



РУКОВОДСТВО

ГЕРПЕС

ПАТОГЕНЕЗ
И ЛАБОРАТОРНАЯ
ДИАГНОСТИКА

В. А. Исаков, В. В. Борисова, Д. В. Исаков



ИСАКОВ В. А., БОРИСОВА В. В., ИСАКОВ Д. В.

ГЕРПЕС ПАТОГЕНЕЗ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

РУКОВОДСТВО
ДЛЯ ВРАЧЕЙ



Санкт-Петербург
1999

Исаков В. А., Борисова В. В., Исаков Д. В.

И 85 Герпес: патогенез и лабораторная диагностика. Руководство для врачей / Оформление обложки С. Л. Шапиро, А. А. Олексенко. — СПб.: Издательство «Лань», 1999. — 192 с.
(Серия «Мир медицины»)

ISBN 5—8114—0143—4

В руководстве дана характеристика герпесвирусов, изложены вопросы иммунопатогенеза, влияния герпетической инфекции на беременность и плод. Подробно изложены современные методы лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций, даны рекомендации практическому врачу по использованию новых методов для лабораторной диагностики конкретных нозологических форм герпеса — простого и опоясывающего герпеса, цитомегаловирусной инфекции, а также инфекций, обусловленных вирусом Эпштейна — Барр и малоизученными вирусами герпеса человека в, 7 и 8-го типов. Впервые в отечественной литературе даны полные сведения об охарактеризованных CD антигенах.

Для дерматовенерологов, акушеров-гинекологов, инфекционистов, иммунологов и вирусологов, сотрудников диагностических лабораторий, врачей других специальностей, научных работников и преподавателей медицинских вузов, аспирантов и студентов.

Рисунков — 4. Таблиц — 24. Библиография — 139 назв.

Авторы:

Исаков Валерий Александрович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель клиники респираторных и герпесвирусных инфекций взрослых НИИ гриппа РАМН. Автор 170 научных работ, в т. ч. 3 монографий и 12 руководств для врачей.

Борисова Вера Витальевна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры инфекционных болезней и лабораторной диагностики СПИДа Санкт-Петербургской МАЛО. Автор 40 научных работ, в т. ч. монографии по герпесу.

Исаков Дмитрий Валерьевич — аспирант отдела общей иммунологии НИИ экспериментальной медицины РАМН. Автор 12 научных работ.

Рецензенты:

Исполатова А В. — доктор медицинских наук, руководитель лаборатории иммунологии НИИ гриппа РАМН; *Вашукова С. С.* — кандидат медицинских наук, руководитель Санкт-Петербургского городского центра вирусных исследований.

ББК 55.1

*Охраняется законом РФ
об авторском праве.
Воспроизведение всей книги,
или любой ее части запрещается
без письменного разрешения издателя.
Любые попытки нарушения закона
будут преследоваться
в судебном порядке.*

© Издательство «Лань», 1999

© Издательство «Лань», художественное оформление, 1999

© Исаков В. А., Борисова В. В., Исаков Д. В., 1999

© Издательство «Лань», макет, 1999

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Иммунопатогенез герпетической инфекции	9
1.1. Общая характеристика герпесвирусов	9
1.2. Патогенез герпетической инфекции	13
1.3. Иммунология герпетической инфекции	19
Врожденный (неадаптивный) иммунитет	20
Приобретенный (адаптивный) иммунитет	23
1.4. Состояние иммунитета у больных герпесом	52
Глава 2. Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций человека	65
2.1. Особенности лабораторной работы и обследования пациентов при подозрении на герпесвирусные инфекции	65
Техника взятия крови и первичная обработка сывороток для серологических исследований	66
Пересылка и хранение проб	66
2.2. Терминология и принципы основных методов диагностики ГВИ	68
Электронная микроскопия	68
Серологические методы	68
Молекулярно-биологические методы диагностики ГВИ	76
2.3. Диагностика герпетической инфекции	77
Цитологические методы исследования	80
Гистологическая диагностика	83
Серологические методы диагностики	83
Культивирование и идентификация ГВИ	90
2.4. Диагностика varicella-zoster virus (VZV) — вируса ветряной оспы	93
2.5. Диагностика ЦМВИ	103
Реакция нейтрализации	105
Реакция связывания комплемента	105
Реакция агглютинации латекса	106
2.6. Диагностика вируса Эпштейна — Барр	114

2.7. Диагностика ГВИ, вызываемых вирусами герпеса человека 6 (ВГЧ-6), 7 (ВГЧ-7) и 8 (ВГЧ-8)	117
2.8. Прогностическое значение маркеров герпесвирусов при ВИЧ-инфекции	127
2.9. Диагностика сопутствующих генитальному герпесу инфекций	136
Лабораторная диагностика хламидиоза	136
Лабораторная диагностика уреаплазм	141
Лабораторная диагностика гарднереллеза	145
Глава 3. СО антигены	146
Список литературы	183

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— антиген
АТ	— антитело
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ВПГ-1	— вирус простого герпеса первого типа
ВПГ-2	— вирус простого герпеса второго типа
ВГЧ-6	— вирус герпеса человека шестого типа
ВГЧ-7	— вирус герпеса человека седьмого типа
ВГЧ-8	— вирус герпеса человека восьмого типа
ВЭ	— внезапная экзантема
ВЭВ	— вирус Эшптейна — Барр
ГВ	— герпесвирусы
ГВИ	— герпесвирусные инфекции
ГИ	— герпетическая инфекция
ИБ	— иммуноблот
ИФА	— иммуноферментный анализ
КП	— кожная проба
МГ	— молекулярная гибридизация
МФА	— метод флюоресцирующих антител
ПРГ	— простой рецидивирующий герпес
РАЛ	— реакция агглютинации латекса
РН	— реакция нейтрализации
РИГА	— реакция непрямой гемагглютинации
РСК	— реакция связывания комплемента
РТМЛ	— реакция торможения миграции лейкоцитов
СХУ	— синдром хронической усталости
ТЦД	— тканевая цитопатогенная доза
ХАО	— хорион-аллантоисная оболочка
ЦИК	— циркулирующие иммунные комплексы
ЦМВ	— цитомегаловирус
ЦМВИ	— цитомегаловирусная инфекция
ЦМВК	— цитомегаловирусные клетки
ЦПД	— цитопатогенное действие
ЦТЛ	— цитотоксические лимфоциты
CD3	— Т-лимфоциты
CD4	— Т-лимфоциты хелперы/индукторы
CD8	— Т-лимфоциты цитотоксические/супрессоры
HZ	— herpes zoster
HS	— herpes simplex
Ig	— иммуноглобулины
IgA	— иммуноглобулины класса А
IgG	— иммуноглобулины класса G
IgM	— иммуноглобулины класса M
ВOr(VZV)	— вирус опоясывающего герпеса
ММС	— моноцитарно-макрофагальная система

ВВЕДЕНИЕ

В

и своей практической деятельности врачи многих специальностей встречаются с заболеваниями, вызванными вирусами семейства *Herpesviridae*. В настоящее время известно 8 антигенных серотипов вирусов герпеса: вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, ветряной оспы — опоясывающего герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр, вирусы герпеса человека 6, 7 и 8 типов. Герпесвирусы широко распространены в человеческой популяции, они способны поражать практически все органы и системы организма-хозяина, вызывая латентную, острую и хроническую формы инфекции. Следует отметить возможную роль ВПГ-2 (в ассоциации с папавирусами, цитомегаловирусом, хламидиями или микоплазмами) в развитии неопластических процессов у человека, в частности рака шейки матки и рака предстательной железы (Бохман Я. В., Лютра У. К., 1991), индукции атеросклероза, где ВПГ, возможно, выступает в ассоциации с цитомегаловирусом; в неблагоприятном, а порой и фатальном влиянии этих возбудителей на течение беременности и родов, патологию новорожденности.

Важно подчеркнуть, что вирусы герпеса поражают эритроциты, тромбоциты, лейкоциты и макрофаги, способны длительно персистировать в организме, формируют нестерильный иммунитет (Баринский И. Ф. и др., 1986; Баринский И. Ф., 1988).

Особая актуальность проблемы герпесвирусных инфекций связана с появлением больных СПИДом. Показано, что вирусы герпеса могут активировать ВИЧ, находящийся в стадии провируса, и являются кофактором прогрессирования ВИЧ-инфекции и СПИДа (Рахманова А. Г. и др., 1990). В этой связи герпетическая инфекция является одним из важных СПИД-индикаторных заболеваний.

При герпесе, как и при других хронических заболеваниях с персистенцией вируса, развиваются иммунодефицитные состояния, обусловленные недостаточностью различных звеньев иммунной системы и ее неспособностью элиминировать вирус из организма. Сохраняющиеся в течение всей жизни, иногда в довольно высоких титрах, вируснейтрализующие антитела хотя и препятствуют распространению инфекции, но и не предупреждают возникновения рецидивов.

Спектр клинических проявлений ГИ отличается значительным разнообразием. Он зависит от локализации патологического процесса и его распространенности, состояния иммунной системы больного и антигенного типа вируса. Так, более тяжелое течение заболевания отмечается после первичного инфицирования, когда отсутствуют специфические антитела к вирусу герпеса, у детей раннего возраста с незрелой иммунной системой, при иммунодефицитных состояниях различного генеза (Баринский И. Ф. и др., 1986; Исаков В. А. и др., 1993).

Общепризнано, что лечение больных герпесом представляет довольно сложную задачу для практического врача, требует от него профессиональных навыков ведения таких больных, дифференцированного подхода в зависимости от клинической формы заболевания, а также от состояния иммунной системы пациента.

При лечении больных ГИ возникают определенные трудности как из-за отсутствия четкого понимания патогенеза заболевания, часто длительного (бессимптомного) и рецидивирующего течения, так и в связи с ограниченной доступностью высокоэффективных химиопрепаратов (высокая стоимость препаратов, перебои в снабжении) в широкой сети здравоохранения. В терапии ГИ используют противовирусные препараты, иммуномодуляторы, интерфероны и их индукторы, антиоксиданты в различных сочетаниях. Приходится констатировать, что даже комплексная терапия больных ГИ в части случаев, к сожалению, не предотвращает рецидивов болезни и не оказывает существенного влияния на их частоту (Коломиец А. Г. и др., 1988; Новицкий В. А. и др., 1987).

В настоящем руководстве обобщен многолетний личный опыт авторов, а также представлены мировые достижения в области патогенеза диагностики герпесвирусных инфекций (ГВИ). Надеемся, что данная работа будет полезна для врачей Различных клинических и лабораторных специальностей.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕРПЕСВИРУСОВ

СЕМЕЙСТВО

HERPESVIRINAE

ПОДСЕМЕЙСТВО

ALFAHERPESVIRINAE

РОД

SIMPLEXVIRUS

HSV-1

HSV-2

РОД

VARICELLAVIRUS

VZV

ПОДСЕМЕЙСТВО

BETAHERPESVIRINAE

РОД

CYTOMEGALOVIRUS

CMV

НЕКЛАССИФИЦИРОВАН

HHV-6

HHV-7

HHV-8

ПОДСЕМЕЙСТВО

GAMMAHERPESVIRINAE

РОД

LYMPHOCRIPTOVIRUS

VEB

Глава 1. ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

1.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕРПЕСВИРУСОВ

С

Учреди вирусных заболеваний ГВИ занимают одно из ведущих мест. Это обусловлено повсеместным распространением герпесвирусов (ГВ), многообразием клинических проявлений заболевания, как правило, хроническим течением и различными путями передачи возбудителя инфекции (Баринский И. Ф. и др., 1986).

ГВ объединены в обширное семейство *Herpesviridae* и в настоящее время наиболее строго классифицированы. Семейство *Herpesviridae* включает более 70 представителей, из которых для человека наибольшую патогенность имеют вирусы простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1, ВПГ-2), вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (ВОГ), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эшптейна — Барр (ВЭБ), вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), вирус герпеса человека 7-го типа (ВГЧ-7). Имеются сообщения об идентификации вируса герпеса человека 8-го типа.

Размер вириона герпесвирусов колеблется от 100 до 300 нм. Различные представители ГВ имеют ряд общих особенностей в строении вирионов. Для них характерна сферическая форма и наличие 4 структурных компонентов: сердцевины, капсида, внутренней оболочки (tegument), внешней оболочки (envelope). Сердцевина содержит линейную двунитчатую вирусную ДНК, молекулярная масса которой варьирует от $80 - 100 \times 10^6$ дальтон (вирус простого герпеса) до 145×10^6 дальтон (цитомегаловирус человека). В составе вирионов обнаружено более 30 белков (гликопротеидов), семь из которых (gB, gC, gD, gE, gF, gG и gX) находятся на поверхности и вызывают образование вируснейтрализующих антител. Шесть гликопротеидов входят в состав капсида. Многие десятки белков, в том числе тимидинкиназа, являются неструктурными и образуются в ходе жизненного цикла вируса. Среди других белков, характерных для ГВ,

следует назвать ДНК-полимеразу и белок, связанный с ДНК. Проникновение ГВ в клетку хозяина является сложным многоступенчатым процессом и включает в себя прикрепление вирионов к клеточным рецепторам, эндоцитоз и слияние мембран вирионов и клетки. В результате этого капсид освобождается от белков внешней оболочки, а комплекс ДНК-белок вируса проникает в ядро. Вирионная ДНК выходит в нуклеоплазму и здесь транскрибируется клеточной РНК-полимеразой. Различают сверхраннюю, раннюю и позднюю транскрипцию. В результате происходит ряд последовательных процессов: процессинг мРНК, синтез кодируемых продуктов и частичный обратный транспорт их в ядро, репликация ДНК и формирование дочерних молекул. Образовавшиеся в ядрах клеток незрелые капсиды путем почкования проникают через ядерную мембрану в цитоплазму, а в цистернах эндоплазматического ретикулама заканчивается формирование зрелых капсидов и внешней оболочки вируса с последующим транспортом к поверхности и выходом их из клетки (табл. 1).

Синтез вирусных белков, как показано в эксперименте, начинается через 2 часа после заражения, и максимальное их количество накапливается примерно через 8 часов. Инфекционные вирионы появляются через 10 часов и достигают наивысших титров через 15 часов. При этом существенно подавляется синтез собственных белков клетки. В репликации вирусной ДНК основную роль играют белковосинтетические структуры клеточной ДНК. Вместе с тем в ее осуществлении важное значение имеют вирусные гены и их продукты.

Вирусная ДНК, состоящая из 80 генов, подразделяется на подгруппы генов: а, b, g. Экспрессия этих групп генов и соответственно синтез кодируемых ими белков подвержены каскадной регуляции, а-гены — первая группа генов, которые транскрибируются РНК-полимеразой и не требуют для транскрипции присутствия синтезированных *de novo* белков. В настоящее время картирован ряд а-генов, изучены свойства кодируемых белков герпесвирусов. Так, например, а-белок ICP участвует в установлении латентного состояния ВПГ-1 и его реактивации, а белок ICP-4 необходим для экспрессии второй группы генов. Продукты b-генов — это вирусспецифическая ДНК-полимераза и тимидинкиназа, необходимые для биосинтеза ДНК ГВ. Другие b-белки выключают экспрессию генов клетки-хозяина и а-генов ГВ и иницируют работу третьей группы генов — g.

Таблица 1

Характеристика герпесвирусов человека и основных клинических форм инфекции

Герпесвирусы человека	Обозначение	Основные заболевания, ассоциированные с данным типом герпесвирусов
Вирус простого герпеса 1-го типа	ВПГ-1	Лабильный герпес Герпес кожи и слизистых Офтальмогерпес Геиитальный герпес Герпетические энцефалиты Пневмониты
Вирус простого герпеса 2-го типа	ВПГ-2	Геиитальный герпес Неонатальный герпес
Вирус Варицелла-Зостер (вирус опоясывающего герпеса)	ВВЗ(ВОГ)	Ветряная оспа Опоясывающий герпес
Вирус Эпштейна — Варр	ВДВ	Инфекционный мононуклеоз Нозофарингеальная карцинома Лиифома Веркита
Цитомегаловирус	ЦМВ	Врожденные поражения ЦНС Ретинопатии Пиевмонатии Гепатиты
Вирус герпеса человека 6 и 7 типов	ВГЧ-6 ВГЧ-7	Лимфотропные вирусы. Предполагают этиологическую связь ВГЧ-6 с внезапной экзантемой, а ВГЧ-7 — с синдромом хронической усталости
Вирус герпеса человека 8 типа	ВГЧ-8	Саркома Капоши у ВИЧ-серонегативных людей Саркома Капоши, ассоциированная с ВИЧ-инфекцией и СПИДом

Белки, кодируемые группой g-генов, являются структурными полипептидами вириона и в основном представлены мембранными гликопротеинами А, В, С, **В**, Е, Г, С которые играют важную роль в иммунопатогенезе ГВ. В исследованиях ИоггЩ В. продемонстрирована их важная роль в процессе проникновения ВПГ в клетку и в феномене симпластообразования. Например, гликопротеин Б (*gB*) несет группа- и типоспецифические антигенные детерминанты, являясь наиболее антигенно значимым белком. В ответ на иммунизацию **gD** образуются специфические антитела, отличающиеся высокой аффинностью и выполняющие основную роль в нейтрализации ВПГ. Другой

белок — gC представляет собой интерес, так как функционирует в качестве рецептора для C 3-фракции комплемента, блокируя альтернативный и классический пути активации комплемента и препятствуя лизису инфицированной ГВ клетки. Некоторые исследователи считают, что ВПГ-1 играет главную роль в адсорбции вируса на клетку и в инфекционности вируса. Гликопротеин Е способен связывать Gc-фрагмент иммуноглобулинов класса в (γ), препятствует осуществлению антителозависимого лизиса клетки-мишени.

Таким образом, гликопротеины ВГ экспрессируются в инфицированных вирусом клетках (в том числе и клетках иммунной системы), приводя к изменению их фенотипических свойств, т. е. трансформации. Трансформация клеток вызывает развитие определенных иммунопатологических реакций, направленных против собственного организма и являющихся одним из механизмов вирусиндуцированной иммуносупрессии. Таким образом ГВ могут приводить к развитию первичного иммунодефицита, но наиболее тяжелые клинические формы ГВИ наблюдаются у лиц с иммунодефицитными состояниями, обусловленными другими причинами, в том числе ВИЧ-инфекцией (Исаков В. А., Сафронова М. М., 1997).

До недавнего времени лабораторная диагностика ГВИ осуществлялась только в специализированных вирусологических центрах. Появление новых методов исследования в последнее десятилетие привело к расширению возможностей вирусологической диагностики ГВИ в практическом здравоохранении. Современные методы лабораторной диагностики ГВИ позволяют: получать результаты анализа в короткие сроки (часы, иногда — минуты), проводить и завершать анализ без выделения культуры вируса, используя только нативный материал; получать надлежащую достоверность анализа, учитывая высокую специфичность и чувствительность методов исследования.

Большинство методов лабораторной диагностики ГВИ основано на комплементарном, строго специфическом взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ), позволяя быстро обнаруживать вирусные АГ и АТ к ним в жидкостях организма. При этом многие из предлагаемых методов просты, удобны и воспроизводимы в больничных лабораториях, что позволяет увеличить возможность диагностики ГВИ в медицинских учреждениях различного профиля. Не меньшее значение эти ме-

тоды имеют и в эпидемиологической практике, способствуя оперативному эпидемиологическому анализу и формированию целенаправленных противоэпидемических мероприятий в очаге вирусной инфекции.

1.2. ПАТОГЕНЕЗ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Изучение патогенеза вирусных инфекций, в том числе и герпеса, показало, что могут быть различные формы взаимодействия вируса с организмом хозяина в зависимости от продолжительности пребывания возбудителя в последнем. Во-первых, в связи с непродолжительным присутствием вируса в организме инфекционный процесс может протекать либо в острой (короткий инкубационный период с последующим развитием характерных симптомов), либо в инapparантной (бессимптомной) форме. Второй тип взаимодействия обусловлен длительной персистенцией вируса в организме и проявляется тремя основными формами инфекции: латентной (бессимптомная персистенция возбудителя, при которой нарушается полный цикл репродукции вируса и он находится в клетках хозяина в виде субвирусных структур; считают, что может происходить репродукция зрелого вируса, с выделением его во внешнюю среду (Зуев В. А., 1988), либо хронической (персистенция вируса манифестируется клинической симптоматикой заболевания в течение длительного времени). Возможно развитие медленной вирусной инфекции, которая характеризуется длительным (месяцы и годы) инкубационным периодом с последующим медленным прогрессивным течением, с развитием тяжелых клинических симптомов и смерти больного. При этом необходимо иметь в виду, что формы с кратковременным и длительным (персистенция) пребыванием вируса в организме нередко тесно связаны между собой — одна форма инфекции переходит в другую (Зуев В. А., 1979, 1988).

Репродукция герпесвирусов в чувствительных клетках — сложный процесс, протекающий с участием многих вирионных, клеточных, вирусиндуцируемых и вирусомодифицированных энзимов.

Основными этапами развития герпетической инфекции являются: первичная инфекция кожи и слизистых, «колонизация» и острая инфекция ганглиев с последующим установлением

латентности, когда **только** вирусная ДНК, находящаяся в ядрах нейронов, свидетельствует о наличии инфекции. По окончании острой фазы инфекции, свободный вирус простого герпеса (ВПГ) более не обнаруживается в чувствительном ганглии. Механизмы, определяющие переход из острой фазы инфекции, когда вирус не удается обнаружить в гомогенатах ганглия, пока не выяснены. Этот переход **параллелен** развитию иммунных факторов: иммунная реакция хозяина уменьшает размножение вируса в коже, снимает сигнал, и клетки ганглия становятся непермиссивными — **устанавливается латентная** инфекция.

Обнаружение вируса **герпеса** в ганглиях **людей**, перенесших в прошлом инфекцию ВПГ, говорит о реактивации инфекции, **которая может протекать как бессимптомно**, так и с развитием поражений слизистых и кожи.

У людей бессимптомное течение, так же как и клинически выраженный **рецидив**, **наблюдается после** микронейрохирургического вмешательства на тройничном нерве. Реактивация ВПГ часто **встречается** также у лиц, получающих **иммунодепрессанты** (такие как **циклофосфамид**), например, после трансплантации органов или при УФ-облучении. Активизирующий эффект перечисленных и ряда других факторов неразрывно связан с нарушением **содержания в клетке циклоаденозинмонофосфата (цАМФ)**, **роль** которого велика в реализации разнообразных внутриклеточных процессов. В инфицированной ВПГ клетке резко снижается количество цАМФ. Нарушение **равновесия** между клеткой и ВПГ под влиянием провоцирующих факторов приводит к усилению репликации вируса, что клинически проявляется обострением. **Затем** между вирусом и клеткой устанавливается новое равновесие, и образование активного ВПГ прекращается до тех пор, пока какой-либо провоцирующий фактор снова не нарушает этого баланса (Ярославский В. К. и др., 1996).

Известны две альтернативные теории (гипотезы), предложенные для объяснения механизмов персистенции простого герпеса, которые допускают развитие рецидивов на основе статического либо динамического состояния вируса (БМГтап В., 1965). Согласно статической гипотезе, вирус герпеса находится в клетках паравертебрального сенсорного ганглия в интегрированном или свободном непродуктивном состоянии. Под влиянием «пускового фактора» вирус активизируется и перемещается из ганглия по аксону периферического нерва в эпители-

альные клетки, где реплицируется. Предполагается, что этому во многом способствуют восприимчивость клетки и ослабление иммунологического контроля.

Динамическая гипотеза предусматривает постоянную репликацию к выброс из ганглия небольших количеств вируса герпеса. Достигая по нерву кожи, ВПГ вызывают микрофокусы инфекции, сдерживаемые механизмами защиты, что предупреждает рецидивы или ослабляет их проявления. На развитие рецидивов оказывает влияние состояние местного иммунитета, угнетение которого способствует репликации достигшего кожи вируса.

