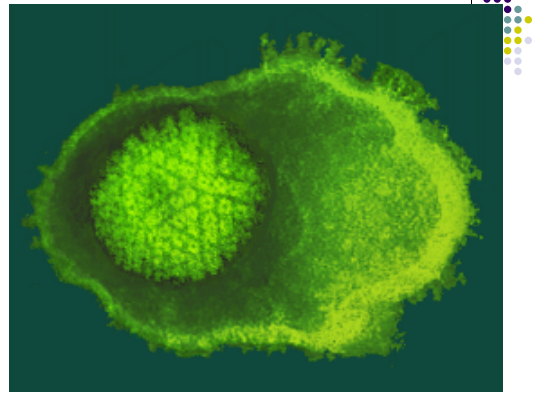
- *Prelevate*: lichid din vezicule, ulceratii, cruste, fragmente bioptice sau necrotice.

A. Diagnosticul direct

1. Examenul microscopic

- ME
- Microscopia optică – pe frotiuri colorate cu hem-eozină se observă celule mari, cu incluzii intranucleare eozinofile (Cowdry)

2. Detectarea Ag virale: RIF cu Ac monoclonali



3. Examenul virusologic

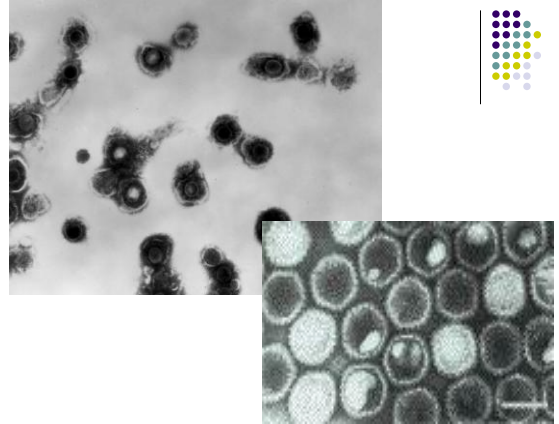
- Izolarea virusului pe animale sensibile, ou embrionat de găină sau culturi celulare
- Indicarea virusului: manifestări clinice la animal, apariția veziculelor pe membrana chorio-alantoică a oului embrionat, ECP specific pe culturile de celule (celule gigante sincitiale cu incluzii intranucleare)
- Identificarea virusului cu ajutorul serurilor imune specifice (RN, RIF, ELISA)
- Detectarea genomului viral prin tehnici de biologie moleculară (hibridare in situ, PCR)

B. Diagnosticul indirect

- *Serodiagnostic*. Examinarea serurilor perechi (precoce și tardiv) cu evidențierea creșterii titrului de Ac de cel puțin 4 ori. Reacții utilizate: RFC, RN, RIFI, ELISA.
- **Tratamentul specific al infecției cu HSV**
- Vidarabin (adenin-arabinosid). Analog nucleozidic al guaninei. Inhibitor competitiv al ADN polimerazei virale
- Acyclovir, Valacyclovir, Zovirax (acycloguanosid), Penciclovir, famciclovir. Analogi nucleozidici ai guaninei. Inhibitori ai ADN polimerazei virale, manifestă activitate numai asupra virusului în curs de replicare.
- Foscarnet (phosphonoformat). Dezechilibrează reacția de polimerizare a ADN.

GENUL Varicellovirus

- Specia – **virusul Varicella-Zoster (VZV)**, agentul etiologic al **varicelei** în primoinfecție și al **zonei-zoster** prin reactivare.
- **Cultivarea** – numai pe culturi celulare (celule primare de origine umană, simiană, din rinichi de iepure, linii celulare)



Patogeneza infecției cu VZV

- **Infecția primară – varicela**
- **Sursa de virus – omul**
- **Transmiterea** – aerogenă, prin secreții rinofaringiene sau prin contact cu lichidul vezicular sau obiecte recent contaminate cu lichid vezicular.
- Varicela se manifestă în special la copiii de 2-6 ani, evoluând epidemic iarna și primăvara. Contagiozitate maximă cu 1-2 zile înaintea erupției și o săptămână după ultimul puseu eruptiv. Perioada de incubație – 14 zile
- După pătrundere virusul se multiplică local în căile respiratorii (mai rar conjunctivă) și ganglionii limfatici locali. Urmează faza de viremie primară, cu durata de 10-11 zile și cu afectarea sistemului reticulo-endotelial.