Большое количество экспериментальных исследований на животных помогает изучить различные стороны проявления герпетической инфекции. Первичное инфицирование ВПГ вызывает латентную инфекцию спинальных и церебральных ганглиев, куда вирус попадает из входных ворот инфекции эндоневрально, периневрально, интрааксонально или по шванновским клеткам. Помимо нейрогенного пути распространения герпетической инфекции, большое значение имеет гематогенный путь ее распространения в результате выраженного эритропизма ВПГ, вследствие которого происходит заражение новых клеток. Кроме того, ВПГ тесно взаимодействует с лейкоцитами и даже тромбоцитами. При этом наблюдаются грубые повреждения хромосом и большие скопления антигена ВПГ в лейкоцитах.

Становление латентной инфекции связано со структурными изменениями в вирусном геноме. Это принципиально важное положение было установлено методами рестрикционного анализа и блоттинг-гибридизации с мечеными ^{32}P вирусными ДНК при сравнении вирионной ДНК эталонного ВПГ-1.

Немаловажную роль в патогенезе герпетической инфекции играет выведение ВПГ со слюной, мочой, калом. Явление вирусурии установлено еще в 1937 году Л. А. Зильбером.

Патогенез ЦМВИ не вполне выяснен. Источником инфекции является человек, который может инфицироваться ЦМВ в различные сроки жизни. Показано, что ЦМВ поражает клетки разных органов и систем, длительно персистирует в организме и периодически выделяется во внешнюю среду. Механизм развития ЦМВИ зависит от многих факторов — в частности, имеют значение пути заражения, индивидуальные (генетические) особенности макроорганизма, состояние иммунной системы в момент инфицирования. Инфекционный процесс при цитомегалии

реализуется в виде либо бессимптомной латентной инфекции, либо клинически манифестными локализованной или генерализованной формами.

Входными воротами для ЦМВ в ante- и интранатальном периодах могут быть повреждения плаценты, плодных оболочек и внешних покровов плода, дыхательные пути и пищеварительный тракт. Последние два пути проникновения вируса наблюдаются и в постнатальном периоде. Отмечено, что у беременных с латентной инфекцией плод поражается далеко не всегда. Для этого необходимо обострение заболевания у матери с развитием вирусемии и последующим инфицированием плода. Вероятность поражения ребенка будет значительно выше при первичном инфицировании матери во время беременности. Во время фазы вирусемии при отсутствии антител у матери (а следовательно, и у плода) передача вируса плоду осуществляется значительно легче, чем в иммунном организме ранее (до наступления беременности) инфицированной женщины.

Как отмечено выше, входными воротами ЦМВИ у детей и взрослых могут быть верхние отделы респираторного тракта; допускается возможность алиментарного инфицирования. Можно считать, что в этих случаях вирус внедряется в слизистые оболочки пищеварительного тракта. Каких-либо локальных изменений на месте входных ворот инфекции не отмечено. Вирус имеет выраженный тропизм к тканям слюнных желез; при локализованной форме он обнаруживается лишь в тканях слюнных желез.

Проникший в кровь ЦМВ репродуцируется в лейкоцитах и в клетках моноцитарно-макрофагальной системы (ММС) или персистирует в лимфоидных органах. Установлено, что проникший в клетки ММС вирус может вызвать в них абортивную инфекцию, сопровождающуюся экспрессией вирусных антигенов раннего типа и последующей блокадой поздних стадий репликации возбудителя. При экспериментах *in vitro* на фоне абортивной инфекции обнаружена депрессия фагоцитарной, окислительной и бактерицидной активности макрофагов, а также утрата Fc-рецепторов. Правда, имеются единичные сообщения о том, что проникновение ЦМВ в макрофаги не повреждает перечисленные функции, а иногда даже усиливает их.

В ответ на внедрение ЦМВ развивается иммунная перестройка макроорганизма. Переход латентной ЦМВИ в клинически выраженные формы обычно провоцируется какими-либо пато-

генетическими («ослабляющими») факторами — например, применением кортикостероидов, интеркуррентными заболеваниями, назначением цитостатиков и других иммунодепрессантов. При развитии врожденной или приобретенной иммунодепрессии, включающей резкое угнетение функций естественных киллеров (ЕК), вирусы выходят в жидкую среду и разносятся током крови в различные органы. Вирионы ЦМВ адсорбируются на клеточных мембранах и проникают в цитоплазму путем пиноцитоза или виропексиса, индуцируя цитомегалический метаморфоз клеток.

Особенно высокой чувствительностью к ЦМВ, как отмечалось, обладают клетки эпителия мелких протоков слюнных желез, преимущественно околоушных. ЦМВ, связанный с лейкоцитами крови (лимфоцитами, моноцитами), не только хорошо защищен от воздействия циркулирующих противцитомегаловирусных антител, но и способен к дальнейшей репродукции. Предварительная интерстициальная инфильтрация инициирует пролиферативную активность эпителия, в процессе которой, по-видимому, и совершается цитомегалический метаморфоз клеток.

В связи с этим следует упомянуть гипотезу, высказанную А. П. Самохиным (1987), в соответствии с которой инфицирование эпителия слюнных трубочек происходит в процессе трансэпителиальной миграции лимфоцитов и гистиоцитов. Возможно, цитомегалическое превращение пролиферирующих клеток эпителия осуществляется в условиях ассимиляции ими инфицированных продуктов лимфоцитарного распада или аутолиза, образующегося вокруг внедрившихся в эпителий сенсibilизированных Т-лимфоцитов. Р. П. Пьянов (1968) обнаружил в мозге гигантские цитомегалические клетки (ЦМК) с ядрами фагоцитированных клеток. Такого рода находки подтверждают высказанную гипотезу.

В последние годы появились убедительные доказательства в пользу того, что при хронических вирусных инфекциях может формироваться пожизненная иммуносупрессия. Это в первую очередь относится к больным СПИДом, которые в большинстве случаев погибают от вторичных инфекций, развивающихся на фоне ВИЧ-индуцированного иммунологического дефекта. По-видимому, список вирусов, вызывающих длительную иммуносупрессию, будет увеличиваться и, прежде всего, за счет возбудителей, которые обладают способностью длительно персистировать

в клетках иммунной системы. В полной мере сказанное относится к вирусам простого герпеса и цитомегалии. Иммунопатологические реакции при ЦМВИ весьма разнообразны и во многом определяют течение и исход инфекции.

При опоясывающем герпесе (ОГ) инфицирование вирусом реализуется воздушно-капельным путем. Проникновение вируса осуществляется путем его прикрепления к рецепторам плазматической мембраны клетки хозяина. В результате слияния с мембраной клетки вируса ОГ его оболочка и встроенные в нее белки становятся частью клеточной мембраны, а капсид, содержащий генетический материал, освобождается и проникает в цитоплазму, затем перемещается в ядро. За минуту в клетку проникает около 3000 вирусных частиц.

Вирусная ДНК транскрибируется в ядре, а трансляция информационных РНК, образующихся из транскриптов, происходит в цитоплазме. Репликация вирусной ДНК осуществляется в ядре, после чего она соединяется с незрелыми нуклеокапсидами. Способность вируса инфицировать клетки развивается по мере приобретения капсидами оболочки в результате почкования через внутренние ламеллы ядерной мембраны. Выход вирусных частиц осуществляется путем их транспорта к поверхности клетки через модифицированный эндоплазматический ретикулум.

Размножение вирусов простого и опоясывающего герпеса происходит в полиморфноядерных лейкоцитах и моноцитах, что вирусу защиту от факторов гуморального иммунитета и создает реальные предпосылки для последующей диссеминации (Баринский И. Ф. и др., 1986). Вирус ОГ (ВОГ) обнаруживается также и в эритроцитах, в которых образуются включения.

Макрофаги периферической крови, печени, селезенки, синусов костного мозга, лимфоузлов, плевральной и перитонеальной полостей, соединительной ткани, респираторного тракта способны, по мнению ряда авторов, поглощать как свободные вирусные частицы, так и частицы, связанные с клетками крови, однако при этом полностью элиминировать ВОГ они способны не всегда, в связи с чем создаются условия для персистенции ЮГ (Коломиец А. Г. и др., 1992). Показано, что более половины случаев заболевания ОГ приходится на пациентов старше 50 лет. Известно, что реакции гуморального иммунитета не являются определяющими в борьбе с рецидивами ОГ и лишь частично защищают от экзогенного вируса. Риск реакти-

вации ЮГ резко возрастает у лиц с заболеваниями или состояниями, сопровождающимися развитием иммунодефицитов различного генеза.

В клинике ОГ серьезное значение имеет синдром постзостерной невралгии (ПЗН), патогенез которого остается нераскрытым. Многие авторы указывают на постинфекционный иммуноопосредованный механизм развития ПЗН, т. е. когда ВОГ уже не обнаруживается и нет его прямого деструктивного воздействия на нейроны, а патологические изменения обусловлены иммунным ответом организма. Вируснейтрализующие антитела к белкам оболочки ВОГ в части случаев перекрестно реагируют с основным белком миелиновых оболочек, что лежит в основе постинфекционной демиелинизации (Уманский К. Г. и др., 1992). Показано, что ПЗН нечувствительна к антивирусной терапии, но хорошо купируется при использовании противогерпетических иммуноглобулинов направленного действия. Это отрицает участие вируса в генезе ПЗН и подтверждает роль иммуноопосредованных механизмов. Особенно прогностически неблагоприятным является угнетение клеточно-опосредованных иммунологических реакций, т. к. риск активизации ВОГ существенно возрастает. Так, в частности, показано, что чем дольше происходит нормализация Т-клеточного звена иммунитета, тем длительнее острая зостерная боль (Ндѣа К. еl al., 1992).

1.3. ИММУНОЛОГИЯ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Вначале необходимо кратко напомнить основные этапы реализации иммунного ответа при вирусных инфекциях. Иммунная система человека состоит из следующих звеньев: Т- и В-клеточного звена, факторов неспецифической резистентности. Т-звено представлено так называемыми тимус-зависимыми лимфоцитами $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$, которые вследствие антигенного раздражения активируются и становятся эффекторами и индукторами. В-клетки — представители В-коммитированного ростка костного мозга, выполняющие после взаимодействия с антигеном роль специфических продуцентов иммуноглобулинов основных классов (ГѐО, М, А, Е, О). Факторы неспецифической резистентности — клеточные и секреторные эффекторы т. н. врожденного иммунитета (неадаптивного иммунитета): клеточные компоненты врожденной системы

иммунитета происходят из плюрипотентной стволовой гемопоэтической клетки, основными представителями которых являются тканевые макрофаги, клетки Лангерганса, гранулоциты и НК-клетки. Секреторные продукты указанных выше клеток способны дистантно оказывать модулирующий эффект в отношении патогенных возбудителей, трансформированных и здоровых клеток хозяина. Это прежде всего целый ряд ферментов (катепсины 6, Б, Е, в; фосфолипазы А2, Б, С, фосфатазы; матриксные металлопротеазы и другие), опсонинов (компоненты комплемента; маннозо-связывающий белок; С-реактивный белок и другие пентраксины), цитокинов (ИЛ-1, 2, 4, 5, 6, 10, 12; ФНО α , В, лимфотоксин В) и антицитокинов (растворимые рецепторы: ИЛ-211В, ИЛ-4, ИЛ-3, ГМ-КСФ, ИЛ-6, ФНО-Ш, ФНО-Ш1 и другие; антагонисты: ИЛ-1га, ИЛ-482 и другие), а также вазоактивных биологически активных веществ (гистамин, простагландины, лейкотриены, тромбоксаны и другие).

Врожденный (неадаптивный) иммунитет

Макрофаг (резидентная тканевая форма клеток миеломоноцитарного ряда) — один из главных эффекторов неспецифической тканевой реакции. Он процессирует поглощенный антигенный материал (в ходе фагоцитоза или рецептор-опосредованного эндоцитоза), расщепляя его до пептидов, подходящих для эффективного взаимодействия с молекулами МНС I и II классов, с тем чтобы впоследствии после экспрессии на мембране участвовать в активации специфических Т-клеток (феномен «двойной рестрикции»: активация Т-клеток происходит только при одновременном узнавании антигенного эпитопа на фоне своего МНС-антигена).

Макрофаг участвует в формировании компонентов комплемента (С2-С5), необходимых в цитолизе и образовании иммунных комплексов. Макрофаги синтезируют факторы, важные для дифференцировки гранулоцитов (М, ГМ-КСФ, ИЛ-3 и другие), а также выделяют группу медиаторов, стимулирующих их активность и активность Т- и В-лимфоцитов (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ-10 и другие). Эффекторная роль макрофага заключается в фагоцитозе. При незавершенном фагоцитозе внутриклеточные инфекционные агенты, в частности частицы ВПГ, имеют возможность для внутриклеточного персистирования, при котором вокруг вириона могут образовываться дополнительные мемб-

равные оболочки за счет компонентов самой клетки-фагоцита. Так в очаге инфекции возникают зрелые, преимущественно внеклеточные формы ВПГ, которые обладают инфекционностью и обуславливают высокую контагиозность заболевания. Позже с вирусными частицами взаимодействуют лимфоциты, размножение в которых вируса вызывает образование вирусспецифического антигена.

Вирус, попав в организм, чаще распознается как «чужое» макрофагами. После процессинга вирусных антигенов иммунные вирусные эпитопы появляются на мембране макрофага в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС — Major Histocompatibility Complex) — МНС I и II класса: при этом вирусные антигены представляются в виде пептидов длиной 8 - 10 или 15 - 25 аминокислот, соответственно. Специфические $CD4^{+}$ Т-клетки могут узнавать чужеродные антигенные МНС-II детерминанты только в комплексе с молекулами МНС II класса (феномен «двойной рестрикции», см. выше). В ходе активации Т-клеток известны следующие стимулирующие сигналы: первый сигнал — паракринный эффект ИЛ-1 макрофагов на Т-клетки; второй сигнал — $CD80/CD86$ мембраны макрофагов взаимодействуют с $CD28$ Т-клетки; третий сигнал — взаимодействие молекул ко-стимуляции: $CD2:CD58$, $CD54:CD11a/CD18$ и другие (Janeway Ch. A., P. Travers, 1996). В результате указанных процессов $CD4^{+}$ клетки активируются и выделяют специфические цитокины, характерные для двух функциональных классов Т-клеток (табл. 2).

НК-клетки, как полагают, являются близкими родственниками цитотоксических Т-клеток, т. к. они, очевидно, образуются после формирования коммутированной лимфоидной стволовой клетки и в непосредственной близости к Т-клеточному пути развития. НК-клетки не образуют специфических TCR и BCR, однако функцию распознавания клеток мишеней они реализуют через другие взаимодействия: а) выработку ИФН α , β , γ ; б) ИЛ-12; в) перфориноподобных молекул, а также через участие в процессах рецептор-опосредованной клеточной цитотоксичности.

Функцию регуляции активности НК-клеток осуществляют две основные группы рецепторов: KIR (Killer inhibitory receptor — киллер ингибирующий рецептор) и KAR (Killer activation receptor — киллер активирующий рецептор), которые могут узнавать аллельные формы молекул МНС I класса.

Таблица 2

Влияние основных цитокинов на CD4⁺ Т клетки*

Свойства цитокинов	Т1 клетки	Т2 клетки
Секреция цитокинов		
Интерферон γ	+++	—
ФНО α	+++	+
ФНО β	+++	—
ИЛ-2	+++	+
ИЛ-3	++	+++
ИЛ-4	—	+++
ИЛ-5	—	+++
ИЛ-6	+	+++
ИЛ-10	+	+++
ИЛ-13	+	+++
ГМ-КСФ**	++	++
ТФР β ***	—	++
Регуляция цитокинами		
ИЛ-2	стимуляция	стимуляция
ИЛ-4	подавление	стимуляция
ИЛ-10	подавление	подавление
Интерферон γ	стимуляция	подавление
Цитолитический потенциал		
Сумма цитокинов	+++	—
Регуляция синтеза иммуноглобулинов		
ИгЕ	—	+++
ИгМ, ИгG, ИгA при низких Т: В клеточных отно- шениях	+++	++
при высоких Т: В клеточных отно- шениях		+++

Примечания: * — Копицаии Б. *e1al.*, 1994; ГМ-КСФ** — гранулоцит-моноцитарный колониестимулирующий фактор; ТФР (5*** — трансформирующий фактор роста Р; (+/-) — степень выраженности признака.

Кроме того, выделяется отдельно рецептор NKR-P1 (CD161), который может активировать НК-клетки. НК-клетки занимают лизисом вирусинфицированных и трансформированных клеток.

Как известно, одним из достоверных маркеров НК-клеток является молекула CD16 (вместе с $CD56^+$; $CD57^+$; $CD2^+$; $CD8^+$, CD3), которая является низкоафинным Fc γ III для IgG, что позволяет НК-клеткам участвовать в антителоопосредованной клеточной цитотоксичности. Более того, в последнее время были открыты три новых гена структурно родственных Fc-рецепторам (Fc γ RII и Fc α R) и KIR, которые называются иммуноглобулиноподобными транскриптами (immunoglobulin-like transcript, ILT): по крайней мере, ILT2 является рецептором для некоторых HLA-A, B и G молекул. Возможность взаимодействия с другими классическими MHC-I или MHC-I подобными молекулами — CD1, MICA, MICB (Parmer E. L., Zevine K., 1996) и другими белками в настоящее время находится в стадии изучения.

Приобретенный (адаптивный) иммунитет

1. Клеточный иммунитет

Клеточный иммунитет опосредуется клетками специфической и неспецифической защиты: специфические — Т-лимфоциты хелперы ($CD4^+$) и специфические «клетки-киллеры» — цитотоксические $CD8^+$ Т-лимфоциты. Это наиболее специализированные клетки, уничтожающие вирионы, а также пораженные вирусом клетки. Неспецифические — это макрофаги и ЕК-клетки.

Функция факторов клеточного иммунитета связана с подавлением репликации вируса, миграцией и удержанием макрофагов, лимфоцитов и воспалительных клеток в очаге воспаления.

Кроме того, компоненты клеточного иммунитета вызывают лизис инфицированных клеток и высвобождают внутриклеточный вирус для последующей нейтрализации антителами, а также оказывают влияние на соседние нормальные клетки, предупреждая их инфицирование (выработка интерферонов приводит к повышению синтеза MHC-I, C2 и C4 компонентов комплемента, лимфотоксина и других).

Прямая цитотоксичность обусловлена непосредственным контактом Т-киллеров с поверхностью инфицированных клеток, распознаваемых благодаря наличию у них вирусспецифических мембранных антигенов (Коломиец А. Г. и др., 1992; Rusell A. S., Mulber C, 1984).

Специальные исследования состояния клеточного иммунитета у больных рецидивирующим герпесом показали его неполноценность и в межрецидивном периоде. Активность клеточного иммунитета является определяющим фактором в предупреждении развития заболевания, а также выздоровлении организма в процессе данной инфекции. Значение клеточного иммунитета в резистентности при ГИ отчетливо заметно у лиц с врожденным дефектом Т-системы иммунитета, при тимусэктомии, облучении, тяжелых вторичных иммунодефицитных состояниях (СПИД, онкопатология), иммуносупрессивной лекарственной терапии и т. п.

Т-клеточное звено представлено двумя основными субпопуляциями лимфоцитов — $CD4^+$ (в периферической крови составляют 2/3 Т-клеток) и $CD8^+ TCR^+$ (T-cell receptor — Т-клеточный рецептор).

По современным представлениям, $CD4^+$ Т-клетки человека могут быть разделены на два основных функциональных фенотипа (по аналогии с мышинными Т-хелперами): Т-хелперы 1 типа (Т_H1, Т-клетки воспаления) и Т-хелперы 2 типа (Т_H2, собственно Т-хелперы) (см. табл. 2). Ряд исследователей выделяют Т_H3-клетки, которые были впервые описаны у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом при оральной презентации антигена: показано, что эти клетки преимущественно образуют трансформирующий фактор роста В (ТФРР-TGFP), который является мощным ингибитором Т_H1-клеток при местном воспалении, в частности в мозге больных мышей, что лежит в основе наблюдающейся картины регресса основных признаков воспаления.

Основным критерием разделения Т-хелперов является их участие в индукции преимущественно клеточного (Т_H1) или гуморального (Т_H2) иммунного ответа (см. табл. 2). Определяющим в индукции того или иного класса Т_H-клеток является некая комбинация молекул ко-активации, экспонируемых антиген презентирующей клеткой, и цитокиновый сигнал, получаемый Т-хелпером. Так, например, известно, что сигнал через CD28 молекулу Т-хелпера при ее взаимодействии с B7-1 /

В7-2 молекулами антиген презентирующих клеток (АПК) ведет к пролиферации Т_Н и Th2 клеток. Кроме того, для Т_Н клеток сигнал через CD28 приводит к синтезу интерферона γ , но не ИЛ-4 в Th2 клетках, что обусловлено наличием в промоторе гена интерферона γ CD28 отвечающего элемента, которого нет в промоторе гена ИЛ-4. Однако, в последнее время появились работы по индукции синтеза ИЛ-10 CD4⁺ Т-клетками-продуцентами интерферона γ (ИФН): в модели активации периферических Т-клеток человека ИЛ-12 вместе с сигналом через CD80/CD86-CD28 вызывал подобный эффект у CD45⁺ Т-клеток памяти (Peng X. et al., 1997); кроме того молекула SLAM (CDw 150) может индуцировать при TCR-зависимой активации Th-клеток, которые после этого становились Th0 клетками, а в окружении ИФН γ могли бы созреть в Т_Н фенотип (Cocks B. G. et al., 1995). Помимо основных молекул ко-стимуляции есть и другие: взаимодействие CD45⁺ или LFA-1 эффективно ко-стимулировало продукцию Т_Н клетками интерферона γ и не имело эффекта при связывании CD45⁺ или CD45⁺ Ж) изоформ. Напротив, взаимодействие CD45⁺ RA индуцировало в отдельных случаях синтез Th2 интерферона γ (Shenafelt M. C. et al., 1995). Таким образом, представляется, что Т_Н функциональный класс более жестко контролируется, чем Th2.

Знание механизмов изолированной стимуляции и подавления Т_Н и Th2 клеток может быть использовано практически. Например, известно, что ИЛ-4 и ИЛ-5 участвуют в индукции синтеза IgE у лиц с аллергическими заболеваниями. Зная, что Th2 клетки подавляются цитокинами Т_Н клеток, можно будет в определенных случаях достичь толерантности к аллергену.

CD8⁺ Т-лимфоциты представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которую также можно разделить на клетки-индукторы и клетки-эффекторы: первые синтезируют преимущественно Т_Н-подобный профиль цитокинов (Тe1 клетки, Тс-цитотоксические), а вторые — Тп2-подобный профиль (Тс2 клетки) (табл. 3); точно так же выделяются CD8⁺ Т-клетки с Th3-подобным профилем цитокинов (Janeway C. A., Travers P., 1996).

Специфическое действие CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов опосредуется через выделение перфоринов, гранзимов А и В, мембраноконтактные сигналы через Fas (CD95): FasL, mTNF (n⁺НО)-TNF RI/II типа, выделение цитокинов — ФНО α и ФНО В, ИФН γ , ТФР В.

Превалирующим цитокиновым профилем CD8^+ Т-клеток является Т_Н-подобный: в первую очередь ИФН γ , ФНО α и ФНО β , которые обладают выраженным стимулирующим эффектом в отношении макрофагов и ЕК-клеток. Указанная фенотипическая доминанта объясняется тем, что уже в ходе дифференцировки наивные CD8^+ Т-клетки (до антигенной стимуляции) предрасположены к образованию Тс1-клеток. В отношении же основной эффекторной функции CD8^+ -клеток — цитотоксичности — известно, что Тс2-клетки менее эффективны, хотя подобно Тс1-клеткам, это действие реализуется через перфорин- и FasL-зависимые пути.