- Peste 5 zile urmează viremia secundară cu răspândirea și multiplicarea virusului în tegument, conjunctivă, tractul respirator (țesuturilor de origine ectodermică). Apare febra și succesiunea unor valuri de erupție pruriginoasă care evoluează independent (*maculă – papulă – vezicule cu lichid clar, apoi cruste*) și ating tot corpul. Dispar fără cicatrice.
- Odată cu apariția Ac (2-3 săptămâni) simptomele dispar. Evoluția este benignă.
- La persoane cu deficiențe imunitare – leziuni hemoragice, suprainfecție bacteriană, encefalite, pneumonii, varicela diseminată, letală.
- La gravide în primele 20 săptămâni de sarcină varicela poate determina o embriofetopatie





● Reactivarea (Zona-Zoster)

- În cursul primoinfecției, prin nervii senzitivi sau hematogen, VZV diseminează spre ganglionii spinali sau ai nervilor cranieni, unde persistă latent. În caz de reactivare virusul se multiplică și se deplasează pe cale nervoasă centrifugă spre sectorul cutanat corespunzător, determinând Zona-Zoster. Infecția debutează cu neuralgie severă, hiperestezie și erupție veziculară localizată unilateral în dermatomul nervului afectat. Poate fi asociată cu meningită sau paralizii.
- Forme clinice: zoster oftalmic, zoster motor, encefalomielita.
- Erupțiile persistă până la apariția răspunsului imun (umoral, celular).



● Tratament – acyclovir, valacyclovir, famciclovir.

Tratament simptomatic (analgice, antipruriginoase)

- **Profilaxie – vaccin viu atenuat, tulpina Oka** (în special la imunodeprimați).
- Pentru prevenirea evoluției grave la contacti (nou-născuți, copii până la 15 ani, gravide neimunizate, persoane cu imunodeficiențe) se administrează **Ig umană hiperimună specifică** sau **gammaglobuline de convalescenți** de zona.

SUBFAMILIA GAMMAHERPESVIRINAE

● GENUL Lymphocryptovirus

- Specia – *virusul Epstein-Barr (EBV)*
- EBV este agentul cauzal al mononucleozei infecțioase, implicat în etiologia unor tumori: limfomul Burkitt, carcinomul nasofaringean, leucoplakia păroasă a limbii. Este limfo și epiteliotrop.
- **Structura antigenică a EBV:**
 - antigen precoce (early antigen) – **EA** – enzime implicate în replicare
 - antigen de membrană – **MA**
 - antigen nuclear – **EBNA**
 - antigen al capsidei virale – **VCA**

Cultivare:

- Culturi din limfocite B, provenite din sânge din cordonul ombilical. Infectate cu EBV suferă transformare prin proliferare continuă - „*imortalizarea limfocitelor*”.
- Inocularea de celule limfoblastoide la șobolani nou-născuți, hamsteri, șoareci induce tumori secretoare de IgM sau IgG.

- **Celulele-țintă** pentru EBV exprimă pe suprafața membranei celulare moleculele **CR2 (CD21)** – receptor pentru fracția C3b a complementului, de care se atașează virusul – **limfocitele B și celulele epiteliale ale oro- și rinofaringelui**.
- Infecția **celulelor epiteliale** este litică, cu moartea celulei și producere de virus. Celulele infectate astfel exprimă pe membrană **Ag EA și VCA**.
- În contrast, EBV induce infecție latentă a **limfocitelor B in vivo** și transformă limfocitele B normale *in vitro* cu proliferarea lor continuă - „linii limfoblastoide imortalizate”. Limfocitele infectate latent exprimă **Ag EBNA și MA**.