В силу приведенных особенностей секреции Тел1 и Тс2-клетками цитокинов представляло интерес оценить их способность влиять на В-клетки и продукцию ими иммуноглобулинов: предполагалось, что CD8^+ Т-клетки непосредственно лизируют В-клетку-мишень, однако здесь интересен описанный *in vitro* механизм «обходной хелперной помощи»: так, в частности, стимуляция иммобилизованными анти-СД3-антителами вызывала фокусирование литической активности Тс2-клеток на стороне контакта с пластиком, а со свободной стороны открыва-

Таблица 3

**Биологические эффекты цитокинов в отношении
Т-цитотоксических клеток***

Цитокины	Т-цитотоксические (Тс) клетки	
	Тс1-клетки	Тс2-клетки
Интерферон γ	+++	-
ИЛ-2	+++	-
ИЛ-4	-	+++
ИЛ-5	-	+++
ИЛ-6	+	+++
ИЛ-10	+	+++
ФНО α	+++	+++
ФНО β	+++	+++
ИЛ-3	+	++
ГМ-КСФ	++	++

Примечание: ГМ-КСФ — гранулоцит-моноцитарный колониестимулирующий фактор; (+/-) — степень выраженности признака.

лась возможность контакта с В-клеткой через CD401.-CD40 (сигнал на переключение с IgM на IgG) и возможность секреции при этом ИЛ-4, 5,6 и 13. По силе же хелперной активности Т-клетки располагаются следующим образом: Th2 > Т_Н > Тс2 > Тe1. Таким образом, в отношении В-клеток основным эффектом CD8⁺ Т-клеток следует расценивать литический, направленный против инфицированных В-клеток, а со стороны CD4⁺ Т-клеток — хелперный эффект (Mosmanu T. R. et al., 1997).

Подобно сложным взаимоотношениям в системе Th1-Th2, Тс 1-клетки могут влиять на активность Тс2-клеток, и наоборот. В частности, крайне важно то, что ИЛ-4 Т_Н2/Тс2-клеток подавляет способность Тс1-клеток синтезировать ИЛ-2 (и другие Т_Н-цитокины) и пролиферировать под его действием в ответ на антигенную стимуляцию, не влияя на их цитотоксичность. Однако ИЛ-2 Т_Н клеток или экзогенный ИЛ-2 способен оказывать пролиферативный эффект на такие Тс 1-клетки. Таким образом, выстраивается некая система сбалансированности фенотипов CD8⁺ эффекторов (Masmanu T. R. et al., 1997).

Важным звеном персистентных вирусных инфекций является снижение факторов специфической и неспецифической иммунологической реактивности организма. Предположение о супрессивном действии вирусных инфекций на иммунитет было высказано в начале нашего века. Использование современных методов молекулярной иммунологии для изучения особенностей развития иммунодефицитных состояний при вирусных инфекциях позволило выделить 4 основных механизма формирования иммуносупрессии (Вотяков В. И., Коломиец А. Г., 1991):

1. Прямое действие полной или abortивной репродукции вируса на структурную и функциональную полноценность лимфоцитов: вирусы группы герпеса на Т-, В-лимфоциты, макрофаги, ЕК-клетки. В результате такого влияния вируса может определяться в части случаев полное разрушение (лизис) лимфоцита либо снижение его функциональной активности вплоть до полной ее утраты. Некоторые вирусы оказывают описанное выше действие на все типы лимфоцитов, другие разновидности вирусов (ВПГ, ВИЧ и других) — лишь на определенные субпопуляции лимфоцитов (табл. 4).

Важно, что у лиц с ИДС при ГИ имеется «двойной» иммунодефицит (ГИ в сочетании с онкозаболеванием, СПИДом и прочее), очевидно, вследствие синергизма иммуносупрессивных факторов.

Таблица 4

Вирусы, оказывающие прямое действие на лимфоциты
(цит. по А. Г. Коломиец и др., 1992)

Вирус	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	К-клетки	Макрофаги
Кори	+	+	+	
HTLV-I	+	±		
ВИЧ-I и 2	+			+
ЦМВ	+	+	+	+
ВЭВ	+	+		
ВПГ	+			+

Примечание: НТЛУ-1 — человеческий Т-лимфотропный вирус I типа; ВИЧ-I и 2 — вирусы иммунодефицита человека I и 2 типа; ЦМВ — цитомегаловирус; ВЭВ — вирус Эпштейна — Барр.

2. Угнетающее воздействие на иммунную систему растворимых факторов (вирусного или клеточного происхождения), освобождающихся из поврежденных клеток.
3. Результат инфицирования и повреждения клеток, ответственных за фагоцитоз, вирусами, поражающими макрофаги (ВПГ, ЦМВ, ВГЧ-6, ВИЧ, полиовирус, оспенная вакцина, денге и другие).
4. Дисбаланс регуляции иммунной системы как следствие развития любого из трех указанных выше механизмов иммуносупрессии.

Представляют интерес новые данные об иммунодепрессивном действии ВПГ (Koelle D. M., Carey Z., 1995):

Ж. Уменьшение экспрессии HLA I на пораженной клетке

1. «Белок вириона, включающий синтез белков хозяина» — он неспецифически снижает синтез белков хозяина и таким образом перестраивает его на синтез вирусных белков; белок попадает непосредственно после проникновения ВПГ в клетку.
2. Второй белок — белок ICP 47 производится в очень «раннюю» фазу репликации ВПГ, который, очевидно, связываясь с одним из TAP белков (это белки, ассоциированные с транспортом процессированного антигена), предотвращает вновь синтезированные молекулы HLA I от созревания в эндоплазматическом ретикулуме, т. е. нагрузке молекулы HLA I вирусными пептидами.

Таким образом, сниженная экспрессия HLA I на инфицированной клетке приводит к менее напряженному анти-ВПГ специфическому CD8-ответу.

//. Неспецифическая иммунодепрессия

1. Гликопротеины ВOTgE и gI могут непосредственно связываться с Fc-частью IgG. Таким образом, когда антитело связано со своим антигеном на пораженной клетке (или на вирионе), то экранирование Fc-у приводит к ослаблению опсонизации.
2. Гликопротеин gC может связываться с C3-компонентом комплемента, таким образом предотвращая активацию комплемента по альтернативному и классическому пути.
3. ВПГ подавляет функцию макрофагов.

Часть Т- и В-клеток после начальной активации, происходящей под влиянием антигена, не дифференцируется дальше, а длительно сохраняется в организме, обеспечивая так называемую иммунологическую память. В результате при повторном попадании антигена в организм в нем развивается более быстрый и интенсивный вторичный иммунный ответ в отличие от первичного ответа, описанного ранее.

Имеется достаточное число сообщений о нарушениях иммунологической реактивности при разных клинических формах ЦМВИ. Так, при обследовании 18 взрослых больных, у 14 из которых диагностировали синдром инфекционного мононуклеоза, а у 4 — функциональные нарушения печени, у всех больных выявляли угнетение реакции лимфоцитов на конканавалин А, митоген лаконоса и на такие распространенные антигены, как туберкулин, кандидин, антигены вируса эпидемического паротита и простого герпеса. Однако полиферативный ответ на ФГА не был изменен. Иммуносупрессия сохранялась в течение 50 дней после выявления клинических симптомов болезни, и уровень активности лимфоцитов не достигал исходного даже через 250 суток. В связи с этим авторы говорят о наличии связи угнетения функции лимфоцитов с повышением чувствительности реконвалесцентов к гетерологичным инфекционным агентам. Наряду с этим лимфоциты больных и реконвалесцентов четко реагировали на ЦМВ человека *in vitro* с последующим формированием вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

ЦМВИ может играть важную роль в патогенезе иммунологической недостаточности. Вирусы из группы герпеса относятся

к числу патогенов, способных индуцировать ГЗТ, морфологическая картина которой характеризуется лимфоидно-макрофагальной инфильтрацией органа или ткани (Струков А. И., Грицман А. Ю., 1978; Серов Н. В., 1982). Иммунный ответ при вирусных инфекциях направлен не только против свободных вирусов, циркулирующих в крови или в других жидкостях, но и против зараженных клеток хозяина (Семенов Б. Ф., 1983).

Как отмечалось, в противовирусной защите организма участвуют четыре системы клеток: цитотоксические Т-лимфоциты, ЕК-клетки, макрофаги и В-лимфоциты (и плазматиты). В опытах на мышах было показано, что ЦМВ обладает высокой патогенностью для мышей-сосунков. При заражении взрослых животных летальность существенно снижена. Вирус выделяют до 8 дней из печени, где развиваются очаговые некрозы. Он сохраняется пожизненно и в слюнных железах инфицированных особей. Показана способность ЦМВ инфицировать В-клетки, Т-лимфоциты и макрофаги, а также неидентифицированные моноклеарные клетки в селезенке мышей. Отмечена супрессия на фоне индукции первичного, но не вторичного иммунного ответа на ВЭБ, а также констатировано угнетение пролиферативной активности лимфоцитов, которое коррелировало с тяжестью клинических симптомов. Наибольшей чувствительностью к ЦМВ обладают мыши, в крови которых обнаружен дефект естественных киллеров. Существованием дефекта в клеточном звене иммунитета объясняют длительную персистенцию ЦМВ в присутствии специфических антител.

При работе с культурой периферических моноклеарных клеток крови человека добавление ЦМВ сопровождалось подавлением цитотоксической функции ЕК только в том случае, когда в культуре периферических моноклеарных клеток находились моноциты. Таким образом, было установлено, что развитие одного из типов супрессии, обусловленной ЦМВ, реализуется через моноциты. Накапливаются данные о прямом действии ЦМВ на регуляторные Т-клетки, что ведет к нарушению синтеза и способности взаимодействовать с ИЛ-2. На большее значение клеточного иммунитета в возникновении ЦМВИ указывали Г. И. Савицкий и др. (1984). Они выявили корреляцию между экскрецией ЦМВ и показателями клеточного иммунитета: около 1% здоровых взрослых выделяют ЦМВ с мочой. Показано, что такого рода латентная инфекция

наблюдается у людей, в организме которых имеется дефект клеточного звена иммунитета (Демидова С. А. и др., 1982).

Описанные наблюдения у взрослых ЦМВИ, выявленной морфологическими методами, свидетельствуют о полиорганных поражениях при этом заболевании. В настоящее время ЦМВИ отнесена к группе инфекций, являющихся индикаторами иммунологической недостаточности.

На основании изложенного можно считать, что особенности распространения ЦМВИ среди взрослых объясняются отсутствием у них характерного для детей раннего возраста периода физиологической иммунологической недостаточности, связанного с созреванием органов иммуногенеза. ЦМВИ у взрослых встречается преимущественно как позднее осложнение злокачественных опухолей, хронических воспалительных процессов, а также у больных после трансплантации органов или гемотрансфузий, приема цитостатических и кортикостероидных препаратов. Указанные факторы не только вызывают реактивацию латентной инфекции, но и повышают чувствительность тканей к экзогенному заражению ЦМВ. В этих условиях ЦМВИ может быть второй болезнью, обуславливающей летальный исход.

В настоящее время стало очевидным, что вирусные инфекции сопровождаются существенными нарушениями регуляции иммунного ответа, в основе которых лежат повреждения системы интерлейкинов. Эти повреждения могут быть двоякими. В одних случаях нарушается (обычно — подавляется, реже — усиливается) способность инфицированных иммунокомпетентных клеток синтезировать интерлейкины; в других — меняется реакция клеток-мишеней на интерлейкины.

Показано, что инфекции, вызванные ВПГ-2, ЦМВ мышей и человека, сопровождаются угнетением синтеза ИЛ-1 и ИЛ-2. Одним из возможных механизмов подавления синтеза ИЛ-1 может быть появление в системе, зараженной вирусом, простагландинов, которые, как хорошо известно, ингибируют образование данного медиатора.

Механизмы подавления синтеза ИЛ-2 при вирусных инфекциях пока остаются недостаточно изученными. По-видимому, речь идет не об одном, а о нескольких типах ингибирования. Не удалось обнаружить прямого влияния на образование ИЛ-2 спленоцитами, зараженных ЦМВ.

В ряде сообщений описано, что вирусная инфекция ассоциируется с потерей способности Т-лимфоцитов экспрессировать

рецепторы, связывающие ИЛ-2. Изменяются функции клеток ММС при разных вирусных инфекциях.

Показана возможность размножения ЦМВ в Т- и В-лимфоцитах, а также в макрофагах человека. Так, инфекционный ЦМВ может быть выделен из клеток крови у больных с выраженной клиникой инфекционного мононуклеоза и пациентов в стадии реконвалесценции. Вирусную РНК обнаруживали в Т-хелперах и $CD8^+$ клетках в отдаленные сроки реконвалесценции. Следовательно, не только клетки ММС, но и Т-лимфоциты могут выступать в качестве резервуара вируса, в котором он оказывается защищенным от эффекторных механизмов иммунной гибели хозяина.

Представляет интерес информация о тропизме вирусов к разным клеткам иммунной системы. Эти данные говорят о том, что все рассматриваемые вирусы вступают в прямое взаимодействие с иммунокомпетентными клетками хозяина. Функции зараженных вирусом клеток нарушаются избирательно, а не по принципу *все или ничего*.

Следует отметить, что иммуносупрессивным действием обладают крупные иммунные комплексы. Они повреждают способность макрофагов и нейтрофилов фагоцитировать и выделять продукты окисления. Мелкие комплексы, образующиеся при избытке антигена или антител, иммуномодулирующим действием не обладают. Таким образом, ЦМВИ и иммунологическая недостаточность — проблемы взаимосвязанные и взаимообусловленные.

В последнее время в литературе сформировалось понятие о «вирусиндуцированной антигеннеспецифической иммуномодуляции» (ВАИ), под которой понимают явление, характеризующееся тем, что иммунная система зараженного организма меняет характер (в количественном плане) ответа на неродственные — по отношению к инфекционному агенту — антигены (Семенов Б. В., Варгин В. В., 1989). Эти изменения выявляются как при экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*. Они проявляются в виде антигеннеспецифической супрессии или усиления. ВАИ является обязательным компонентом патогенеза любой экспериментальной инфекции и вирусного заболевания человека. Вирусиндуцированная супрессия иммунного ответа или его усиление затрагивает реакцию хозяина на различные патогенные микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы или простейшие), поэтому ВАИ должна учитываться при

изучении классических проявлений болезней вирусной этиологии и при сероэпидемиологическом анализе.

ВАИ нарушает механизмы иммунологического надзора, что может привести к развитию онкологических заболеваний. ВАИ лежит в основе ряда иммунопатологических процессов, таких как образование иммунных комплексов, запуск аутоиммунного ответа и т. д. С ВАИ связывают повреждающее действие различных вакцинных препаратов. Исследование ВАИ открывает перспективу для создания нового подхода к терапии вирусных инфекций — разработке метода коррекции вирусиндуцированных вторичных иммунодефицитных состояний, что должно привести к предупреждению или смягчению иммунопатологических реакций и профилактике вторичных инфекций, вызываемых неродственными возбудителями.

2. Гуморальный иммунитет

Иммуноглобулин — один из важнейших компонентов иммунной системы. Иммуноглобулины являются растворимыми белками сыворотки крови, относятся к фракции гамма-глобулинов и выполняют функцию специфических антител. Различают пять основных классов иммуноглобулинов: $I\alpha A$, М, Е, В и В, различающиеся по биологическим и физическим свойствам (табл. 5).

Иммуноглобулины могут быть мономерами, состоящими из одной субъединицы ($I\epsilon T^>$, $I\epsilon(3\epsilon$ и $I\epsilon III$, или полимерами, которые включают в свою молекулу от двух до пяти субъединиц. Так, сыворотки построен из пяти мономеров, а $\wedge A$ может быть мономерным, димерным или полимерным. Причем молекулы иммуноглобулинов с полимерной структурой содержат дополнительную полипептидную «1-цепь, которая удерживает мономеры вместе (Тотолян А. А. и др., 1996).

Цельная молекула иммуноглобулина состоит из трех фрагментов: двух $Г\alpha B$ -фрагментов, активные участки которых связываются с двумя антигенами, а также $Г\epsilon$ -фрагменты, обеспечивающего связывание иммуноглобулина с $Г\epsilon$ -рецепторами на поверхности клеток (в частности лейкоцитов) и с компонентом.

Иммуноглобулин γ составляет около 75% всех иммуноглобулинов или 12 - 13% белка сыворотки крови человека. Важно, что у человека имеется 4 подкласса $I^{\wedge} (I\epsilon 01 - I^{\wedge} 4)$, основные характеристики которых представлены в табл. 6.

Таблица 5

**Характеристика классов
иммуноглобулинов***

Характеристика	Классы иммуноглобулинов				
	да	1«А		ад»	да
Молекулярная форма	моно-мер	моно-мер, димер ИТ. д.	пента-мер	моно-мер	моно-мер
Количество иод-классов	4	2	2 (воз-можно)	нет	нет
Молекулярная масса (дальтон)	150000	160000	950000	175000	190000
Содержание от общего количества иммуноглобулинов в сыворотке (%)	75 - 85	7 - 15	5 - 10	0,3	0,003
Период нолу-распада (сутки)	23	6	5	3	3
Валентность антител	2	2	5 или 10	2	2
Переход через плаценту	+	-	-	-	-
Участие в опсонизации	+	+	+	-	-
Связывание системы комплемента	+	-	+	-	-

Обозначения: (+)или (-) — наличие или отсутствие признака.

* Цит. по А. А. Тотолян и др. (1996).

Содержание иммуноглобулина М составляет 5 - 10 % от общего количества иммуноглобулинов. *I*цМ. эволюционно самый старый класс иммуноглобулинов. В ходе иммунного ответа вначале появляются антитела класса γ М, которые затем замещаются антителами класса

Имуноглобулин А составляет 10 - 15 % всех иммуноглобулинов сыворотки, имеет важное значение в защите от вирусных инфекций, т. к. обволакивает вирус и предотвращает его адсорбцию и проникновение в чувствительную клетку. Необходимо подчеркнуть, что преобладает в экстраваскулярных секретах (слюне, слезной жидкости, секретах ЖКТ и мочеполового тракта, слизистой носа и молочной железы), где он находится

Таблица в

**Характеристика подклассов
иммуноглобулинов С***

Характеристика	Подклассы 1Gв			
Содержание отобшего сыворотки (%)	60 - 65	20 - 25	5 - 10	3 - 6
Период полураспада (сутки)	21 - 30	21 - 30	7 - 8	21 - 30
Участие в опсонизации	+	-	+	-
Классический путь активации системы комплемента	++	+	+++	
Пассивная кожная анафилактиксия	+	-	+	+
Индукция аллергических реакций	+	-	-	+
Связывание с Gc-рецептором:				
моноцитов	+++	-	+++	++
нейтрофилов	+	-	+	-
Переход через:				
плаценту	+	+	+	+
слизистые	-	-	-	-
Тип антигена, на который вырабатываются антитела:				
— бактериальные белки	+++			±
— бактериальные полисахариды	+++	+++		
— вирусные белки	+++		++	±
— паразиты	±			+
— аллергены пищевые	+	+		+
— аллергены бытовые, пылевые	+			++

значения: (+) или (-) — наличие или отсутствие данного признака.
*, по А. А. Тотолян и др. (1996).

в виде секреторного (в^А) — димера, состоящего из двух молекул ^А, соединяющей их сТ-деци и гликопротеина, называемого секреторным компонентом (СК) (Тотолян А. А. и др., 1996; Шварцман Я. С. и др., 1985). Показано, что СК образуется в эпителиальных клетках и присутствует на их поверхности в качестве рецептора. ^А выходит из кровотока и проникает через эпителиальный слой, соединяясь с СК. Образовавшийся таким образом Э^А отщепляется с поверхности эпителиальной клетки в слизь, где реализует свои эффекторные функции. Наличие СК резко повышает резистентность Э^А к действию протеолитических ферментов секретов. Однако, в слюне и толстом кишечнике обнаружены особые протеолитические ферменты, способные активно разрушать Э^А. Прямое взаимодействие Э^А с микроорганизмами приводит к агрегации микробов и сорбции этих агрегатов на поверхности эпителиальных клеток с одновременным угнетением размножения микробов. В процессе слушивания эпители агрегаты микроорганизмов сбрасываются в просвет, откуда удаляются. Здоровые люди имеют два подкласса иммуноглобулина А: ^А1 и ^А2. В сыворотке основным подклассом является ^А1, а в экстравазкулярных секретах ^А2 содержится в несколько больших количествах, чем ^А1 (Тотолян А. А. и др., 1996).

Иммуноглобулин В содержится в сыворотке в небольших количествах. Установлено, что ^В экспрессируется вместе с ^В на мембране В-лимфоцитов и выполняет роль антигенсвязывающих рецепторов на первых этапах экспозиции с антигеном.

Содержание ^Е составляет около 0,003% от всех сывороточных иммуноглобулинов. ^Е преимущественно накапливается в тканях слизистых оболочек и коже, где за счет Гс-рецепторов связывается с поверхностью тучных клеток, базофилов и эозинофилов. В результате присоединения специфического антигена происходит дегрануляция этих клеток и выброс биологически активных веществ. Защитная роль ^Е не вполне ясна, но известно, что его уровень в сыворотке крови существенно возрастает при некоторых инфекциях, аллергических состояниях.

Иммуноглобулины продуцируются активированными зрелыми В-лимфоцитами. В процессе созревания на мембране В-лимфоцита появляются молекулы ^В и ^Б. Начальной фазой антигениндуцированного этапа является активация В-лимфоцитов, которая происходит под влиянием двух сигналов активации: от непосредственного распознавания антигенов ^В-ре-

цепторами, а также от Т-хелперов (непосредственно и через действие цитокинов, продуцируемых активированными Т-хелперами) (табл. 7).

На ранней стадии гуморального ответа уже активированные В-лимфоциты обладают способностью к секреции иммуноглобулинов, однако основным продуцентом антител являются плазматические клетки, в которые дифференцируются В-лимфоциты в периферических органах иммунной системы и лимфоидной ткани. Плазматические клетки не несут на своей поверхности мембранной формы иммуноглобулинов.

Главной особенностью иммунного статуса при герпетической инфекции является формирование вторичного иммунодефицита. Для герпеса характерна пожизненная персистенция вируса с периодическими рецидивами и ремиссиями.

Иммунный ответ макроорганизма обусловлен гуморальными и клеточными факторами. Защитную роль играет синтез антител против оболочечных антигенов вируса и мембранных антигенов инфицированных клеток. Как при первичном, так и при рецидивирующем герпесе последовательно синтезируются IgM , IgA и IgG . Агрегация антигена антителами реализует их иммуностимулирующее действие.

В течение первых трех недель заболевания появляются антитела, представленные сначала IgM . У инфицированных новорожденных эти антитела могут сохраняться до 7 месяцев,

Таблица 7

Цитокины, регулирующие синтез иммуноглобулинов*

Цитокины	Классы иммуноглобулинов
ИЛ-2	Имуноглобулины всех классов
ИЛ-4	IgD , IgO4 ; IgO3
ИЛ-5	Имуноглобулины всех классов, преимущественно
ИЛ-6	IgA , IgM , IgO
ИЛ-10	IgA , IgM , IgO
ИЛ-13	IgM , IgO4
ИФН γ	IgO2 ; IgE
ТФР β	Имуноглобулины всех классов, кроме IgA ; IgE

означения: — повышение или понижение синтеза иммуноглобулинов.
* по А. А. Тоголян и др. (1996)

у взрослых же они быстро исчезают. Позже появляются антитела, представленные иммуноглобулинами класса С. Переключение синтеза на IgO при первичной инфекции происходит через несколько дней. При вторичном ответе сразу же синтезируются антитела класса А. Антитела класса А появляются позже и регистрируются недолго. У больных с часто рецидивирующим герпесом титры антител выше, чем у здоровых людей или больных с редкими рецидивами герпеса. Вируснейтрализующие антитела имеют более важное значение при герпесе и сохраняются более продолжительное время, чем комплементсвязывающие антитела. Они представлены IgM и Gцв, коррелируют с продукцией антител против мембранных антигенов инфицированных клеток. Вируснейтрализующие комплементзависимые противогерпетические антитела возникают как при первичной, так и при рецидивирующей инфекции.

Антитела способствуют угнетению выхода вируса из инфицированных клеток в окружающую среду. Феномен иммунного подавления и освобождения вируса из клеток способствует ограничению распространения вируса к другим восприимчивым клеткам. Образование комплекса вирус-антитело может вызвать развитие иммунологических повреждающих изменений в организме и повлиять на функции различных эффекторных клеток, способствуют лизису клеток-мишеней путем связывания с рецепторами инфицированных клеток. Лизис инфицированных клеток обусловлен тем, что один активный центр связывает антитела с детерминантами вирусспецифического антигена, расположенного на клеточной поверхности, а другой с Gс-рецепторами Т-лимфоцитов, макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов как у иммунных, так и у здоровых людей. При взаимодействии антител с инфицированными клетками наибольший эффект наступает через 2 - 8 часов после заражения. При этом антисыворотки к ВПГ-1 и ВПГ-2 проявляют перекрестную активность. Т-киллеры проявляют большую активность в реакции лизиса инфицированных клеток. Реакция лизиса клеток противогерпетическими антителами при участии комплемента или клеточных элементов имеет защитное значение в гуморальной реактивности макроорганизма при герпетической инфекции. Гуморальные антитела (как вируснейтрализующие, так и комплементсвязывающие) вырабатываются через неделю после инфицирования ВПГ, к концу второй недели достигая максимума. Противогерпетические антитела пожизненно нахо-

дятся в крови больного человека. Это обусловлено персистенцией ВПГ в организме больного человека. Несмотря на наличие специфических антител, гуморальные иммунные механизмы не в состоянии предупредить процесс активации латентного ВПГ и возникновение рецидивов, хотя наряду с факторами клеточного иммунитета они ослабляют интенсивность проявления инфекции, предупреждают диссеминирование инфекции, способствуют активации сенсibilизированных лимфоцитов. Именно противогерпетические антитела активизируют фагоцитоз, связывают внеклеточные вирусные частицы, стимулируют выработку интерферона иммунными лимфоцитами. Связываясь с Гс-рецепторами инфицированных ВПГ клеток, антитела самостоятельно или в комплексе с антигеном нарушают распознавание этих клеток и их лизис эффекторными клетками и сенсibilизированными лимфоцитами, что, в свою очередь, поддерживает персистенцию вируса и вызывает повреждающее действие иммунных реакций организма.

Итак, противогерпетические антитела способствуют не только ограничению инфекции, нейтрализации вируса, но и поддерживают инфекцию в латентном состоянии. Т-лимфоциты, регулируя иммунный ответ макрофагами, усиливают его при хелперном взаимодействии с В- и Т-лимфоцитами, а также воздействуют как супрессоры на ответ В- и Т-лимфоцитов на антиген. Т-киллеры способствуют обезвреживанию, инаktivации и элиминации вирусов. Макрофаги захватывают антиген, секретируют медиаторы, усиливающие функции Т- и В-клеток, устанавливают прочный контакт через НБА-антигены клеточной поверхности.

Обобщая данные, изложенные в настоящем разделе, можно сделать заключение о том, что клеточный и гуморальный иммунные ответы отличаются между собой многими признаками, которые их характеризуют (Кетлинский С. А., Калинина Н. А., 1998):

1. Клеточный ответ направлен против внутриклеточных микроорганизмов, тогда как гуморальный — против внеклеточных бактерий и вирусов.
2. В процессе клеточного иммунитета в качестве эффекторных клеток формируются цитотоксические клетки, которые могут непосредственно убивать клетки-мишени, тогда как в результате гуморального иммунитета образуются плазматические клетки, которые продуцируют антиген-зависимые антитела.

3. Различны механизмы распознавания антигенов Т- и В-лимфоцитами. Так, цитотоксические Т-лимфоциты распознают антиген или его эпитоп только в совокупности с антигенами гистосовместимости I класса и требуют для представления процессированный (переработанный) до пептидов антиген. Т-хелперы распознают антиген только в совокупности с молекулами гистосовместимости II класса. В то же время В-лимфоцитам такая процедура не требуется, так как они распознают антигены и их эпитопы в натуральном виде.
4. Для активации В-лимфоцитов и продукции антител в большинстве случаев требуются Т-хелперы, тогда как образование цитотоксических клеток происходит без какой-либо помощи.
- б. В процессе первичного иммунного ответа образуются клетки памяти, тогда как при формировании клеточного иммунитета этого не происходит.
6. Цитотоксические клетки осуществляют киллерную активность сами, тогда как иммуноглобулины не обладают цитотоксической активностью и в реализации своего действия им необходим комплемент. При этом не все иммуноглобулины способны фиксировать комплемент.

Интерферон. Известны три основных типа интерферонов (ИФН): α -, В- и γ -интерферон, которые продуцируются различными клетками. Так, основными клетками, продуцирующими ИФН α (ранний интерферон), считают макрофаги и В-лимфоциты. Индукторами, способствующими образованию лейкоцитами ИФН α , являются опухолевые, вирустрасформированные и вирусиндуцированные, а также незараженные ксеногенные клетки. Высокоактивными индукторами ИФН α являются бактерии и вирусы, дсРНК и другие полимеры, а также целый ряд химических и биологических веществ.

Основными клетками-продуцентами ИФН β являются клетки фибробластного и эпителиоидного типа, а также клетки иммунной системы. Так, лейкоциты периферической крови способны синтезировать ИФН β в ответ на митогенную стимуляцию. В ответ на вирусную стимуляцию В-лимфобластные линии также могут синтезировать смесь ИФН α и ИФН β (Тазулахова Э. Б., 1996). Синтез ИФН β индуцируется дсРНК природного и синтетического происхождения.

Индукторами продукции ИФН γ являются Т-клеточные митогены (лектины, оксиданты, антилимфоцитарные сыворотки

и фрагменты их иммуноглобулинов), специфические антигены и аллоантигены, многие иммуномодуляторы. В ответ на специфические антигены бактериального и вирусного происхождения также синтезируется ИФНу. В сенсibilизированных клетках ИФНу синтезируется быстрее при стимуляции антигенами, чем при индукции митогенами.

Показано, что стимулированные Т-лимфоциты продуцируют ИФНу (иммунный интерферон). Способностью индуцировать синтез ИФНу обладают лишь определенные субпопуляции Т-лимфоцитов: $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD11^+$ клетки только при наличии вспомогательных клеток: моноциты, макрофаги и В-клетки.

По всей вероятности, выявленная зависимость синтеза ИФНу от присутствия в культурах вспомогательных клеток можно объяснить способностью последних секретировать ИЛ-1, который принимает непосредственное участие в синтезе ИФНу. Обнаружено, что Т-лимфоциты способны синтезировать ИФН и в отсутствие вспомогательных клеток. Очевидно, роль вспомогательных клеток состоит в том, что маркеры их клеточных мембран имеют сродство к индуктору (Ершов Ф. И., 1996).

К настоящему времени обнаружены многочисленные физиологические функции ИФН: противовирусная, антипролиферативная, антимикробная, иммуномодулирующая, радиопротекторная и другие (всего более 20). Это несомненно указывает на контрольно-регуляторную роль интерферонов в сохранении гомеостаза. Считают, что по весомости система ИФН сравнима с системой иммунитета, а по универсальности превосходит ее. Именно эта универсальность ИФН делает его важнейшим фактором неспецифической резистентности (рис. 1).

Важно отметить, что система ИФН реагирует гораздо быстрее, чем иммунная система: для полной активации системы ИФН требуется всего несколько часов. При этом продукция ИФНа/В показывает активность противовирусной и неспецифической защиты, а продукция ИФНу — активность иммунной системы.

Продукция и секреция противовоспалительных цитокинов (ИФН а/В, ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6, 8) относится к самым ранним событиям, сопутствующим взаимодействию микроорганизмов с макрофагами; этот ранний неспецифический ответ на инфекцию (иммунизацию) важен по нескольким причинам: он

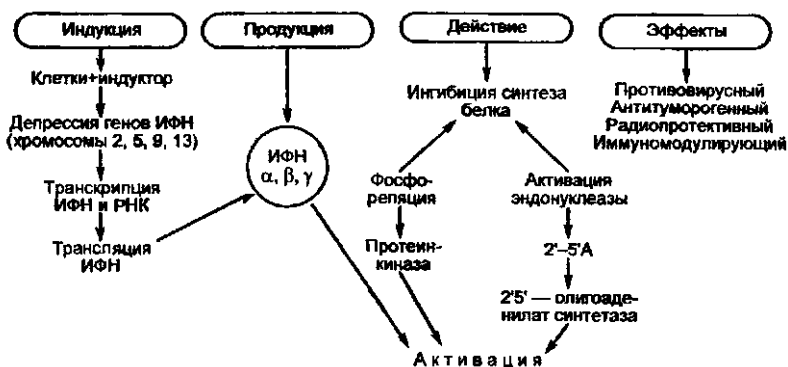


Рис. 1.

Схема функционирования системы интерферона
(Ершов Ф. И., Жданов В. М., 1986)

развивается очень быстро, поскольку не связан с необходимостью накопления клона клеток, отвечающих за конкретный антиген; вместе с тем ранний цитокиновый ответ влияет на последующий специфический иммунный ответ (Фрейдлин И. С, 1995, 1997).

Интерферон активирует макрофаги и ЕК-клетки, которые затем синтезируют ИФН-у, ИЛ-1, 2, 4, 6, ФНО, в результате макрофаги и ЕК-клетки приобретают способность лизировать вирус-инфицированные клетки (Богенген «I., et al., 1991).

ИФН-у является специализированным индуктором активации макрофагов, который способен индуцировать экспрессию более 100 разных генов в геноме макрофага, продуцентами этой молекулы являются активированные Т-лимфоциты (ТН1) и ЕК-клетки.

ИФН-у индуцирует и стимулирует продукцию противовоспалительных монокинов (ФНО, ИЛ-1, 6), экспрессию на мембранах макрофагов антигенов МНС II; ИФН-у резко усиливает антимикробную и противовоспалительную активность за счет повышения продукции клетками супероксидных радикалов, а усиление иммунного фагоцитоза и антител-опосредованной цитотоксичности макрофагов под влиянием ИФН-у связаны с усилением экспрессии Рс-рецепторов для I β . Активирующее действие ИФН-у на макрофаги опосредовано индукцией секреции этими клетками ФНО-а. Рекомбинантный препарат ФНО-а, как и ИФН-у, вызывает усиление бактерицидности

макрофагов и повышение продукции супероксидных радикалов (Фрейдлин И. С, 1995).

Ниже приводятся основные функции интерферонов и отношение к антивирусной и противоопухолевой активности (табл. 8).

Таблица 8

**Функции интерферонов и отношение к антивирусной
и противоопухолевой активности
(цит. по Л. А. Грачевой. 1996).**

Действие	Антивирусная активность	Противо- опухолевая активность
а) активация генов;		
— одигадезилатсинтеазы	+++	+
— рибоиуклеазы <i>В</i>	++	+
— протеинкиназы P1	++	-
— МНС1 и МНСИ	+++	++
— Р2- микроглобулина	+++	++
б) влияние на рост клеток — цито- статический / цитотоксический эффект		+
— ингибция ЦТ, антипролифера- тивный эффект	-	++
— индукция диффереицировки	-	+
— ингибция экспрессии онко- генов	—	++
в) модуляция клеток иммунной системы		
— МН/МФ взаимодействия (усиление фагоцитоза и цито- токсичности МН/МФ)	++	++
— ЕК-клеток активация	++	+
— влияние на Т-клетки (ингиби- ция пролиферации АГ- стимулированных Т-клеток, уси- ление цитотоксичности Т-клеток, активация Т-супрессоров)	++	++
— влияние на В-клетки (снижение продукции γ) под влиянием высо- ких доз ИФН)	+	+
— снижение секреции медиаторов тучными клетками	+	+

Обозначения: ЦТ — цитотоксичность; МН — моноциты; МФ — макрофаги; АГ — антиген; (-/+) — степень выраженности эффекта.

Экспериментальное изучение механизма действия ИФН на репликацию ВПГ в культуре клеток показало, что ИФН блокирует самые ранние этапы репродукции вируса, снижая активность вирусной ДНК-полимеразы и других а- и В-вирусных белков (B1;гаиЬ Р. *et al.*, 1986). Схематически действие ИФН при вирусной инфекции можно представить следующим образом. ИФН индуцирует синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует один из иницирующих факторов трансляции. Фосфорилированный иницирующий фактор не может обеспечить образования иницирующего комплекса. Избирательное подавление трансляции вирусных матриц обусловлено либо большей чувствительностью вирусной системы трансляции к фосфорилированию иницирующего фактора, либо специфическим исключением трансляции зараженной клетки. В обработанных ИФН клетках индуцируется синтез 2' - 5'А-синтетазы — фермента, синтезирующего 2', 5'-олигоадениловую кислоту, которая в конечном итоге приводит к активации нуклеаз, разрушающих свободные вирусные иРНК. Таким образом, те вирусные иРНК, которые не смогли связаться с рибосомами, подвергаются разрушению нуклеазами. Оба эффекта связаны с функционированием в обработанных ИФН клетках дсРНК (Ершов Ф. И., 1996). ИФН действует не непосредственно на геном клетки, а через клеточную мембрану, т. е. дистанционно. Можно сказать, что ИФН не спасает инфицированную вирусом клетку, но предохраняет соседние клетки от вирусной инфекции.

Ранний протективный эффект ИФН, проявляющийся до образования антител, обусловлен, по-видимому, в значительной степени его иммуномодулирующей активностью, нежели противовирусным действием. Следует подчеркнуть, что роль ИФН как цитокина может быть связана с его влиянием на фагоцитарную активность макрофагов, прямую цитотоксичность Т-лимфоцитов, антитело-опосредованный лизис инфицированных клеток макрофагами и лейкоцитами. Показано, что ИФН замедляет развитие продуктивной инфекции, регулирует, по-видимому, количество высвобождающегося вируса.

В результате экспериментальных исследований предложена гипотеза о двухфазном (специфическом и неспецифическом) иммунном ответе, опосредованном интерфероном (госипеИ Б. Ы. *et al.*; цит. по А. Г. Коломиец и др., 1992). Первая фаза заключается в иммунологически специфическом распознавании ан-

тигена, которое осуществляется с помощью сенсibilизированных (иммунных) лейкоцитов, антител и комплемента, реагирующих с вирусом или вирусинфицированной клеткой. Вторая фаза — неспецифическая защита представляет действие воспалительных клеток и медиаторов (интерферона, фактора ингибиции миграции макрофагов, лимфотоксина и пр.) как на инфицированные, так и неинфицированные клетки, прерывая таким образом контакт от клетки к клетке и подавляя репликацию вируса. По-видимому, специфическая фаза защиты малоэффективна при выздоровлении, тогда как неспецифическая фаза играет при этом большую роль.

Считают, что в большинстве случаев в ответ на вирусную индукцию синтезируется смесь ИФНу и ИФНа. В то же время ввиду функциональной гетерогенности лейкоциты являются продуцентами всех 3 типов ИФН (Тазулахова Э. В., 1996). Продукция ИФН имеет отношение к остроте заболевания, тогда как реакция бласттрансформации лейкоцитов отражает состояние прежней сенсibilизации организма к ВПГ. Так, в частности, у больных генитальными вирусно-бактериальными инфекциями (герпес в сочетании с хламидиозом, кандидозом) в остром периоде отмечалось снижение в 2 - 4 раза продукции ИФНа и в 4 - 8 раз — ИФНу. При этом содержание сывороточного ИФН, как правило, не превышало физиологических значений (норма < 2 ЕД/мл), а продукция спонтанного ИФН повышалась у 50% больных до 8 - 16 ЕД/мл (Антонова Л. В., Ершов Ф. И., Григорян С. С. и др., 1996).

Показано, что редкие рецидивы ВПГ-инфекции были у лиц с активной интерферонпродуцирующей способностью лейкоцитов. Так, при высоком индексе интерфероновой реакции лейкоцитов (> 40 ед.) — через каждые 5 недель. Считают, что отсутствие у индивидуума способности к образованию иммуноспецифического ИФН или утрата таковой в ходе первичного инфицирования вирусом герпеса является причиной последующих рецидивов герпетических заболеваний.

Показано, что чувствительность клеток к ИФН определяется тремя основными факторами: 1) компонентами генома клетки, отвечающими за кодирование рецепторов для ИФН; 2) целостностью метаболических путей, индуцируемых при действии ИФН; 3) наличием в клеточных мембранах рецепторов для ИФН и возможностью их нормального функционирования (Ершов Ф. И., 1996).

Можно отметить, что отскороности включения системы ИФН в процесс противовирусной защиты организма зависят течение и исход заболевания. Отсроченная или сниженная продукция эндогенного ИФН может привести к хронизации заболевания или злокачественному и регрессированию вирусной инфекции, вплоть до летального исхода (Zevin S., Hahn T., 1985).

В настоящее время установлено, что существует равновесие (при условии нормального функционирования систем иммунитета и ИФН) между продукцией иммунного ИФН и функциональной активностью лимфоцитов, выраженной в их пролиферативной способности. Однако при некоторых вирусных инфекциях могут быть исключения. Показано, что иногда может отсутствовать характерное повышение уровня циркулирующего ИФН и, как следствие этого, отсутствие развития антивирусного состояния (АВС) лимфоцитов. Очевидно, одной из причин данного феномена является слабая способность некоторых вирусов (респираторно-синтициального, гепатитов) индуцировать синтез ИФН, что сопровождается низким и почти полным отсутствием продукции ИФН при ОРВИ и гепатитах, в связи с чем не обеспечивается необходимый уровень противовирусной защиты клеток. Другой причиной может быть сниженная чувствительность вирусов к действию ИФН, что особенно характерно для аденовирусов.

Следует упомянуть о понятии ИФН-дефицита. Синдром ИФН-дефицита у больных характеризуется отсутствием индукции АВС клеток и достоверным снижением способности к синтезу ИФНа и ИФНу при соответствующей индукции лимфоцитов *in vitro*. Частота встречаемости указанного синдрома среди больных ОРЗ составила 5%. Течение заболеваний у больных с синдромом ИФН-дефицита имело особенно тяжелый, прогрессирующий характер, и отсутствие ИФН в терапии таких больных могло сопровождаться их гибелью (Ершов Ф. И и др., 1984).

В результате многолетних исследований показано, что наиболее частым типом нарушений ИФН-статуса при заболеваниях является различная степень повышения титра циркулирующего ИФН с одновременно глубоким подавлением ИФН-продуцирующей способности иммуноцитов. Такая картина может наблюдаться при стрессах, острых вирусных и бактериальных инфекциях, а также рецидивах аллергических заболеваний. При этом циркулирующий ИФН может быть представлен смесью разных типов (а, В, у) или преимущественно одним типом (Ершов Ф. И., 1996).

Для хронических вирусных инфекций (герпес, гепатит В), а также заболеваний невирусной природы характерно выраженное подавление интерферогенеза. При этом более значительно продукция ИФН подавлена у больных с тяжелым течением хронического заболевания. Фоновые показатели сывороточного ИФН сочетаются с резко угнетенной способностью иммунных клеток синтезировать ИФН α и ИФН γ .

Таким образом, система ИФН осуществляет не только первую линию защиты организма от инфекций (когда иммунная система еще не успевает отреагировать), но и участвует в дальнейших (уже иммунных) процессах уничтожения чужеродных объектов. Если иммунная система отвечает за неизменность белкового состава организма, то система ИФН следит за поддержанием генетического гомеостаза, т. е. за сохранением постоянства состава организма на уровне генома (Ариненко Р. Ю. и др., 1997).

С целью объективной оценки состояния системы ИФН в клинической практике используют понятие «интерфероновый статус», который включает ряд показателей: 1) содержание различных типов ИФН в сыворотках крови (зИФН), т. е. количественное определение содержания ИФН, уже присутствующего в организме и выполняющего защитные и регуляторные функции; 2) способность лейкоцитов крови к продукции различных типов ИФН (индукция ИФН, или интерфероновая реакция лейкоцитов). Отмечено, что выраженная спонтанная продукция ИФН может показывать наличие в организме таких индукторов ИФН, как реплицирующиеся вирусы, хламидии и другие (Ариненко Р. Ю. и др., 1997). Следует подчеркнуть, что достаточно полную картину системы ИФН может дать только указанная комбинация показателей, т. к. каждый из них в отдельности не дает четкого представления о происходящих процессах в организме.

В табл. 9 приводятся основные варианты ИФН-статуса у больных с различными формами инфекционного процесса.

При обследовании здоровых людей в сыворотке крови определяются очень низкие количества циркулирующего ИФН при высокой способности лейкоцитов продуцировать ИФН *in vitro*. Рекомендуются наряду с абсолютными значениями выражать результаты исследований в процентах от нормы. При патологических состояниях изменяется соотношение циркулирующего и индуцированного ИФН, а также способность лейкоцитов периферической крови продуцировать ИФН α /В и ИФН γ . Анализируя изменения в ИФН-статусе на примере вирусных

Таблица 9

**Характеристика показателей системы интерферонов
при различных формах вирусных инфекций***

Форма инфекционного процесса	Сывороточный ИФН, МЕ/мл	Продукция ИФН лейкоцитами in vitro	
		ИФН а/Р, МЕ	ИФН _у , МЕ
Здоровые люди (норма)	0 - 10	250 - 520	110 - 250
Острая инфекция	25	110	55
Острая инфекция, тяжелое течение	> 35	< 60	< 30
Хроническая инфекция, ИФН-дефицит, ИДС	12 - 25	85 - 250	45 - 110
Выраженная депрессия активности ИФН- и им- мунной систем	0 - 10	40	20

Обозначение: ИДС — иммунодефицитное состояние.

* Цит. по Ариенко Р. Ю. и др., (1998).

инфекций (см. табл. 9), следует отметить, что состояние системы ИФН отражает динамику развития заболевания (Ариенко Р. Ю. и др., 1997).

Острая вирусная инфекция сопровождается повышением содержания общего сывороточного ИФН на фоне снижающейся способности лейкоцитов к продукции разных типов ИФН, что отражает нормальную реакцию организма на активную вирусную инфекцию. В этой ситуации применение индукторов ИФН окажется малоэффективным. Целесообразно назначение 1-2 курсов современных препаратов ИФН (например, виферона — реаферон в сочетании с антиоксидантами), а в периоде реконвалесценции показано использование индукторов ИФН (циклоферон и др.).

Тяжелое течение инфекции характеризуется выраженным дисбалансом системы ИФН: показатели сывороточного ИФН > 35 МЕ/мл при резко сниженной способности лейкоцитов к синтезу ИФН_{а/В} (< 60 МЕ) и ИФН_у (< 30 МЕ). Показана заместительная ИФН-терапия в сочетании с этиотропной и патогенетической терапией.

При хронической вирусной инфекции (вирусно-бактериальные, персистирующие) на фоне сниженного уровня БИФН отмечается более высокая способность лейкоцитов к продукции индуцированного ИФН_{а/В} и ИФН_у по сравнению с острыми вирусными заболеваниями (см. табл. 9). В этих случаях реко-

мендуют этиотропную терапию в сочетании с ИФН и иммуномодуляторами. Повышение продукции ИФНа/В и ИФНу является показанием для применения индукторов ИФН и классических иммуномодуляторов.