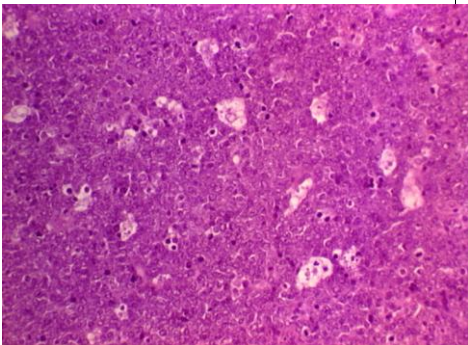


Patogeneza mononucleozei infecțioase

- Afectează în special copiii și adolescenții.
- **Sursa de infecție** – omul.
- **Transmiterea** se efectuează prin intermediul salivei (boala sărutului), obiecte contaminate recent, rareori transfuzii.
- **Poarta de intrare** – orofaringele. EBV afectează limf B direct sau după traversarea țesutului epitelial amigdalian prin transcitoză. Aceste limfocite B proliferază și produc virus, care infectează alte celule, astfel afectând toate țesuturile limfoide din organism.
- **Incubația** – 30-50 zile
- **Semne clinice** – angină, astenie, febră, adenopatie generalizată, splenomegalie și hepatită



- **Complicații:** anemie hemolitică, purpură trombocitopenică, meningită.
- În sânge – limfocite B atipice, care prezintă Ag EBNA și MA.
- Vindecarea survine peste câteva zile sau săptămâni (răspunsul imun).
- **Reactivarea endogenă** a EBV conduce la sindromul de mononucleoză cronică, cu febră, astenie și producere anormală de Ig.

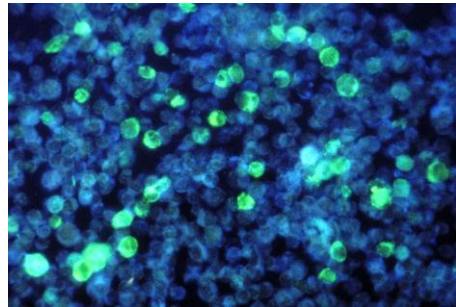




- **Imunitate:**
- umorală prin prezența Ac (IgM antiVCA sunt markeri de infecție recentă, IgG antiVCA și antiEBNA – semnal de infecție persistentă)
- imunitatea celulară este supresată, numărul de Ts fiind majorat pentru o perioadă de 8 săptămâni. Pe suprafața limfocitelor B apar neoantigene (antigene Paul-Bunnell), ce induc Ac *heterofili* (Ac față de hematii de oaie).

● Diagnosticul de laborator

- *Prelevate:* spălătură faringiană, sânge (limfocite), biopsate (ganglioni limfatici, splină)
- **Examenul microscopic:** pe frotiuri din sânge – limfocite B mari, anormale, cu citoplasma bazofilă și nucleu fragmentat
- **Detectarea Ag EBNA** în RIF cu Ac monoclonali
- **Examenul virusologic:** izolarea virusului pe cultură de limfocite B și observarea transformării maligne cu apariția unei linii continue



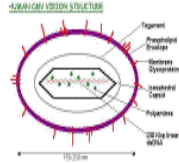
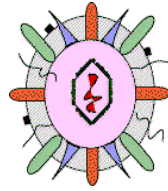
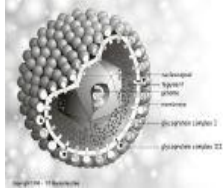
● Diagnosticul serologic:

- În infecția primară se evidențiază Ac heterofili (testul Paul-Bunnell)
- Teste pentru detectarea Ac specifici față de Ag virale pe probe duble de ser:
- În infecții primare – IgM și Ig G (peste 2 săptăm) anti VCA (persistă în titru mic toată viața), în convalescență – anti EBNA
- În infecția reactivată și în neoplazii reapar Ig G anti EA în titru mare și sunt prezenți Ac antiEBNA



SUBFAMILIA BETAHERPESVIRINAE

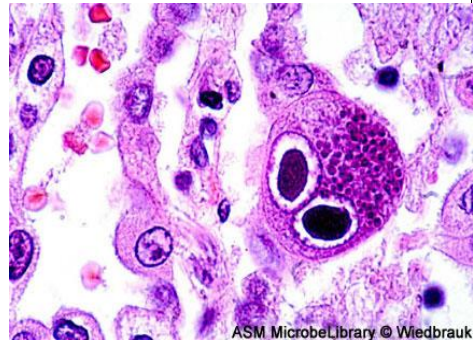
- GENUL Cytomegalovirus
- Specia *Virusul cytomegalic (CMV)*
- **Cultivarea** – numai pe culturi de celule primare din fibroblaste umane sau culturi de miometru.
- Celulele – țintă: macrofagele, celulele endoteliale, limfocitele T și B, celulele-susă din măduva osoasă, celulele epiteliale ale canalelor glandulare.