В случае выраженной депрессии активности ИФН- и иммунной систем (рецидив хронической инфекции, активная репродукция вирусов) можно выявить углубление дисбаланса системы ИФН: существенное снижение в ИФН сочетается с резким понижением индуцированной продукции лейкоцитами ИФНа/В и ИФНу до 5 - 10% от уровня нормы. Система ИФН не в состоянии осуществлять свои защитные функции и реагировать адекватно на стимуляцию. Возможна генерализация инфекционного процесса. Показана заместительная ИФН-терапия, которая может предшествовать назначению антибиотиков и химиопрепаратов, в дальнейшем с ними сочетаясь.

По мнению Г. Т. Сухих и др. (1997), общая схема иммунного ответа на герпетическую инфекцию может быть представлена следующим образом. Иммунный ответ организма человека на вирусную инфекцию делится на две фазы — фазу локализации вируса на ограниченной анатомической площади и фазу позднего специфического воздействия, в течение которой локализованная инфекция удаляется. Оставшийся вирус переходит в устойчивое, нереплицирующееся, латентное состояние.

В заключение данного раздела необходимо отметить, что формирование иммунитета при герпесвирусных инфекциях является сложным и многокомпонентным процессом, в ходе которого клеточная кооперация может нарушаться на различных этапах. Так, например, активность макрофагов, характер вирусной инфекции и доставка вирусспецифического антигена В-лимфоцитам на индуктивной стадии герпеса определяет резистентность организма к этой инфекции. С другой стороны, решающее влияние на герпетическую инфекцию оказывает специфический клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Состояние клеточного иммунитета человека в значительной степени определяет характер течения герпетической инфекции, частоту и интенсивность рецидивов. Однако еще многое остается неизвестным в механизме иммунного ответа при герпесе, например — что способствует или, наоборот, прерывает рецидивы инфекции? От продукции В-лимфоцитами антител и от взаимодействия Т-лимфоцитов с инфицированными клетками зависит развитие и состояние приобретенного иммунитета.

Известно, что при нарушениях иммунного статуса герпетическая инфекция развивается чаще и характеризуется более тяжелым течением, что связано с недостаточностью иммунитета или избыточной иммунной реакцией. Механизмы иммунопатологии при герпетической инфекции разнообразны и включают как ответ на персистирующий антиген, так и неадекватную регуляцию вирусспецифического иммунного ответа. Среди иммунопатологических состояний выделяют реакции, индуцированные иммуноглобулинами, иммунопатологию, вызванную иммунными комплексами и Т-лимфоцитами. Выраженность иммунопатологического компонента при герпетической инфекции, по-видимому, можно снизить путем воздействия на отдельные звенья иммунной системы (табл. 10).

Герпес вирусы не только персистируют, но и репродуцируются в клетках иммунной системы, обуславливая гибель или снижение функциональной активности этих клеток, что способствует развитию вторичных иммунодефицитных состояний, поддерживая длительную персистенцию. Таким образом, возникает своеобразный «порочный круг».

Показано, что у больных герпесом снижена продукция эндогенного интерферона, активность натуральных киллеров и антителозависимая клеточная цитотоксичность, уменьшено абсолютное число и снижена активность Т-лимфоцитов (CD3⁺ и CD4⁺ клеток) и нейтрофилов, повышено количество иммунных комплексов. В условиях ослабленного иммунологического контроля не только становится невозможной полная элиминация внутриклеточно расположенного вируса, но и создаются благоприятные условия для распространения вируса от клетки по межклеточным мостикам

Таблица 10

**Клинические проявления
основных иммунологических дефектов***

Клинические проявления	Дефекты	Механизмы
Острые и хронические инфекции, вызванные бактериями, вирусами, грибами, простейшими, в том числе: оппортунистические инфекции, вызванные представителями нормальной микрофлоры.	Тяжелые комбинированные дефекты Т- и В-лимфоцитов, гуморального и клеточного иммунного ответов	Дефект аденозиндезаминазы, дефект пуриннуклеозидфосфорилазы. Дефект экспрессии молекул МНС I и II классов. CD3у или с дефицит, CD8 дефицит. Дефекты цитокинов, цитокиновых рецепторов (например IL-2R), внутриклеточных сигналов трансдуцирующих систем.

Продолжение табл. 10

Клинические проявления	Дефекты	Механизмы
Рецидивирующие бактериальные инфекции: средний отит, хроническая пневмония, вызванные капсульными бактериями и другие.	Дефекты В-лимфоцитов, гуморального иммунного ответа	Дефекты пролиферации, дифференцировки и активации В-лимфоцитов. Дефекты продукции и секреции Ig- Дефекты Т-хелперов (Т _H 2). Дефекты цитокинов, цитокиновых рецепторов и внутриклеточной трансдукции сигналов.
Повышенная чувствительность к инфекциям, вызванным вирусами, грибами и простейшими. Рецидивирующие инфекции с склонностью к генерализации.	Дефекты Т-лимфоцитов, клеточно-опосредованного иммунного ответа	Дефекты пролиферации, дифференцировки и активации Т-лимфоцитов. Дефекты поверхностных рецепторов и антигенов: СШ3, ШМ/СШ, СП28,1b-2b, МНС I, II кл. Дефекты цитокинов и внутриклеточной трансдукции сигналов. (№ - АТ, С-протеин и др.)
Генерализованные инфекции, вызванные низковирулентными бактериями, в том числе: оппортунистические инфекции; инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями с нарушениями процессов нагноения и заживления ран.	Дефекты фагоцитоза: фагоцитирующих клеток и опсониров	Дефекты пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников миелопоэза. Дефекты функций фагоцитов: адгезии (синтеза СШ8, фукозилтрансферазы), подвижности, микробицидности, метаболические дефекты фагоцитов (СБРБ, миелопероксидазы). Дефекты опсониров: компонентов комплемента и антител. Дефекты цитокинов, цитокиновых рецепторов и внутриклеточной трансдукции сигналов.
Вирусные инфекции с склонностью к рецидивированию и генерализации, повышена частота злокачественных опухолей, лимфопролиферативных заболеваний.	Дефекты естественных киллеров	Дефекты пролиферации, дифференцировки, активации ЕК, продукции и рецепции цитокинов, цитотоксичности.
Рецидивирующие бактериальные инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, чаще — нейсериями, и аутоиммунные заболевания (СКВ и др.). Ангионевротический отек.	Дефекты системы комплемента	Дефекты продукции компонентов комплемента, или их ингибиторов, или экспрессии их рецепторов.

примечание: * — цит. по Фрейдлин И. С. Иммунная система и ее дефекты. СПб.,

или экстрацеллюлярным путем. Следует отметить/что выявленные нарушения в иммунном статусе сохраняются как в фазе рецидива, так и в фазе ремиссии, что необходимо учитывать при лечении больных герпетической инфекцией.

Таким образом, существуют тесные двусторонние связи между инфекциями и иммунодефицитами. В то же время показано, что наиболее частыми клиническими формами иммунодефицитов служат затяжные, рецидивирующие, тяжело протекающие инфекции и инвазии: бактериальные, вирусные, грибковые и прочие.

1.4. СОСТОЯНИЕ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ГЕРПЕСОМ

Клинический исход первичной ГИ в значительной мере определяется иммунным статусом организма. В то же время следует отметить, что характер патогенетических изменений в организме больных герпесом в значительной мере обусловлен возможностью интеграции генома вируса в геном клетки-хозяина, в частности в паравертебральных ганглиях, а также тропностью ВПГ и других герпесвирусов к форменным элементам крови и иммунцитам (эритроциты, тромбоциты, гранулоциты, макрофаги, лимфоциты). Это способствует пожизненной персистенции структур ВПГ в организме человека и обуславливает изменение клеточного и гуморального иммунитета. Более того, сегодня ГИ рассматривается как инфекционная (приобретенная) болезнь иммунной системы (Баринский И. Ф. и др., 1986), при которой длительная персистенция вируса в ряде случаев сопровождается продуктивной инфекцией ВПГ практически во всех видах клеток иммунной системы, что проявляется их функциональной недостаточностью и способствует формированию иммунодефицита (Баринский И. Ф., 1988; Коломиец А. А. и др., 1992).

Нами, а также другими исследователями, показано, что основная роль в формировании противогерпетического иммунитета принадлежит клеточным механизмам, состояние которых во многом определяет как исход первичного инфицирования, так и частоту и напряженность рецидивов заболевания (Баринский И. Ф. и др., 1986; Исаков В. А. и др., 1993). Длительность иммунодефицита при вирусных инфекциях будет во многом определяться как свойствами самого вируса, так и типом ответных реакций больного.

Полагают, что достаточно высокий уровень специфических антител в крови больных рецидивирующим герпесом стабилизирует персистенцию вируса, но не предупреждает рецидивов (Бочаров А. Ф. и др., 1982; Семенова Т. Б. и др., 1987). Т. Б. Семенова и др. (1987) показали, что при тяжелом течении рецидивирующей ГИ с поражением кожи и слизистых оболочек заболевание протекает на фоне высоких титров комплемент/связывающих антител со снижением количественного содержания лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови, при этом менялось соотношение популяций лимфоцитов.

Многочисленные исследователи (Баринский И. Ф. и др., 1986; Исаков В. А. и др., 1991, 1997; Пригожина В. К. и др., 1990; Рахманова А. Г. и др., 1995) показали, что при ГИ снижено общее количество $CD3^+$ клеток (Т-лимфоциты общие), $CD4^+$ (Т-хелперы), снижен иммунорегуляторный индекс ($CD4: CD8$). Снижена активность естественных киллеров и антителозависимая клеточная цитотоксичность, угнетена способность лейкоцитов к синтезу эндогенного интерферона. Выявленные изменения характерны для больных со среднетяжелым и тяжелым течением рецидивирующего герпеса. Они зарегистрированы в фазе рецидива, в фазе ремиссии наблюдалась положительная динамика изученных иммунологических показателей, однако они оставались ниже нормы.

Нами проведено комплексное иммунологическое обследование 148 больных генитальным герпесом (ГТ), обусловленным ВПГ. У 42% больных отмечалось тяжелое течение ГТ (рецидив не менее 1 раза в месяц), 33% имели среднетяжелую (1 рецидив в 2 - 3 месяца) и 25% — латентную форму ГТ. Причем как моноинфекция ГГ протекал у 22% больных, в остальных случаях были выявлены различные микробные ассоциации.

В периферической крови определяли количество иммунокомпетентных клеток ($CD3$, $CD4$, $CD8$ для Т-клеток и $CD22$ для В-клеток), пролиферативную активность лимфоцитов под действием Т- и В-клеточных митогенов в РБТЛ, активность НК-клеток антителозависимую цитотоксичность лимфоцитов (АЗЦТЛ). Исследовали фагоцитарную и метаболическую активность лейкоцитов по спонтанному и индуцированному тесту НСТ (тест восстановления нитросинего тетразолия), уровень катионных белков (КБ) лактоферрина (ЛФ) и миелопероксидазы (МПО), показатели церулоплазмينا (ЦП), трансферрина (ТФ), иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Исследовали уровень интерлейкинов 1 и 2 (табл. 11 и 12).

Таблица 11

**Характеристика факторов неспецифической резистентности
больных рецидивирующей герпетической инфекцией**

Показатели	Период болезни		Здоровые люди
	Рецидив	Ремиссия	
Фагоцитоз, %	45,2 + 4,0	44,7 + 3,7	41,2 - 53,0
Фагоцитарный индекс, усл. ед.	3,3 + 0,4	3,7 ± 0,4	6,1 - 6,9
Фагоцитарное число, усл. ед.	7,0 ± 0,4	7,2 ± 0,3	2,9 - 4,4
НСТ спонтанный, %	26,4 ± 0,4	18,8 ± 2,3	2,0 - 20,0
НСТ индуцированный, %	38,0 + 6,5	26,2 ± 3,5	23,0 - 32,4
ЦИК, усл. ед.	100,0 ± 2,3	65,0 ± 2,0	58,0 - 63,0
<i>IeM</i> , г/л	1,64 ± 0,07	1,60 ± 0,07	1,04 ± 0,09
<i>IeA</i> , г/л	2,30 ± 0,08	3,17 ± 0,09	1,90 ± 0,08
ДО, г/л	21,96 ± 1,10	17,86 ± 0,90	14,50 + 0,56
Лизосомально-катионный тест, усл. ед.	1,26 ± 0,07	1,56 ± 0,03	1,58 ± 0,01
Миелопероксидаза, нг/мл	360,0 ± 34,7	431,0 ± 44,0	160,0 ± 20,0
Лактоферрин, нг/мл	731 ± 134	2282 ± 216	1000 ± 140
Трансферрин (ТФ), г/л	2,12 ± 0,04	2,37 ± 0,05	2,34 ± 0,04
Церулоплазмин (ЦП) г/л	1,15 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,39 ± 0,02
Индекс ЦП/ТФ	0,54	0,35	0,17

Таблица 12

**Результаты иммунологического обследования
больных рецидивирующей герпетической инфекцией**

Показатели	Период болезни		Здоровые люди
	рецидив	ремиссия	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,70 ± 0,52	5,40 ± 0,38	5,60 ± 0,21
Лимфоциты, %	37,3 ± 2,08	43,60 ± 1,51	29,4 ± 1,11
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,00 ± 0,14	2,30 ± 0,18	1,65 ± 0,11

Продолжение табл. 12

Показателя	Период болезни		Здоровые люди
	рецидив	ремиссия	
Нейтрофилы, %	54,1 ± 2,02	49,70 ± 1,55	61,9 ± 1,19
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л,	3,10 ± 0,32	2,80 ± 0,22	3,47 ± 0,20
Моноциты, %	5,60 ± 0,63	5,40 ± 0,60	6,20 ± 0,24
Моноциты, 10 ⁹ /л,	0,29 ± 0,4	0,27 ± 0,03	0,35 ± 0,04
Эозинофилы, %	2,40 ± 0,81	1,10 ± 0,19	2,20 ± 0,03
Эозинофилы, 10 ⁹ /л,	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,03
Субпопуляции Т-лимфоцитов (теофиллиновый тест):			
Т-лимфоциты общие, %	48,80 ± 3,66	41,60 ± 2,45	42 - 78
Т-лимфоциты, 10 %	1,03 ± 0,12	0,86 ± 0,07	0,9 - 1,5
Т-лимфоциты, тфр, %	42,1 ± 4,65	45,10 ± 3,76	26 - 54
Т-лимфоциты, тфр, 10 ⁹ /л,	1,02 ± 0,16	0,96 ± 0,15	0,57 - 1,03
Т-лимфоциты, тфч, %	13,5 ± 3,86	13,00 ± 3,80	16 - 24
Т-лимфоциты, тфч, ю ⁹ /л,	0,29 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,33 - 0,47
Иммунорегуляторный индекс*	3,2 - 3,5	3,4 - 4,5	1,7 - 2,3
Субпопуляции Т-лимфоцитов (лимфоцитотоксический тест с моноклональными антителами)			
CD3, %	33,1 ± 1,8	45,5 ± 3,1	52,0 ± 4,3
CD4, %	16,8 ± 1,1	30,0 ± 2,5	36,6 ± 4,1
CD8, %	16,7 ± 1,1	13,2 ± 2,4	15,3 ± 1,6
CD22, %	23,4 ± 0,5	15,2 ± 0,7	19,6 ± 2,1
Активность ЕК (ИЦ, %)	11,6 ± 2,4	35,2 ± 4,2	32,6 ± 3,7
Антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов, %	0,006 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,015 ± 0,001
Уровень ИЛ-1, пг/мл	5,29 ± 2,12	20,1 ± 12,7	51,2 ± 9,2
Уровень ИЛ-2, ед/мл	11,6 ± 9,2	12,0 ± 4,0	78,3 ± 14,1

Примечание: Т-лимфоциты, тфр — теофиллинрезистентные Т-лимфоциты; Т-лимфоциты, тфч — теофиллинчувствительные Т-лимфоциты;

*иммунорегуляторный индекс (ИРИ): Т-лимфоциты, тфр / Т-лимфоциты, тфч; ИЦ — индекс цитотоксичности.

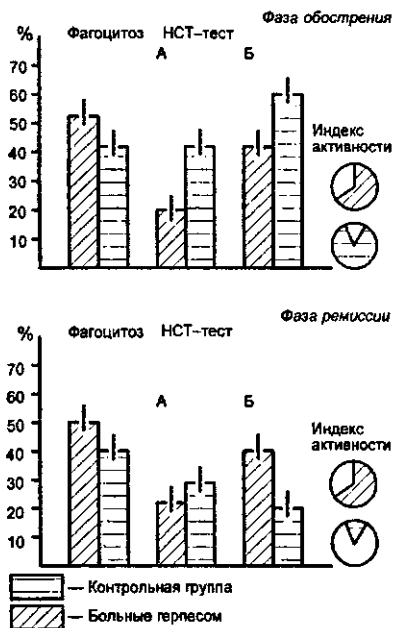


Рис. 2.

Результаты фагоцитарной активности иммуноцитов у больных рецидивирующей герпетической инфекцией в различные стадии болезни

А — спонтанный; Б — индуцированный

В результате обследования больных с обострением ГИ установлено, что уровень фагоцитарной активности лейкоцитов был, как правило, нормальным или имел тенденцию к повышению (рис. 2). Выраженное снижение числа фагоцитирующих клеток (менее 30% при норме 52,5%) имело место у незначительного числа больных (частота = 0,1). В то же время при обострении хронического процесса обнаружено достоверное повышение показателей оксидазной активности лейкоцитов как в спонтанном, так и в индуцированном тесте НСТ по сравнению с контрольной группой (НСТ спонтанный = $38,0 \pm 7,6\%$; НСТ индуцированный = $60,0 \pm 6,9\%$ против $18,4 \pm 2,1\%$ и $36,9 \pm 3,6\%$ в контроле; $P < 0,05$). Высокие значения индуцированного теста НСТ сопровождалось наличием большего числа высокоактивных клеток: индекс активности составлял от 0,6 до 1,0 против 0,5 - 0,75 в контрольной группе. Повышение показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста свидетельствует об усилении окислительно-восстановительного потенциала клетки, что коррелирует с повышенными значениями ЦИК, выявленными у больных в фазе обострения (рис. 3). Одновременно увеличение числа высокоактивных клеток (индуцированный НСТ-тест) может быть интерпретировано как повышение экспрессии Гс- и СЗб-рецепторов на мембране клеток, участвующих в фагоцитозе (Бюзэоп М. 1982). Изменения в уровнях основных классов иммуноглобулинов были минимальными, лишь в единичных случаях концентрация повышалась до 14,0 - 15,5 г/л (при 11,5 г/л у здоровых

лиц), на фоне повышенного значения ЦИК, что требует дальнейшего изучения.

При наступлении ремиссии через 2-3 недели после обострения у больных отмечалось снижение показателей индуцированного НСТ-теста (до $27,6 \pm 2,9\%$ против $36,9 \pm 3,6\%$ в контроле). В ряде случаев (частота = 0,3) имело место снижение числа фагоцитирующих клеток. Процент фагоцитоза составлял 16-30% против 41-68% в контрольной группе. На фоне снижения функциональной активности лейкоцитов выявлялось нарастание в крови ($2,47 \pm 0,19$ г/л против $1,90 \pm 0,08$ г/л в контроле; $P < 0,05$), в некоторых случаях снижение уровня до нижней границы нормы, равной 7,0 г/л (частота = 0,2) совпадало с клинической ремиссией.

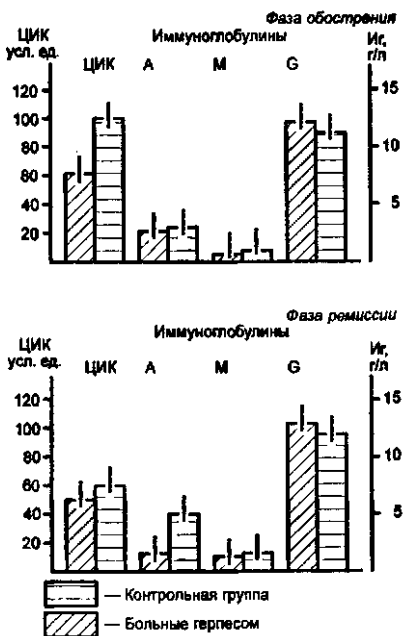


Рис. 3.
Содержание ЦИК и иммуноглобулинов в сыворотках крови больных рецидивирующим герпесом в различные стадии болезни

Также представляло интерес проанализировать состояние фагоцитарной и окислительной функции лейкоцитов у 40 больных рецидивирующим генитальным герпесом (РГТ) в зависимости от продолжительности и фазы заболевания, а также с учетом частоты рецидивов (рис. 4). Больные были распределены на две группы: в первую вошли пациенты с продолжительностью заболевания до 2 лет и с частотой рецидивирования не более 2 раз в год. Вторую группу составили лица, болеющие герпесом более 2 лет и с частотой обострения заболевания более 3 раз в год.

Показано, что в период обострения инфекции, как правило, отмечалось снижение фагоцитарной активности и увеличение числа клеток, способных восстанавливать нитросиний тетразолий в условиях стимуляции нейтрофилов ФГА и в спонтанном

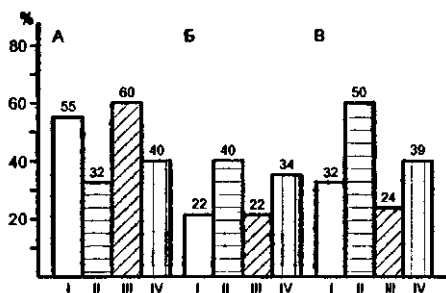


Рис. 4.

Показатели функциональной активности лейкоцитов у больных генитальным герпесом

А — процент фагоцитирующих клеток; Б — НСТ-тест, спонтанный; В — НСТ-тест, индуцированный. I — показатели у здоровых людей; II — больные герпесом, фаза обострения; III — фаза ремиссии у больных с длительностью заболевания до 2-х лет (1-я группа); IV — фаза ремиссии у больных с длительностью заболевания более 2-х лет (2-я группа)

В период ремиссии наблюдалось отчетливое повышение показателей спонтанного и индуцированного НСТ-теста, которые оказались несколько ниже значений, характерных для периода обострения (см. рис. 4). В период ремиссии у больных, болеющих ГГ более 2 лет, фагоцитоз был активнее, чем в фазе обострения, но значительно ниже показателей здоровых лиц. Выявленные изменения, на наш взгляд, обусловлены хронической антигенной нагрузкой и отражают состояние функционального перенапряжения фагоцитов у больных в период ремиссии.

Изучение активности клеток моноцитарно-макрофагальной системы (ММС) представляет интерес для клиницистов потому, что клетки ММС участвуют во многих фазах иммунного ответа и в первую очередь взаимодействуют с Т-лимфоцитами в процессе распознавания антигена и переработки антигенной информации. Непосредственно или косвенно активированные Т-лимфоцитами клетки ММС играют важную роль в эффекторной фазе иммунного ответа (цитотоксическое действие, поглощение иммунных комплексов).

В связи с этим мы дополнительно исследовали особенности макрофагальных реакций и функциональную активность Т-лимфоцитов *in vivo* в тесте «кожного окна» по Ребаку (Rebuck F., Gromnley F., 1925) у больных простым герпесом в остром периоде болезни. Ранее было показано, что активность

НСТ-тесте (рис. 4). Очевидно, обнаруженные изменения связаны с наличием большого количества вирусного антигена в очаге воспаления и интенсивным нарастанием в лейкоцитах активных форм кислорода.

К периоду клинической ремиссии у больных первой группы уровень исследуемых защитных реакций был в пределах величин, определяемых у здоровых людей (рис. 4). В то же время у больных второй группы в фазе ре-

иммунокомпетентных клеток дермального слоя может быть определена по «выходу» макрофагов в зону асептического воспаления (в суточной дермограмме) и по их реакции на митогены туберкулин, ФГА (митогены Т-лимфоцитов), а также пирогенал (митоген В-лимфоцитов и макрофагов) (Гользанд И. В. и др., 1984).

В суточной дермограмме, исследованной нами у 15 больных ГТ в период рецидива, выявлено спонтанное торможение миграции макрофагов (МФ), увеличенные выход лимфоцитов (ЛФ) и нейтрофилов (НФ), а также снижение коэффициента (МН + МФ) : НФ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (табл. 13).

Введение туберкулина в зону «окна» сопровождалось умеренным выходом лимфоцитов в очаг воспаления (11,9%), уменьшением числа нейтрофилов (34,5%). Миграция макрофагов была выше, чем у здоровых лиц (53,7% и 36,4% соответственно). Коэффициент (МН + МФ) : НФ был достоверно выше, чем в контрольной группе. Очевидно, это отражает перераспределение иммуноцитов дермы, мигрирующих в воспалительный очаг под влиянием митогенов.

Таблица 13

**Клеточный состав зоны асептического воспаления
в тесте «кожного окна» по Ребаку**

Митогены	Группы обследо- ванных	Клеточный состав дермограммы, %		Коэффициент <МН + МФ>:НФ	
		ЛФ	МН + МФ	НФ	
До введения митогена	Больные герпесом	6,0	50,7	44,6	1,10
	Здоровые лица	2,6 + 0,2	57,7 + 0,7	39,4 + 1,2	1,50 P>0,05
Туберкулин	Больные герпесом	11,9	53,7	34,5	1,55
	Здоровые лица	9,8 + 0,6	36,4 + 1,1	52,3 + 1,2	0,70 P>0,001
Пирогенал	Больные герпесом	5,0	53,5	41,5	1,28
	Здоровые лица	5,8 + 0,9	39,0 ± 1,4	53,8 ± 1,7	0,70 P>0,001

Обозначения: ЛФ — лимфоциты, МН — моноциты, МФ — макрофаги, НФ — нейтрофилы.

При постановке внутрикожной пробы с туберкулином у 3 из 15 больных результат был отрицательным, у 12 — умеренно положительным (диаметр папулы — 11 мм, у здоровых лиц — 7 мм; $P < 0,05$).

Введение в зону «кожного окна» пирогенала сопровождалось некоторым снижением выхода лимфоцитов, достоверным увеличением клеток моноцитарно-макрофагального ряда и уменьшением выхода нейтрофилов (см. табл. 13). Коэффициент (МН + МФ): НФ был равен 1,28, в то время как у здоровых лиц — 0,7 ($P < 0,001$).

Таким образом, у больных РГИ в фазе рецидива возникают существенные изменения как в соотношении клеток, определяемых в дермограмме, так и в их реакции на митогены. В-клетки активнее отвечают на пирогенал, чем Т-лимфоциты на туберкулин, что подтверждает функциональную неполноценность Т-клеточного звена иммунитета у обследованных больных.

Взросший в последние годы интерес ученых к изучению роли факторов неспецифической резистентности в противовирусном иммунитете не случаен. Являясь филогенетически более древними механизмами защиты организма, чем иммунная система, различные компоненты неспецифической резистентности вносят свой вклад в комплекс ответных реакций организма на вирусную инфекцию. Следует подчеркнуть, что по времени эти события предшествуют развитию специфической иммунной реакции (Мазинг Ю. А., Данилова М. А., 1989).

Важными факторами неспецифической защиты организма, наряду с представленными выше, являются катионные белки (КБ) нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Выделяют ферментные (миелопероксидаза, лизоцим, катепсин в, эластаза) и неферментные (дифенсины, бактерицидный проницаемость увеличивающий протеин, лактоферрин) катионные белки (Кокряков В. Н. и др., 1989). В доступной нам литературе мы не встретили сообщений, посвященных изучению динамики КБ у больных герпесом. Активность КБ мы определяли в реакции лизосомально-катионного теста (ЛКТ) (Брызжикова Т. С., 1995).

Установлено, что содержащиеся в гранулах НГ катионные белки выполняют разнообразные функции в воспалительной реакции (медиаторов воспаления, неспецифических опсонин при фагоцитозе, модуляторов свертывания крови и фибринолиза и т. д.). Катионные белки обеспечивают мощный анти-

микробный потенциал НГ благодаря комплексному воздействию на структуру и обмен веществ микроорганизмов. Низкомолекулярные КБ — дифенсины, являясь высокоосновными поверхностными соединениями, подавляют репродукцию ВПГ, действуя на оболочку вируса и лишая его мембранотропности. Следовательно, они активны в отношении свободного и сорбированного на клетке вируса (Кокряков В. Н., 1988) и являются факторами санации организма от вирусов и подавления инфекции. Мы показали, что острая фаза ГИ сопровождается падением суммарного содержания КБ, определяемых в ЛКТ (см. табл. 11), что может говорить об интенсивной секреции НГ и активном вовлечении этих клеток в систему защитных реакций организма. Дальнейшая положительная динамика инфекционного процесса сопровождается повышением содержания КБ и соответственно восстановлением показателей ЛКТ до нормальных значений. Тем не менее высокий уровень в сыворотке крови миелопероксидазы (МПО) на протяжении всего цикла болезни может свидетельствовать о постоянном напряжении секреции НГ, обеспечиваемой за счет ускорения циркуляции НГ и более быстрого обновления пула этих клеток в крови. Показатели НСТ-теста и фагоцитоза НГ дополнительно свидетельствуют об активном вовлечении в патологический процесс НГ, что сопровождается истощением функции этих клеток в фазе ремиссии.

Определенный интерес представляют металлопротеиды церулоплазмин (ЦП), трансферрин (ТФ) и лактоферрин (ЛФ), являющиеся белками острой фазы воспаления, основной признак которых — быстрое и значительное изменение концентрации в результате нарушения гомеостаза независимо от природы и места приложения вызвавшего его стимула. Как известно, механизм острофазной реакции заключается в том, что под действием повреждающего фактора выделяются биологически активные вещества, способствующие увеличению синтеза ИЛ-1 и других цитокинов. Стимулируются защитные реакции организма и усиливается синтез печенью «белков острой фазы» воспаления — в частности, ЦП. Поэтому при выраженной воспалительной реакции наблюдается более высокая концентрация медьсвязывающего белка крови.

Принято считать, что железосодержащий белок относится к «отрицательным острофазным белкам», концентрация которых падает в начале болезни. Более низкое содержание ТФ

у больных не осложненным и особенно осложненным гриппом и простым герпесом в остром периоде болезни подтверждает это положение. При этом нами было показано, что чем легче течение вирусных инфекций, тем менее значимо снижение ТФ, чем тяжелее клиническое течение гриппа и герпеса, тем существеннее снижаются значения ТФ в сыворотке крови (Исаков В. А. и др., 1996).

Механизм снижения ТФ тот же — развитие острой фазы воспалительного ответа. Увеличение уровня ИЛ-1 способствует освобождению ЛФ нейтрофилами, именно ЛФ захватывает железо и ведет к гипосидеремии. Можно предположить, что снижение уровня сывороточного железа, сопровождающее развитие многих воспалительных заболеваний, и приводит к уменьшению концентрации ТФ. Возможно, и медьсвязывающий белок участвует в этом процессе, так как обладает выраженными ферроксидазными свойствами: он окисляет $\text{Rei}^{4+} \rightarrow \text{Re}^{3+}$, которое и встраивается в молекулу апотрансферина.

Лактоферрин (ЛФ) играет важную роль в межклеточной операции фагоцитирующих клеток. Рецепторы к ЛФ обнаружены на моноцитах, макрофагах, НГ, активированных Т-лимфоцитах, а также В-лимфоцитах (Иаасги А. в., 1991). Поглощение ЛФ мононуклеарными фагоцитами угнетает их способность к образованию гидроксильного радикала и защищает клетки от аутопероксидации мембраны. Повышение уровня ЛФ в сыворотке крови больных ГИ можно рассматривать как антиоксидантную защиту, осуществляемую НГ, и благоприятный прогностический признак, свидетельствующий о наступлении ремиссии (Брызжикова Т. С. и др., 1995).

Лактоферрин является маркером специфических гранул НГ, на внутренней мембране которых находится набор рецепторов этих клеток. Секреция ЛФ из специфических гранул сопровождается активацией рецепторного поля клетки за счет встраивания белков-рецепторов в наружную мембрану НГ. В динамике мы видим значительное повышение уровня ЛФ, достигающего максимальных значений в фазе ремиссии (см. табл. 11). Это может сопровождаться повышением функциональной активности НГ с последующей активацией клеток системы мононуклеарных фагоцитов, осуществляющих элиминацию возбудителя. Тем не менее мы наблюдаем повышенный уровень ЦИК в период ремиссии, что говорит о неполноценности клеток ММС, так как ВПГ имеет тропизм к этим клет-

кам и может повреждать их. Таким образом, наблюдается не-состоятельность клеток-эффекторов как в стадии обострения, так и ремиссии простого герпеса, которая в данном случае является лишь нестойким равновесием между организмом хозяина и возбудителем, накапливая потенциал для следующего цикла болезни.

Известно, что фагоцитоз сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК), генерируемых нейтрофилами в значительных количествах на начальных стадиях стимуляции иммунокомпетентных клеток. Образование АФК является важным моментом, обеспечивающим фагоцитарную активность нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов. Однако чрезмерно высокие концентрации АФК оказывают дестабилизирующее действие на клеточные мембраны, инициируют процессы перекисного окисления липидов, могут стать причиной угнетения фагоцитарной активности клеток. Для инактивации негативного воздействия АФК на клетки и ткани организма в последнем имеется система антиоксидантной защиты (АОЗ). Основным ферментом специфической АОЗ в организме считается супероксиддисмутаза (СОД). Наряду с СОД активными компонентами АОЗ являются каталаза, церулоплазмин, глутатион-пероксидаза, глутатион, аскорбиновая и мочевая кислота, глюкоза, маннит и пр.

Основным содержащим медь белком плазмы крови является церулоплазмин (ЦП). Он связывает 95% всей меди, использует ОН для ферментативной активности при окислении Fe^{2+} до Fe^{3+} , после чего железо связывается трансферрином. Существенно, что окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} в отличие от неферментативного окисления Fe^{2+} в присутствии кислорода не сопровождается образованием супероксиданиона (O_2^-). Поэтому в окислительных реакциях с участием ионов Fe^{2+} церулоплазмин оказывается основным антиоксидантом плазмы, своеобразной «ловушкой» для АФК (Логинов А. С, Матюшин Б. Н., 1994; Ои «egshlge «I. M. C. et al., 1979).

В сыворотках крови больных рецидивирующим ГГ уровень ЦП был значительно выше показателей здоровых лиц, что указывает на повышение антиоксидантного потенциала сыворотки крови в остром периоде болезни (см. табл. 11). Фаза клинической ремиссии характеризовалась снижением концентрации ЦП, однако уровень его оставался еще достоверно выше, чем у здоровых лиц. Это свидетельствует о напряжении системы АОЗ

и в периоде ремиссии ГИ, что, по-видимому, обусловлено необходимостью инактивации повышенных концентраций АФК.

Важную роль в ферментативной продукции АФК играют металлы переменной валентности (железо и медь). Основная роль трансферрина и лактоферрина в организме заключается в акцептировании свободного железа, что препятствует развитию реакций образования гидроксильного радикала (ОН), катализируемого ионами железа.

И. В. Дробот (1992) и В. В. Туркин (1994) показали, что у детей с псевдотуберкулезом и инфекционным мононуклеозом (вирус Эпштейна — Барр) увеличивался уровень не только иммунореактивной формы ЦП, значительно возрастало содержание в крови ферментативно-активной фракции этого белка. Последнее позволяет предполагать важную защитную роль именно этой формы ЦП, что, по-видимому, обусловлено способностью медьоксидазы инактивировать свободные радикалы, в избытке имеющиеся в очаге воспаления. Кроме этого, ЦП способствует усилению продукции антител, улучшает выработку ИЛ-1 активированными макрофагами, повышает пролиферацию цитотоксических Т-клеток и К-клеток. Таким образом, исследованные нами металлопротеиды (ЦП, ТФ и ЛФ) обладают не только антиоксидантными свойствами, но и являются важными компонентами системы неспецифической резистентности, обеспечивая устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям (Исаков В. А. и др., 1996; Туркин В. В., 1994).

В заключение следует отметить, что при рецидивирующей ГИ угнетены и разбалансированы системы Т- и В-клеточного иммунитета, которым отводится решающая роль в противовирусной защите. Вместе с тем наблюдается функциональная неполноценность многих факторов неспецифической резистентности организма. Причем выявленные нарушения в иммунном гомеостазе регистрируются в фазе рецидива и ремиссии заболевания, тем самым во многом предопределяя и объясняя развитие длительной персистенции герпесвирусов в организме с установлением рецидивирующего течения болезни. Вышеизложенные обстоятельства должны несомненно учитываться практическими врачами при лечении больных различными формами герпетической инфекции.

Глава 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

2.1. ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ И ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА ГЕРПЕСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

С

\» Уотрудники лабораторий различного профиля, постоянно соприкасаясь с вирусосодержащим материалом (кровь, моча, ликвор, слюна больного и др., зараженные лабораторные животные, инфицированные культуры клеток, куриные эмбрионы), подвергаются опасности заражения различными вирусными инфекциями. Несмотря на то что многие люди проиммунизированы, встречается лабораторное заражение ГВ.

В лабораториях различного профиля для профилактики заражения ГВ необходимо соблюдать ряд мер предосторожности. Люди с поражениями кожи, экземой и другими аналогичными заболеваниями не должны допускаться к работе с материалом, содержащим ГВ. Все лабораторные работники должны быть обследованы на наличие антител к данным вирусам (Е. Буске et al., 1988). При работе с вирусосодержащим материалом обязательно использование таких средств защиты, как перчатки, защитные очки и маски.

Во время работы избегать образования аэрозолей и попадания инфекционного агента на кожные покровы. Стол и другие поверхности, которые могли быть контаминированы, следует регулярно обрабатывать спиртом и другими дезинфектантами, эффективными в отношении ВПГ. Различные агенты, такие как спирт и другие органические растворители, детергенты, протеолитические ферменты, фосфатаза и желчь, являются сильными инактиваторами ГВИ. Данные вирусы термолабильны; они инактивируются при 50 - 52°C в течение 30 минут. При 37°C наступает инаktivация в течение 10 часов (Филдс В., Найпа Д., 1989).

Наиболее перспективные меры профилактики заражения ВПГ в лабораторных условиях — работа с микроскопическими препаратами, фиксированными сразу после забора материала метанолом или ацетоном.

Техника взятия крови и первичная обработка сывороток для серологических исследований

Кровь берут в асептических условиях из пальца. При известном навыке можно легко получить 1,0 - 1,5 мл крови. Перед процедурой кисть нагревают в теплой воде и вытирают чистым полотенцем. Палец, протерев спиртом, прокалывают стерильным копьём разового пользования. Кровь собирают в стерильную пробирку, а место укола смачивают йодом. Из локтевой вены кровь забирается в объеме 5,0 мл с соблюдением правил асептики.

На пробирке должна быть этикетка с указанием фамилии и инициалов больного, даты взятия крови. Для получения сыворотки пробирки с кровью оставляют при комнатной температуре на 30 - 40 минут до образования плотного сгустка и только после этого помещают в холодильник или прохладное место, не допуская замораживания, так как гемолизированная кровь непригодна для серологических исследований. В течение 24 часов сыворотка должна быть снята со сгустка. Для этого эритроциты осаждают центрифугированием, сыворотку отсасывают в стерильные пробирки, которые плотно закрывают резиновыми пробками, при этом не забывают о маркировке пробирок с сывороткой.

В сопроводительном документе указываются следующие сведения:

1. Наименование и адрес учреждения (отправителя).
2. Фамилия и инициалы больного, год рождения.
3. Диагноз и дата заболевания.
4. Цель исследования (методика).

Пересылка и хранение проб

В исследуемом материале ГВ могут сохранять инфекционность при 4°C в течение 2 - 3 дней. Особенно быстро вирус разрушается в крови, ликворе, моче. Поэтому пробы следует доставлять в лабораторию в день, когда забираются, или на следующий.

Более длительно пробы можно хранить при -70°C . Применение снятого молока обеспечивает при данной температуре сохранение инфекционного титра без изменений до 5 месяцев. Не следует помещать материал от больных при -20°C , так как при этой температуре ГВ быстро инактивируются. ГВ устойчивы к замораживанию и оттаиванию, хорошо переносят лиофилизацию, особенно в присутствии фрагментов ткани и не теряет активности в течение 10 лет и более.

Если полученный от больного материал не может быть сразу использован для заражения индикаторной культуры клеток, его помещают в транспортную среду. В качестве последней может быть использован раствор Хэнкса, сахарозо-фосфатный желатиновый бульон и др. В лабораторной практике для стабилизации вируса при хранении при $+4^{\circ}\text{C}$ с успехом используют 5% раствора глицерина, 0,5% раствора желатина, 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина. Вирусосодержащие ткани могут быть сохранены более 6 месяцев при температуре 4°C , если они находятся в 50% растворе глицерина. Зарубежные авторы описывают несколько типов коммерческих транспортных сред, стабилизирующих инфекционность ГВ (Johnson J. B. et al., 1988; Warford A. L. et al., 1988).

Наиболее оптимальный способ транспортировки — это помещение вирусосодержащего материала в транспортные вials с культурами клеток. В таких условиях возбудитель может сохраняться даже при комнатной температуре несколько дней, несмотря на дегенеративные изменения в эукариотических клетках (E. Lyske et al., 1988). Главные требования к транспортной среде заключаются в том, что она должна представлять собой питательный раствор, содержащий антибиотики (для подавления роста бактерий) и белок (для стабилизации вирусных частиц), а также иметь нейтральный pH. В случае использования клинического материала для заражения индикаторной культуры клеток в течение 3–5 дней после взятия у больного, его не рекомендуют замораживать. Он должен сохраняться при температуре не ниже 4°C . Так Yeager et al. показали, что при хранении ВПГ в течение 1–3 дней при -20°C происходит разрушение вирусных частиц и снижение инфекционности ПГ в 10^9 раз и более. Длительное хранение клинических образцов для последующего исследования следует осуществлять при их глубоком замораживании до температуры -70°C ; при этом оптимальная скорость замораживания равна 25°C в 1 минуту (Баринский И. Ф. и др., 1986).

2.2. ТЕРМИНОЛОГИЯ И ПРИНЦИПЫ ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ГВИ

Все методы индикации и идентификации вирусов на сегодня ограничиваются следующими главными приемами:

- выявление вируса *per se* (пример: электронная микроскопия);
- выявление и идентификация вирусов посредством взаимодействующих с ними клеток (пример: накопление вирусов в чувствительных к ним клетках);
- выявление и идентификация вирусов с помощью антител (пример: МФА, ИФА);
- индикация и идентификация нуклеиновых кислот (пример: ПЦР).

Электронная микроскопия

Быстрая диагностика позволяет обнаружить ГВ или их компоненты непосредственно в пробах, взятых от больного, и дать быстрый ответ через несколько часов. Возбудитель обнаруживаются помощью электронной микроскопии клинического материала при негативном контрастировании. Этот метод требует достаточно высокой концентрации возбудителя в пораженной ткани (10^{10} частиц в 1 мл суспензии). Большое значение приобретает метод ИЭМ, основанный на взаимодействии добавленных к материалу антител с вирусными частицами, что позволяет выявить возбудитель и его одновременно идентифицировать.

Серологические методы

Реакция нейтрализации

Реакцию биологической нейтрализации вируса (РН), основанную на способности специфических АТ достаточно прочно соединяться с вирусной частицей, начали применять еще на заре вирусологии. В результате взаимодействия между вирусом и АТ происходит нейтрализация инфекционной активности вируса вследствие блокады антигенных детерминант, ответственных за соединение вирусной частицы с чувствительными клетками. В результате вирус утрачивает способность размножаться в чувствительной к нему биологической системе *in vitro* или *in vivo*.

Детали РН и методы ее постановки описаны во многих руководствах (ПерадзеТ. В. и др., 1985).

Вируснейтрализующие антитела реагируют с вирусами 2 способами. Первый заключается в том, что молекулы антител двумя своими РаВ-концами перекрывают рецепторы вирусной частицы, ответственные за взаимодействие вируса с клетками в процессе инфекции. Такая связь чаще всего необратима и заканчивается полной нейтрализацией (инактивацией) вируса. Второй тип основан на бивалентности АТ и заключается в агрегации двух вирусных частиц с одним АТ и их последующей функциональной инактивации.

В РН участвуют 3 компонента:

- вирус;
- сыворотка, содержащая антитела;
- биологический объект (лабораторные животные, развивающиеся куриные эмбрионы, тканевые культуры), выбор которого зависит от вида вируса, с которым предполагается проводить исследования.

Хотя в различных лабораториях используют разные модификации РН, все они основаны на едином принципе специфической нейтрализации АТ инфекционной активности вируса, проявляющейся цитопатическим действием на культурах ткани, различными симптомами болезни или гибелью лабораторных животных, репродукцией и накоплением вируса в жидкостях развивающегося куриного эмбриона.

Среди модификаций данной реакции различают: микрометод РН, РН по цветной пробе, метод супернейтрализации, РН образования бляшек, тест радиальной нейтрализации бляшек.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) является одной из традиционных серологических реакций, применяемых для диагностики многих вирусных заболеваний, а также составляет основу некоторых других методов выявления противовирусных АТ.

Реакция нейтрализации, МФА превосходят РСК по чувствительности, однако простота методики, раннее обнаружение АТ, а также возможность выявлять вирусные АГ, не обладающие ГА, объясняют широкое применение РСК в вирусологических исследованиях. Для ее постановки не требуется такая высокая степень концентрации и чистоты антигенных препаратов,

которая необходима для ряда других реакций. Кроме того, групповая специфичность комплементсвязывающих антигенов многих вирусов позволяет использовать РСК при массовой диагностике; эта реакция, не выявляя штаммовых различий, приобретает особую ценность при изучении антигенных взаимосвязей между вирусами.

Само название в значительной мере отражает суть метода, состоящего из двух отдельных реакций. На первом этапе в реакции участвуют АГ и АТ (один из этих ингредиентов заранее известен), а также определенное количество предварительно оттитрованного комплемента. При соответствии АТ и АГ их комплекс связывает комплемент, что выявляют на 2-м этапе с помощью индикаторной системы (смесь бараньих эритроцитов и антисыворотки к ним). Если комплемент связался при взаимодействии АГ и АТ, то лизис бараньих эритроцитов не происходит (положительная РСК). При отрицательной РСК несвязанный комплемент способствует гемолизу, по которому судят о результатах реакции.

Основными компонентами РСК служат АГ (известные или выявляемые), АТ (известные антисыворотки или исследуемые сыворотки), комплемент, гемолитическая сыворотка и эритроциты барана; в качестве разбавителя используют изотонический раствор CaCl_2 (рН 7,2 - 7,4) или различные буферные системы. Антигены для РСК готовят из органов зараженных животных, из органов, аллантоисной или амниотической жидкости зараженных куриных эмбрионов, а также из жидкой среды инфицированных тканевых культур. В последнее время применяют сухие коммерческие диагностикумы. Комплемент — сложная система белков и факторов, присутствующих в крови животных и человека. Обычно в РСК применяют сыворотку крови морских свинок. Активность (титр) комплемента — это его наименьшее количество, вызывающее полный гемолиз используемой гемолитической системы. Необходимо отметить, что титрование комплемента следует проводить в том объеме, который будет применяться в основном опыте. При выявлении комплементсвязывающих антител к вирусам сыворотки разводят 1: 4 или 1: 8 и обязательно инактивируют для устранения комплемента (56°C, 30 минут).