Patogeneza infecției cu CMV

- Sursa de infecție – omul
- Transmiterea:
- Prin contact direct cu secrețe și excrețe ale bolnavilor (salivă, lacrimi, lapte, urină, secreții ale colului uterin, vaginale, spermă, mase fecale, sânge)
- Congenital (vertical)
- Neonatal (în timpul nașterii, prin lapte)
- Transfuzii de sânge sau transplantate de organe

- **Primoinfecția** este în general asimptomatică (80-90%). În caz de viremie este urmată de persistența latentă a virusului în glandele salivare și limfocite B.
- **Manifestări clinice:**
- **Infecția congenitală**
 - moarte in utero cu avort
 - naștere prematură, cu dezvoltarea bolii cu incluzii citomegalice (microcefalie, hepatosplenomegalie, purpură trombocitopenică, pneumonie interstițială, defecte neurologice). Patomorfologic - celulele infectate devin gigante (citomegalie), cu *incluzii intranucleare specifice în „ochi de bufniță”*.



ASM MicrobeLibrary © Wiedbrauk

- **Infecția postnatală** (infecțarea în timpul nașterii sau cu laptele matern). Copiii elimină virusul prin urină și salivă. Decurge inaparent în majoritatea cazurilor. La prematuri – pneumonie interstițială, sechele neurologice și retardare psihomotorie.
- **Infecția primară a copilului sau a adolescentului.** După o incubatie de 30 de zile diseminarea virală se manifestă prin febră, hepatosplenomegalie, adenopatii asociate cu sindrom mononucleozic (neutropenie, limfocitoză, bazofilie). Evoluție benignă.
- **Infecția adultului** (doar la imunodeprimați, persoane cu transfuzii sau transplantate). Se aseamănă cu mononucleoza infecțioasă (cu febră și splenomegalie, dar fără angină, fără adenită și fără Ac heterofili)

- După primoinfecție virusul persistă latent în limfocite.
- **Reactivările** se traduc prin apariția unei viremii tranzitorii și excreția virusului. La imunodeprimați – pneumonie, hepatită, infecție generalizată.
- **Imunitate** – umorală (Ac neutralizanți, fixatori de complement) și celulară prin intermediul limfocitelor Tc și celulelor NK. CMV are efect imunosupresor, ducând la creșterea nr limfocitelor Ts și diminuarea limfocitelor Th.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor citomegalice

- Prelevate: fracția leucocitară a sângelui, urină, spălătură rinofaringeană, secreții cervicale, probe biotice sau necrotice.
- Diagnosticul microscopic. Prezența celulelor mari, cu incluzii intranucleare în „ochi de bufniță” pe frotiuri din leucocite, plasmă, sediment urinar sau secțiuni tisulare
- Detectarea Ag virale cu Ac monoclonali (RIF, ELISA)
- Examenul virusologic – dificil. Cultivarea pe culturi de celule este lentă (2-8 săptămâni). ECP- celule mari, incluziuni eozinofile intranucleare și bazofile intracitoplasmatic
- Detectarea genomului viral (PCR)
- Serodiagnostic. Cercetarea serurilor perechi în RFC, RHA1, RIF1, ELISA



- Infecție congenitală – izolarea virusului în primele 2 săptămâni de viață, depistarea Ig M.
- Infecție recurentă: reapariția excreției virale la pacienți seropozitivi.
- **Tratament**: gancyclovir, valgancyclovir, foscarnet, cidofovir
- **Profilaxie**: vaccin viu atenuat sau/și plasmă sau globulină hiperimună se administrează gravidelor seronegative, recipientilor de transplant



- **HHV 6** – întâlnit la adulți în 90%. Agent implicat în etiologia unei afecțiuni cutanate - *exanthum subitum*. La persoane cu imunosupresie – *pneumonii*, *encefalite*, *retinite*, etc.
- **HHV 7** – izolat de la adulți sănătoși (aprox. 75%), care excretă virusul prin salivă. Sediul latenței – epitelii glandelor salivare, limfocite T CD4. Omologie de 50% cu CMV.
- **HHV 8** – asociat cu sarcomul Kaposi.