Среди модификаций РСК имеются:

- микрометод РСК;
- реакция непрямого связывания комплемента;
- РСК в геле;

- РСК микрокапельным методом;
- РСК на твердой основе.

Данные модификации давно применяются в практических лабораториях и в настоящее время являются рутинными (Перадзе Т. В. и др., 1985).

Реакция агглютинации латекса

Реакция агглютинации латекса (РАЛ) известна уже около 40 лет и в медицинской вирусологии нашла широкое применение.

Данная реакция по своему механизму аналогична РНГА, в которой используют сенсibilизированные АГ или АТ эритроциты человека или животных. Для постановки РАЛ применяют сенсibilизированные частицы полистирольного латекса, которые в присутствии гомологичного иммунологичного реагента склеиваются. Обычно эта реакция проходит очень быстро в течение 3–8 минут, что позволяет применять ее в качестве экспресс-метода выявления АГ или АТ.

Описаны следующие варианты и модификации РАЛ:

- РАЛ с АГ диагностикумами;
- РАЛ с АТ диагностикумами;
- РАЛ с иммунными комплексами;
- реакция торможения агглютинации латекса;
- РАЛ с коммерческими наборами;
- РАЛ с гепаринизированной плазмой;
- «Макромодификация» РАЛ;
- выявление **1аМ** антител.

Так как обнаружение макроглобулинов имеет особо важное значение в ранней диагностике вирусных инфекций, то интерес представляет одна из модификаций реакции с использованием частиц латекса, сенсibilизированных АГ. Вначале в лунке пластинки для микротитрования вносят сыворотку против **1бМ** человека, затем исследуемую сыворотку больного с подозрением на вирусную инфекцию. Содержавшиеся в сыворотке *1цШ* антитела ковалентно «пришиваются» к находящимся на стенке лунки анти $\wedge$ М, а затем на этих антителах сорбируются частицы латекса, сенсibilизированные соответствующим АГ. При отсутствии $\wedge$ М антител частицы латекса свободно оседают на дно лунки в виде «пуговки» — реакция отрицательна. При сопоставлении данной модификации РАЛ с более трудоемкими иммуноферментными реакциями были получены идентичные результаты (Перадзе Т. В. и др., 1985).

Иммунофлюоресцентный метод

Наилучшим фиксатором для вирусных антигенов является ацетон, который способен подавлять инфекционность большинства вирусных агентов, срезы тканей, мазки фиксируют в охлажденном ацетоне в течение 10 минут, лучше при температуре 4°C. Затем высушивают 20 минут при ЗТС или более длительно при комнатной температуре. Для идентификации ВПГ используют 3 метода флюоресцентного окрашивания:

- прямой метод иммунофлюоресценции;
- непрямой метод иммунофлюоресценции;
- использование окраски флюоресцирующим веществом комплекса.

Прямой метод иммунофлюоресценции

Данный метод основан на обнаружении в препаратах комплекса:

АНТИГЕН + МЕЧЕНЬШ ФЛУОРОХРОМ = РЕЗУЛЬТАТ

Широкое практическое применение нашел первый из них, метод прямой иммунофлюоресценции. Он является более специфичным, требует минимальных затрат времени (не более 30 - 60 минут).

На исследуемые препараты наносят 0,02 - 0,05 мл флюоресцирующей специфической сыворотки (поликлональной или моноклональной), содержащей БСА, меченной родамином или синькой Эванса. Их используют как контрастирующие вещества, на контрольные препараты наносят конъюгированную отрицательную или гетерогенную сыворотку, желательно проводить контрольное исследование и с предметными стеклами, на которые нанесен препарат, содержащий ГВ (такие пробы часто прилагаются к наборам диагностических препаратов).

Для увеличения специфичности исследования рекомендуется использовать различные разведения сыворотки, меченной флюоресцирующим веществом. На одно и то же стекло, содержащее отпечатки или материал, нанесенный тонким слоем, нередко можно наносить по 2 - 3 различных диагностических антителосодержащих препарата или их разведений. Это не только интенсифицирует забор материала и делает его менее травматичным, но и позволяет одновременно исследовать гомогенный материал (один пласт клеток).

Окраска. Мазки-соскобы или мазки-отпечатки подсушивают на воздухе, фиксируют в охлажденном до 4 - 8°C химически чи-

стом ацетоне в течение 10 минут. Флуоресцирующие иммуноглобулины к ГВ разводят в 0,5 мл дистиллированной воды и готовят указанное разведение, как указано на этикетке. Фиксированные мазки помещают во влажную камеру (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумажкой на дне), наносят по капле флуоресцирующего препарата в рабочем разведении, равномерно распределяют по мазку и помещают в термостат при температуре 37°C на 25 минут, споласкивают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре (под вентилятором).

Микроскопия и оценка результатов

Мазки просматриваются под люминесцентным микроскопом типа МЛ-2, МЛД, ЛЮМАМ, используя масляную имерсию (объектив МИ 90х, окуляр 4х) или водную (объектив ВИ 70х, окуляр 4х) и комбинацию фильтров: БС-15-2, СЭС-7-2, ФС-1-2, ФС-18. При оценке результатов обращают внимание на характер и количество антигенсодержащих клеток, локализацию специфического свечения и его интенсивность. Положительным считается мазок, в котором содержится не менее 3 морфологически не измененных клеток эпителия, с интенсивной специфической флуоресценцией типичной локализации не менее чем на ++.

Непрямой метод иммунофлуоресценции

Этот метод основан на обнаружении в препаратах комплекса: (АНТИГЕН + АНТИТЕЛО) + МЕЧЕНЬЙ ФЛУОРОХРОМ = РЕЗУЛЬТАТ

Основан на двухступенчатой реакции. Препараты на первом этапе исследования обрабатывают немеченной специфической иммунной сывороткой, на втором — меченной флуорохромом антивидовой иммунной сывороткой. При непрямом методе необходимо использовать в качестве контроля дополнительно препараты, обработанные нормальной сывороткой животного, от которого получена специфическая иммунная сыворотка, с последующей обработкой их меченной антивидовой иммунной сывороткой.

Иммунофлуоресцентный метод со связыванием комплемента

Данный метод основан на обнаружении в препаратах комплекса:

АНТИГЕН + АНТИТЕЛО + КОМПЛЕМЕНТ = РЕЗУЛЬТАТ
Преимуществом его является применение только одного типа

флюоресцирующего конъюгата — сыворотки, иммунной к глобулину морской свинки. Конъюгированная сыворотка фиксируется в тех местах препарата, где антиген адсорбирует специфические антитела. Комплемент морской свинки используется в разведении 1:10. Оба эти этапа инкубации и с антителами против ГВ и комплементом, с меченой сывороткой проводят во влажной камере при 25°C (Каролиева А. Ф., Сюрин В. Н., 1980).

Этот метод диагностики становится более быстрым, если в реакции используется комплемент, меченый флюоресцирующим веществом.

Иммунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента в настоящее время применяют крайне редко, так как комплемент достаточно быстро теряет свою активность и может использоваться не для всех реакций между антигеном и антителом. Методом флюоресценции вне зависимости от его модификации исследуют самые различные пробы, мазки, соскобы, отпечатки, полученные после нанесения клеток, культуры ткани, зараженной материалом, ликвора, крови, спермы, слезной жидкости и мочи.

Анализ материала осуществляется при помощи люминесцентного микроскопа в сине-фиолетовой части спектра, используют объектив и иммерсионную систему (на предметное стекло наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло; глицерол или элванол).

Данные методики на сегодня являются в основном ручными. Однако в США запатентован метод и прибор для изучения вирусной инфекции, функционирующий на основании автоматического определения (Патент США 5187749, 1993 год). Прибор для исследования вирусной инфекции состоит из микроскопа для наблюдения флюоресцирующих изображений АГ-позитивных и негативных клеток, окрашенных с помощью непрямой методики флюоресцирующих АТ при использовании сывороток к изучаемому объекту. Специальный блок преобразует наблюдаемые в микроскоп флюоресцентные изображения в данные, описывающие полученное изображение. Блок детекции обрабатывает вышеуказанные данные и выявляет распределение внутриклеточного свечения. Блок определения выдает результаты о присутствии/отсутствии изучаемой вирусной инфекции на основании различий между распределениями флюоресцентного свечения, выявляемых блоком детекции.

Иммуноферментный метод

Иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии как в нашей стране, так и за рубежом (Егеров А. М. и др., 1991). На сегодняшний день разработано более 30 вариантов различных методов ИФА.

Основан на переводе АТ в нерастворимое состояние путем пассивной адсорбции на твердой основе поверхности полистироловых проб.

Первый этап реакции — сорбция АГ или АТ на твердый носитель (панели, шарики и др.). В прямом варианте на твердой фазе сорбируют специфические антитела и после удаления избытка добавляют материал, содержащий АГ. После отмывания несвязавшегося АГ вносят иммуноглобулин, меченный пероксидазой или щелочной фосфатазой. Непрямой вариант включает в себя дополнительный этап — введение меченых антивидовых АТ против глобулинов иммунизированных животных. Конкурентный метод основан на конкуренции известного и исследуемого АГ за участки связывания с АТ. Результаты ИФА регистрируют визуально или с помощью специального устройства (ридера). Специфичность определяют по изменению окраски добавленного в систему субстрата ферментов. Интенсивность окраски пропорциональна количеству связанного фермента, которое в свою очередь соответствует количеству АТ в исследуемой сыворотке.

Иммуноблот (ИБ)

Метод тестирования твердофазным иммунологическим анализом электрофоретически разделенных белков или полипептидов. ИБ предполагает проведение следующих операций:

- электрофоретическое разделение исследуемого материала на индуцированные белки или полипептиды в геле;
- получение реплики путем переноса белков или полипептидов с геля на твердофазный матрикс;
- блокирование незанятых центров связывания матрикса;
- инкубирование со специфической тест-сывороткой;
- отмывание от избытка сыворотки;
- инкубирование с меченым иммунореагентом на антитела специфической сыворотки;
- отмывание от избытка меченого иммунореагента;
- выявление тестируемых белков или полипептидов с помощью метки иммунореагента.

Молекулярно-биологические методы диагностики ГВИ

Начиная с середины 80-х годов появились работы, посвященные использованию ПЦР в таких областях медицины, как исследование наследственных заболеваний, изучение вирусных, бактериальных и микотических инфекций, а также в судебной медицине (Золотарев Ф. Н., 1989; Иващенко Т. Э. и др., 1991; Кашеева Т. К. и др., 1991; Воейтке М. et al., 1989).

В основе метода лежит полимеразная реакция с использованием термостабильной полимеразы и праймеров, соответствующих определенным участкам искомой ДНК (Цинзерлинг А. В., 1993; Рогтап М. et al., 1989; Мапош М., 1989). В качестве праймеров используют олигонуклеотиды, содержащие обычно около 20 оснований. В процессе амплификации ДНК, основанной на ПЦР, имеется 3 периода, составляющих один цикл. В начале реакции происходит денатурация ДНК при температуре 90 - 95° С. Следующий период — отжиг праймеров на однонитевую ДНК при температуре около 50° С. Синтез в присутствии полимеразы протекает при температуре около 70° С. Продолжительность каждого периода — от 1 до 3 минут. Число циклов обычно колеблется от 20 до 40 (Виноградская Г. Р. и др., 1990). Чувствительность метода позволяет определить одну молекулу искомой ДНК в образцах, содержащих 10 клеток. Экспоненциальная аккумуляция фрагментов ДНК позволяет получить их в количестве 2^п, где п — число циклов (БаНи ГЧ. К. et al., 1988). ГЧ. К. БаНи (1985), описывая использование ПЦР для пренатальной диагностики серповидноклеточной анемии, говорит об увеличении копий ДНК в 22000 раз.

В большинстве случаев ПЦР требует предварительного биохимического выделения ДНК из исследуемых образцов (Золотарев Ф. Н., 1989). Однако Брали (8рапп\Г. et al., 1991) опубликовал работу, посвященную амплификации ДНК вируса при проведении ПЦР непосредственно в клетках. Метод позволяет визуализировать пораженные и интактные клетки в мазках костного мозга и периферической крови при использовании радиоактивной метки.

В статье Т. Э. Иващенко с соавт. (1991) описано применение ПЦР и секвенирования для диагностики наследственных болезней. Приводится сравнительный анализ частоты делеции хромосомного фрагмента 508 у больных муковисцидозом. <1. ГЧ. McCarrey (1989) сообщает об обнаружении вирусных ДНК

и мРНК в инфицированных цитомегаловирусом фибробластах. Вирусную мРНК дифференцировали от ДНК, используя праймеры, фланкирующие место сплайсинга, результатом чего явился более короткий продукт реакции (Bliffone G. J. et al., 1990).

Имеются работы, посвященные выявлению вирусной ДНК методом амплификации (Evans A. S., 1989; Warford A. L. et al., 1989). Полученный при ПЦР амплификат можно верифицировать различными молекулярными методами: гибридизацией с известной последовательностью ДНК, расщеплением амплификата в определенном сайте рестриктазой, секвенированием амплифицированной ДНК (Boehnke M. et al., 1989; Chou S., 1990; Giebel L. B. et al., 1990).

Секвенирование обычно осуществляют методом, описанным А. Махат и W. Gilbert (1980), или по F. Sanger (1977). Условием для секвенирования по А. Махат и W. Gilbert является наличие меченной радиоактивной меткой ДНК, которую последовательно расщепляют в четырех отдельных реакциях, соответствующих каждому из четырех нуклеотидов. Распределение полученных отрезков ДНК в геле при электрофорезе согласно их длине позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность исследуемой ДНК (Matsuoka I. et al., 1990; Maxam A. et al., 1980; Sanger F. et al., 1977).

Секвенирование по F. Sanger предусматривает использование меченных радиоактивной меткой трифосфатов и четырех видов терминаторов, в роли которых выступают дидезоксирибонуклеотиды. Проведение четырех параллельных реакций полимеризации, в каждой из которых используется определенный терминатор, дает возможность проследить последовательность нуклеотидов в ДНК (Gyllensten U. B. et al., 1988; Ruger R. et al., 1984; Stofflet E. S. et al., 1988).

2.3. ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

В связи с тем, что клинические формы ГВИ характеризуются выраженным полиморфизмом, своевременное установление этиологического диагноза представляет собой трудную задачу и основывается на использовании специальных молекулярно-биологических, вирусологических, серологических, цитологических и иммунологических исследований (Баринский И. Ф. и др., 1986; Ивановская Т. Е. и др., 1989).

Серологические методы, выявляющие антитела к этим вирусам, имеют лишь относительную диагностическую ценность и не позволяют с достаточной степенью достоверности установить этиологию той или иной формы заболевания (Коломиец А. Г. и др., 1992; Evans A. S. et al., 1989). Так, нарастание титра антител в крови может быть связано с обострением хронической герпетической инфекции, а с другой стороны — развитие герпетического энцефалита, например, может протекать на фоне стабильного нарастания уровня антител, который был достигнут в результате предшествовавшей инфекции (Баринский И. Ф. и др., 1986). Помимо этого, для установления четырехкратного нарастания титра антител к ГИ необходимо исследование парных сывороток, и, таким образом, результаты серологического исследования могут служить лишь для ретроспективной диагностики тех же энцефалитов (Цинзерлинг А. В., 1993).

Наиболее точными методами диагностики герпетической инфекции является выделение вируса из различных клеточных культур (Баринский И. Ф. и др., 1980; 1986; Эбралидзе Л. К. и др., 1991; Canessa A., 1990).

Существует целый ряд экспресс-методов выявления вирусов и вирусных антигенов (Кибардин В. М. и др. 1989, Aurelius E. et al., 1991), имеющих высокую специфичность, но более низкую чувствительность по сравнению с методом выделения вируса в клеточных культурах (Librado V. et al., 1990). Для быстрого выявления в клинических материалах вируса простого герпеса с помощью латекс-агглютинации апробирован специальный тест (Gleaves E. A. et al., 1988). Экспресс-диагностика герпеса может также осуществляться с помощью моноклональных антител (Canessa A., 1990). Для выявления одного геномного эквивалента в клетке используют гибридизацию молекулярных зондов *per se* или с клетками инфицированной ткани на срезах *in situ* (Fluit A. C. et al., 1989; Hukkanen V. et al., 1990).

В основе метода молекулярной гибридизации лежит выявление вирусспецифических нуклеиновых кислот в исследуемом материале путем гибридизации с меченым зондом. В качестве зонда используются рекомбинантные молекулы, содержащие специфические последовательности вирусного генома (Золотарев Ф. Н., 1989). В настоящее время для выявления в клетках нуклеиновых кислот герпесвирусов используют различные варианты метода гибридизации *per se* и *in situ*. Как правило, эти различия связаны не с самой процедурой гибридизации, а с методами

мечения зондов и способами их визуализации. Наибольшее распространение имеет способ радиоактивного мечения с помощью ^{32}P в реакции ник-трансляции с последующим выявлением метки методом автордиографии. В последние годы для повышения специфической удельной активности молекулярных зондов используется метод случайного праймирования, при котором удельная активность мечения повышается на 1 - 2 порядка. Это значительно увеличивает чувствительность метода, позволяя выявлять единичные геномные эквиваленты вирусов в клетках (Nago И. е! al., 1988). Наибольшей чувствительностью для выявления ДНК герпесвирусов характеризуется полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР может считаться самой чувствительной и быстрой реакцией применительно к целям лабораторной диагностики герпетических инфекций (!Зпоспе!тап С е!. al., 1988).

Выделение ВПГ на чувствительных системах (культурах клеток, животных) — один из наиболее чувствительных и специфических методов для установления диагноза ГИ (Коломиец А. Г. и др., 1992). В зависимости от локализации герпетических поражений исследованию подвергают различные материалы от больного.

Техника взятия проб

С наибольшей вероятностью ВПГ можно выделить из содержимого везикулы после ее вскрытия. Материал отбирается капилляром или шприцем. В ряде случаев жидкость собирается предварительно смоченным тампоном. Затем тампон помещают в питательную среду и обжимают об стенки пробирки (флакона). Аналогично забирают материал со слизистых поверхностей (урогенитальный тракт, конъюнктивы и т. д.).

При взятии проб из уретры тампон вводят на 2 см внутрь и совершают им вращательные движения, после чего осторожно извлекают и помещают в транспортную среду. В ряде случаев проводятся попытки выделения вируса из соскобов с роговой оболочки и жидкости из передней камеры глаза, крови, слюны, фекалий, мочи, из смывов, отделяемого различных органов, кусочков органов и тканей, взятых при биопсии или вскрытии. При подозрении на герпетический энцефалит рекомендуется (Е. Буске *et al.*, 1989) использовать материал, полученный при биопсии лобновисочной доли.

Электронная микроскопия в диагностике ВПГ инфекции предложена еще в 1972 году (КоБауа8Ы, 1972). Рекомендована

для экспресс-диагностики. Препараты готовят из содержимого везикул (аспирация шприцем, содержащим 0,1 мкл дистиллированной воды), из жидкой фракции растертых в дистиллированной воде корочек (подсохших везикул), из смывов, полученных с мазков отпечатков. Препараты контрастируют фосфорно-вольфрамовой кислотой (2% раствор pH — 7,0) и просматривают в электронном микроскопе. Метод негативного контрастирования позволяет при наличии в материале хотя бы 1 млн. частиц на 0,1 мл суспензии обнаружить вирионы, принадлежащие к семейству герпесвирусов (Бочаров А. Ф. и др., 1982).

Кроме того, при помощи электронной микроскопии возможен подсчет частиц по методу «loop agor» (нанесение капли на сетку с помощью петли). Для этого образец исследуемого вируса смешивают с равным объемом суспензии шариков латекса с известной концентрацией. Полученную смесь после негативного контрастирования наносят на сеточки для электронной микроскопии и сравнивают число латекса и вирусных частиц в одних и тех же полях зрения. Зная концентрацию шариков в исходной смеси, нетрудно подсчитать концентрацию вирусных частиц (Мейхи Б., 1988).

Электронно-микроскопические исследования показали, что в отделяемом герпетических пузырьков содержится до 10 инфекционных частиц вируса в 1,0 мл жидкости (Баринский И. Ф. и др., 1986).

Сканирующая электронная микроскопия в ряде случаев также используется для диагностики ВПГ инфекции для изучения поверхности зараженных клеток, а также для определения поверхностных антигенов.

Дифференциация ВПГ от других морфологически неотличимых вирусов семейства герпеса может быть выполнена при использовании иммунной электронной микроскопии (Баринский И. Ф. и др., 1986).

Цитологические методы исследования

Исследования при помощи световой микроскопии мазков, отпечатков, соскобов, препаратов, приготовленных из отделяемого, смывов из органов крови, материала полученного при биопсии, являются наиболее доступным, быстрым, дешевым и безопасным для лабораторных работников методом исследования материала на наличие у больного вирусной инфекции. После

нанесения материала на предметное стекло препарат высушивают, фиксируют и окрашивают.

Существуют несколько методов окраски для цитологического исследования мазков на ВПГ с предварительной фиксацией 96% этиловым спиртом по Папаниколу (гемотоксилин, фосфорновольфрамовая кислота, оранжевый 9, световой зеленый, бисмарк коричневый и эозин) и по Селлеру-Павловскому (основной фуксин и метиленовый синий), а также с предварительной обработкой Май — Грюльвальдом и нанесением красителя Романовского — Гимзы.

Материалом для цитологического исследования может служить содержимое везикул, соскоб со дна эрозии, слизистой уретры, стенок влагалища, канала шейки матки.

Полученный инфицированный материал равномерно наносится на обезжиренное (смесью Никифорова) предметное стекло и высушивается на воздухе.

Техника проведения исследований

Мазок фиксируют 95% этиловым спиртом 30 - 40 минут и окрашивают:

1. 95% спирт — 10 секунд;
2. Дистиллированная вода — 10 секунд;
3. Гематоксилин — 6-8 минут;
4. Промывка дистиллированной водой — 10-15 минут;
5. Зритрозин 0,1% — 30-60 секунд;
6. 95% спирт — 2 минуты;
7. Абсолютный спирт — 3 минуты;
8. Ксилол — 5 минут.

Мазок просматривают в световом микроскопе. При цитологическом исследовании обнаруживаются многоядерные гигантские клетки с внутриядерными включениями.

Впервые характер изменений эпителиальных клеток при герпесе описали в 1955 г. Blank и Rake. Дальнейшее свое развитие цитологический метод получил в нашей стране благодаря Л. Н.Тарасовой (1965), Муравьевой Т. В. (1973), Цинзерлинг А. В. (1991,1993) и др. В 1960 - 70-е годы это был практически единственный способ лабораторного выявления герпетической инфекции. Авторы, описывающие характер цитологических изменений, вызванных ВПГ, отмечают разрыхления пласта эпителия, изменение формы ядра (становятся похожими на боб, песочные часы), перемещение его к одному полюсу, утолщение

кариолеммы (очаговые редупликации), маргинация хроматина, скопление хроматина в глыбки, полный лизис ядерных веществ, наличие внутриядерных включений, цитоплазма вакуолизируется и даже может исчезнуть (остаются «голые» ядра).

Внутриядерные включения при ВПГ инфекции многие авторы называют тельцами Каудри типа А. Единого мнения в отношении природы этих образований не существует. Одни исследователи считают, что отмеченные включения являются случайными артефактами при применении кислых фиксаторов, другие считают внутриядерные включения Каудри типа А специфическим материалом, связанным с репродукцией вируса герпеса. По мнению этих исследователей, включения состоят из тонкого гранулярного материала с пучками фибриллярных структур, вирусных частиц, мембранных осколков (Бочаров Е. Ф., 1984; Козлова В. И., Пухнер А. Ф., 1994). В остром периоде заболевания нередко выявляются образовавшиеся вследствие амитотического деления гигантские многоядерные клетки. Форма этих клеток неправильная, число в мазках соскобов, когда материал забирается из более глубоких слоев элемента высыпания на коже или слизистой, в первые 3 - 4 дня с момента их появления.

Часто встречается лимфоидная реакция с наличием средних, больших лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов.

Морфологические изменения клеток, вызванных ВПГ, вне зависимости от локализации процесса, имеют свои характерные проявления и могут частично сохраняться в течение некоторых месяцев после выздоровления.

Недостатком цитологического метода диагностики является невозможность дифференцирования первичной инфекции от рецидивирующей, типа ВПГ (Баринский И. Ф., Шубладзе А. И. и др., 1986), в ряде случаев по характеру цитопатического действия возбудителя можно доказать лишь вирусную природу.

Цитохимические методы исследования с использованием флюорохромов, избирательно окрашивающих РНК и ДНК, также позволяет достаточно быстро обнаружить внутриядерные включения, характерные для ВПГ. Фиксацию мазков проводят в метиловом спирте в течение 10 минут, затем их подсушивают на воздухе и окрашивают акридин-оранжевым (в разведении 1:10000 в цитратно-фосфатном буфере pH 5) 1 минуту. После этого препарат подсушивают фильтровальной бумагой и просматривают в люминесцентном микроскопе (фильтр БС-9, ДС-1, С36-14).

ДНК-содержащие ядра окрашиваются в зеленый цвет. Цитоплазма обычно также окрашивается в зеленый цвет. При усиленном метаболизме клеток РНК цитоплазмы и ядра имеет красноватый оттенок. Вирусные включения в цитоплазме и ядре могут иметь различную окраску от красных незрелых (РНК-содержащих), до желто-зеленых зрелых (ДНК-содержащих) включений различной формы и размеров.

Описанный метод, активно использовавшийся в 70-е годы, особенно при диагностике офтальмогерпеса (Кацнельсон А. Б., 1969), не обладает достаточной специфичностью и чувствительностью. Однако он может быть применен как вспомогательное диагностическое средство, позволяющее в ряде случаев при отсутствии изменений в клетках сэкономить более дорогостоящие препараты.

Гистологическая диагностика

Для этого используют гистологические срезы тканей, взятых при биопсии, а в основном — при аутопсии. В мозговой ткани погибших от герпеса людей имеются специфические морфологические изменения в виде менингоэнцефалита с очагами некроза в полушариях мозга. Характерны также макро- и микроизменения других органов. Особенно значительными бывают фокально-некротические поражения печени и надпочечников. Сходные очаги некроза наблюдаются на слизистой рта, пищевода и желудка. В сердце обнаруживается вакуолярная дегенерация, в легких — отек альвеолярных перегородок, интерстициальная пневмония (Бочаров А. Д. и др., 1982)

Подробно клинико-анатомические проявления описаны в сборнике научных трудов «Простой герпес (этиология, диагностика, клинико-анатомические проявления)» под редакцией А. В. Цинзерлинга (1988).

Серологические методы диагностики

Реакция нейтрализации

РН с ВПГ 1-го и 2-го типов ставят различными способами:

- на ХАО куриных эмбрионов, где вирус герпеса образует характерные «оспины»;
- внутримозговым заражением новорожденных белых мышей, приводящим к их гибели;
- в культурах ткани, где происходят характерные цитопатические изменения и образуются гигантские клетки

с включениями или формируются бляшки под агаровым или метилцеллюлозным покрытием.

При титровании АТ в сыворотках готовят их 2- или 4-кратные разведения, которые соединяют с постоянной дозой вируса. В зависимости от выбранной для РН биологической системы варьирует и доза вируса:

- при постановке РН на ХАО куриных эмбрионов применяют 100 БОЕ в 0,05 мл;
- при постановке РН на белых мышках-сосунках каждое разведение сыворотки соединяют с 300 ЛД₅₀ в 0,5 мл;
- в культурах ткани используют 100 - 200 БОЕ в 0,1 мл для угнетения формирования бляшек или 1000 ТЦД₅₀ в 0,1 мл в целях подавления ЦПД вируса.

В каждый опыт включают контроли НКС в разведении 1:16 (для исключения действия неспецифических ингибиторов) и иммунной кроличьей сыворотки в концентрации, полностью нейтрализующей рабочую дозу вируса.

РН обычно ставят на перевиваемых клетках почек обезьян Уего и на первичных клетках эмбриона человека или хомяка ВНК-21, используют также более удобную микромодификацию РН, имеющую одинаковую чувствительность с макрометодом РН и превышающую в 2,5 раза по этому показателю РСК. Однако при выявлении антител в сыворотках людей микромодификация РН в 40 раз менее чувствительна, чем ИФА.

Предложен метод прямой микронеutralизации, позволяющий обнаружить и типировать ВПГ в клиническом материале уже через 3 дня (Перадзе Т. В. и др., 1985). Вируссодержащий материал (мазок) из очага поражения помещают в среду Игла с 0,11% CaHCO_3 и 20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота. Готовят десятикратные разведения этого материала и вносят по 1 капле в лунку пластиковой микропанели. В 3 ряда лунок вносят контроли вируса с комплементом, без него и с иммунной сывороткой против ВПГ 1-го и 2-го типов. Панели инкубируют в течение 1 часа при 37°C, после чего в каждую лунку вносят по 1 капле суспензии свежетрипсинизированных клеток Уего в концентрации 10⁶ в 1 мл. После 3 дней инкубации при 37°C клетки фиксируют и окрашивают. При исследовании 50 проб от 39 больных методом прямой микронеutralизации в 46 были выявлены вирусы герпеса (92%). В 50% образцов находился ВПГ 1-го типа, в 32% — 2-го типа а в 10% проб, тип вируса идентифицирован не был.

Реакция связывания комплемента

Традиционным остается применение РСК в диагностике ГИ. Эту реакцию ставят не только для выявления АТ к этим вирусам, но и для их типирования.

Имеются отдельные сообщения о неудачах или нецелесообразности применения РСК при ГИ (Перадзе Т. В. и др., 1985), а также о значительно большей чувствительности других методов, например ИФА. Однако многие исследователи с успехом используют РСК для серодиагностики инфекций, обусловленных вирусами простого герпеса.

При изучении различных гуморальных реакций иммунитета, проведенном у 119 больных хроническим герпетическим стоматитом в периоды рецидива и ремиссии, применяли РСК в двух вариантах:

1. Микрометод на пластинках в обычной постановке для определения уровня комплементсвязывающих АТ;
2. РСК с предварительной обработкой сывороток гидрохлоридом цистеина для выявления $\hat{M}$ - и $\hat{v}$ -антител к вирусу простого герпеса. У 50% больных в период рецидива отмечен низкий уровень (0-1: 20) АТ в РСК; в период выздоровления и ремиссии АТ в титре не выше чем 1: 20 обнаружены только у 26% больных, а в высоких титрах — у 74%, в том числе у 28% — в титре 1: 160. При остром первичном герпетическом стоматите у 55% больных отмечали положительные результаты РСК, при этом выявлена корреляция между титрами комплементсвязывающих АТ и тяжестью клинических проявлений (Перадзе Т. В. и др., 1985).

Иммунофлюоресцентный метод

Для идентификации ВПГ используют 3 метода флюоресцентного окрашивания:

- прямой метод иммунофлюоресценции;
- непрямой метод иммунофлюоресценции;
- использование окраски флюоресцирующим веществом комплемента.

Прямой метод иммунофлюоресценции

Широкое практическое применение нашел первый из них, метод прямой иммунофлюоресценции. Он является более специфичным, требует минимальных затрат времени (не более 30 - 60 минут).

На исследуемые препараты наносят 0,02 - 0,05 мл флюоресцирующей специфической сыворотки (поликлональной или моноклональной), содержащей БСА, меченной родамином или синькой Эванса. Их используют как контрастирующие вещества, на контрольные препараты наносят конъюгированную отрицательную или гетерогенную сыворотку, желательнее проводить контрольное исследование и с предметными стеклами, на которые нанесен препарат, содержащий ВПГ (такие пробы часто прилагаются к наборам диагностических препаратов).

Для увеличения специфичности исследования рекомендуется использовать различные разведения сыворотки, меченной флюоресцирующим веществом. На одно и то же стекло, содержащее отпечатки или материал, нанесенный тонким слоем, нередко можно наносить по 2 - 3 различных диагностических антителосодержащих препарата или их разведений. Это не только интенсифицирует забор материала и делает его менее травматичным, но и позволяет одновременно исследовать гомогенный материал (один пласт клеток).

Окраска. Мазки-соскобы или мазки-отпечатки подсушивают на воздухе, фиксируют в охлажденном до 4 - 8°C химически чистом ацетоне в течение 10 минут. Флюоресцирующие иммуноглобулины к ВПГ разводят в 0,5 мл дистиллированной воды и готовят разведение, как указано на этикетке. Фиксированные мазки помещают во влажную камеру (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумажкой на дне), наносят по капле флюоресцирующего препарата в рабочем разведении, равномерно распределяют по мазку и помещают в термостат при температуре 37°C на 25 минут, споласкивают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре (под вентилятором).

Микроскопия и оценка результатов

Мазки просматриваются под люминесцентным микроскопом типа МЛ-2, МЛД, ЛЮМАМ, используя масляную имерсию (объектив МИ 90х, окуляр 4х) или водную (объектив ВИ 70х, окуляр 4х) и комбинацию фильтров: БС-15-2, СЭС-7-2, ФС-1-2, ФС-18. При оценке результатов обращают внимание на характер и количество антигенсодержащих клеток, локализацию специфического свечения и его интенсивность. Положительным считается мазок, в котором содержится не менее 3 морфологически не измененных клеток эпителия, с интенсивной специ-

фической флюоресценцией типичной локализацией не менее чем на ++. Для ВПГ характерна локализация в ядре, ядре и цитоплазме одновременно.

Непрямой метод иммунофлюоресценции

При использовании этого метода могут возникнуть проблемы, обусловленные наличием гликопротеида Е (gE), принадлежащего ВПГ и находящегося, главным образом, на поверхности инфицированной эукариотической клетки. Показано, что этот гликопротеид адсорбирует на себя IgG, связываясь с Fc-фрагментом антитела. Однако gE не вступает во взаимодействие с Ig G3 и мышинным IgG (Johansson et al., 1984, 1985). Способность вызывать неспецифическую иммунофлюоресценцию при взаимодействии gE и IgE в большей степени характерна для клеток, инфицированных ВПГ-1.

Разработали метод непрямой цитометрической иммунофлюоресценции (Caruso A., et al., 1993) в потоке с высокой чувствительностью и специфичностью. Определяли АТ против ВПГ типов 1,2. Сравнивали чувствительность с ИФА. Использовали в качестве мишеней зараженные вирусом и фиксированные клетки линий Н9 и U937. Метод апробирован на 50 сывороток людей, которые содержали АТ против ВПГ-1, 10 — против ВПГ-2, 58 — против 2 вирусов, 50 — сероотрицательных сывороток. Показали, что метод высокочувствителен и типоспецифичен. Результаты хорошо совпали с результатами ИФА.

Иммунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента

Этот метод диагностики становится более быстрым, если в реакции используется комплемент, меченный флюоресцирующим веществом.

Иммунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента в настоящее время применяют крайне редко, так как комплемент быстро теряет свою активность и может использоваться не для всех реакций между антигеном и антителом. Метод флюоресценции вне зависимости от его модификации исследуют самые различные пробы, мазки, соскобы, отпечатки, полученные после нанесения клеток, культуры ткани, зараженной материалом, ликвора, крови, спермы, слезной жидкости и мочи.

Анализ материала осуществляется при помощи люминесцентного микроскопа с сине-фиолетовой части спектра, используют объектив и иммерсионную систему (на предметное стекло

наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло; глицерол или элванол.

В эпителиальных клетках, пораженных ВПГ, выявляются яркие свечения гранул в ядрах, нередко обнаруживаются включения в цитоплазме или гранулы на кариолемме и поверхности эукариотических клеток, диффузное свечение цитоплазмы.

Цитоплазма многих клеток крови (лимфоциты, макрофаги, моноциты) обладает ярко выраженной естественной люминесценцией. Поэтому инфицированность этих клеток, встречающихся в обычных мазках в препаратах, приготовленных из крови, можно оценивать в основном по наличию внутриядерных включений.

Четких критериев для оценки наличия и активности ВПГ инфекции по мазкам, обработанным иммунофлюоресцентными сыворотками, не существует. Они разработаны лишь для отдельных типов инфекции ВПГ. В частности, для диагностики офтальмогерпеса (Краснов М. М. и др., 1989).

Работа в этом направлении представляется перспективной и могла бы не только повысить качество и специфичность экспресс-диагностики герпеса, но и производить количественную оценку эффективности противогерпетической терапии, особенностей течения заболевания. В этом авторы убедились, когда при диагностике генитального герпеса подсчитывали процент инфицированных клеток, описывали в каждой пробе характер изменений клеток, указывали интенсивность свечения (+, ++, +++).

Иммунопероксидазный метод

Предложен быстрый иммунотест для детекции герпетической генитальной инфекции (Alexanders. M. et al., 1994). Апробируемый аффинный мембранный иммунотест основан на использовании синтетической белок-связывающей мембраны. Полоски из такой мембраны накладываются на поверхность язв в области гениталий у предполагаемых герпетических больных и далее для постановки иммунотеста обрабатывались меченым пероксидазой антителами против ВПГ-2 и после дальнейшей обработки проявляли тетраметилбензидином. Обследовали 28 пациенток с язвенными поражениями в области гениталий, вызванными инфекцией ВПГ; параллельно проводили иммунотест и выделение ВПГ в культуре ткани. У 8 больных были получены положительные результаты обоими методами, у 6 боль-

ных были положительными только результаты иммунотеста, а у 14 — отрицательные при применении обоих методов. Не отмечались случаи выявления положительных результатов при применении культурального метода при отрицательных результатах иммунотеста.

Предложен способ выявления АГ ВПГ (заявка 1819344 СССР, МКИ; авторы — Насыров Р. А., Казаков В. А.; Ленинград, 1990) путем фиксации исследуемого материала, приготовления срезов и проведения иммунопероксидазной реакции, отличающейся тем, что с целью ускорения способа, исследуемый материал фиксируют в 10% нейтральном формалине в течение 36 - 48 часов, трижды депарафинируют срезы в ксилоле при 56 - 60°C в течение 10 минут, затем обрабатывают срезы в 15 - 20% растворе сахарозы на фосфатно-солевом буфере и промывают в фосфарно-солевом буфере, содержащем 1% БСА.

Иммуноферментный метод

Классические методы лабораторной диагностики герпеса — выделение вируса в культуре клеток и иммунофлюоресценции, несмотря на их высокую чувствительность и специфичность, не отвечают одному из существенных требований, предъявляемых к современным методам — быстрой получаемого ответа. Значительно более перспективным для быстрой диагностики вирусных инфекций является разработанный в конце 1970-х гг. метод иммуноферментного анализа (ИФА), особенно его твердофазный вариант (УоНег А., 1986). В настоящее время этот тест широко применяется для выявления антител различных классов к различным типам ВПГ, а также для обнаружения вирусного антигена. В многочисленных публикациях доказана его высокая чувствительность и специфичность (Мальцева Н. Н., 1987; Эбралидзе Л. К., 1989; Вое, 1986; Mlaaelclorp A., 1987).

Предлагается набор ИФА диагностических реагентов для выявления АТ к ВПГ 1 и 2-го типов. Новинкой является приготовление препаратов оболочечного гликопротеина gD, который может использоваться как активный иммуноген, обеспечивающий хорошую защиту против вируса ВПГ. Изобретение (Патент 5149660, США МКИ авторы СоБенС Н. et al., 1992) касается также иммунореактивных полипептидов, которые полностью или частично дублируют последовательность аминокислот gD вируса простого герпеса. Это позволяет использовать такие полипептиды в составе вакцины.

Культивирование и идентификация ГВИ

Способы культивирования

Выделение и накопление ВПГ производится:

- на культуре ткани;
- на куриных эмбрионах;
- в организме лабораторных животных.

В настоящее время наиболее широко в рутинной практике при проведении диагностических исследований используют многие индикаторные культуры клеток (например, Уего, Hela, ФЭЧ, ткань рогаговицы, клетки почки кролика, амнион человека, куриные диплоидные фибробласты и др). Однако характер поражения клеток, динамика накопления ВПГ в разных культурах отличаются друг от друга. При заражении культуры ткани материал добавляют к монослою клеток по 0,1 мл. Чувствительность метода увеличивается, если перед добавлением материала жидкость над клетками сливают. Для того чтобы вирус адсорбировался на клетках, нужен 1 час. Затем добавляют поддерживающую среду и культуру, ингибируют при 37°C и наблюдают ежедневно под микроскопом. ВПГ вызывает характерные изменения клеток (набухание, округление, для некоторых вирусов характерно образование синцития). Однако эти изменения недостаточно специфичны, существенно отличаются между собой у различных изолятов. Обычно цитопатический эффект ВПГ выявляется через 3 дня, в редких случаях через 7 дней. У 50% проб, содержащих вирус, изменения в клетках отмечают уже через 24 часа после заражения. По данным ряда исследователей, индикация ВПГ по обнаружению ЦПД в культуре клеток через 24 часа после заражения достигает 42 - 50%, через 48 часов — 80 - 82% и через 72 часа — свыше 90%. При этом надо иметь в виду, что получаемый результат во многом зависит как от используемой индикаторной культуры клеток (ее чувствительности, ее перmissивности для ВПГ), так и от вида исследуемого материала, техники и сроков его взятия у больного от момента заболевания, условий хранения и транспортировки до момента исследования (см. выше). Так, экспериментально доказано, что чем раньше от момента появления симптомов взят материал на исследование, тем выше вероятность выделения ВПГ. Спустя 5 дней после их появления вирус редко выделяется из элементов поражений. Например, при

обследовании больных с генитальным герпесом была отмечена следующая частота выделения вируса в зависимости от стадии формирования элемента поражения: на стадии везикул ВПГ был выделен в 94% случаев, на стадии пустул — в 87%, на стадии язв — в 70% и на стадии образования корочек — лишь в 27% случаев.

Культивирование ВПГ на куриных эмбрионах

Накопление ВПГ возможно при различных способах заражения куриных эмбрионов, чаще вирусосодержащий материал вводят в хорион-аллантоисную оболочку. При заражении куриных эмбрионов через 48 - 72 часа инкубации при 37°C при наличии ВПГ на хорион-аллантоисной оболочке обнаруживают отчетливые очаги поражения в виде бляшек. Как правило, ВПГ 1-го типа вызывает образование мелких бляшек, диаметром 0,5 мм, а ВПГ 2-го типа — более крупных. Кроме того, ВПГ 2-го типа вызывает и более тяжелое поражение хорион-аллантоисной мембраны.

Культивирование ВПГ в организме лабораторных животных

ВПГ могут вызывать инфекционные процессы в организме морских свинок, хомяков, собак, обезьян и крыс. Изоляция вируса производится в основном с использованием заражения кроликов (интраназально или в роговицу глаза) и мышей-сосунков (интрацеребрально).

Данные два способа культивирования являются более трудоемкими, дорогостоящими, затрачивают на выделение ВПГ больше времени, поэтому в диагностических лабораториях практически не используются.

Молекулярно-биологические методы диагностики

С целью разработки дифференциального ПЦР-диагностикума Ланцов В. А. и др. (1994) для ВПГ-1 и ВПГ-2 выбрали 5 праймеров к фрагменту гена гликопротеина-Ц. Два праймера, 01, 02, которые использовали на первой стадии двухстадийной ПЦР, являются общими для ВПГ-1, ВПГ-2. Они фланкируют фрагмент в 332 пар нуклеотидов. Для второй стадии синтезировали 3 праймера. Один из них, 03, является общим для обоих вирусов. Два других, Б1 и Б2 в паре с 03, обеспечивают амплификацию внутренних (по отношению к фрагменту в 332 пар нуклеотидов) фрагментов соответствующих для ВПГ-1

Таблица 14

**Методы лабораторной диагностики
герпетической инфекции**

Основные методы, направленные на выделение ВПГ или обнаружение вирусных частиц и/или их компонентов	Вспомогательные методы, направленные на выявление ан- тител к ВПГ в биологических жидкостях организма человека
• Выделение ВПГ на чувствительных культурах клеток и животных • Прямая и иммунная электронная микроскопия • Прямой и непрямой варианты МФА • ИФА • Молекулярно-биологические методы • Реакция агглютинации латекса	• Реакция нейтрализации • РСК

Таблица 15

**Материалы, исследуемые при выделении ВПГ
в зависимости от локализации герпетических поражений**

Локализации поражений	Содержимое везикул	Соскоб клеток				СМЖ	Аспират из бронхов	Внютат	Кровь
		1	2	3	4				
Кожа	+								+
Глаза			+						+
Гениталии	+			+					+
Анус	+				+				+
Рот	+	+							+
ЦНС	+					+		+	+
Легкие		+					+		+
Печень								+	+
Врожденный герпес	+	+	+				+		+

Примечание: соскоб клеток с: **1** — слизистой оболочки полости рта, зева; **2** — конъюнктивы; **3** — слизистой влагалища, шейки матки; **4** — слизистой прямой кишки.

и ВПГ-2. Дифференцирование между ВПГ-1 и ВПГ-2 обусловлено нарушением гомологии для D1 по 9 позициям, для D2 по 5 позициям, включая 3'-концы. Конечный ампликон для ВПГ-1 составляет 194 пар нуклеотидов; для ВПГ-2 — 155 пар нуклеотидов. Проведена оптимизация условий ПЦР на модельной системе. Данная работа выполнена в Санкт-Петербургском институте ядерной физики РАН.

2.4. ДИАГНОСТИКА

VARICELLA-ZOSTER VIRUS (VZV) - ВИРУСА ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ

Varicella-Zoster Virus (VZV) — вирус ветряной оспы, является возбудителем распространенной в детском возрасте болезни — ветряной оспы. Случаи повторного заболевания очень редки, однако, персистируя в чувствительных ганглиях, вирус способен вызывать опоясывающий герпес (ОГ), проявляющийся невралгиями и высыпаниями по ходу нервных стволов (Баринский И. Ф. и др., 1980; 1986; Жданов В. М., 1990).

До недавнего времени лабораторная диагностика данного герпесвируса осуществлялась только в специализированных вирусологических центрах. Появление новых методов исследования в последнее десятилетие привело к расширению возможностей вирусологической диагностики в практическом здравоохранении. Так традиционные методы диагностики данной инфекции, в основе которых лежит обнаружение с помощью серологических тестов возбудителя или выявления иммунного ответа на инфекцию, были значительно усовершенствованы и даже заменены новыми методиками. Современные методы лабораторной диагностики позволяют: получать результаты анализа в короткие сроки (часы, иногда — минуты); проводить и завершать анализ без выделения культуры вируса, используя только нативный материал; получать надлежащую достоверность анализа, учитывая высокую специфичность и чувствительность методов исследования (Виноградская Г. Н. и др., 1990).

Материалом для исследования служат содержимое кожных высыпаний (соскоб из папул, жидкость из везикул, пустул, чешуйки, корочки), отделяемое слизистой оболочки носоглотки и сыворотка крови. Носоглоточное отделяемое берут в первые дни болезни. Кровь берут для диагностики в начале заболевания и спустя 2 - 3 недели.

В табл. 16 перечислены некоторые традиционные и новые методы обнаружения Varicella-Zoster Virus (VZV).

Большинство методов лабораторной диагностики основано на комплементарном строго специфическом взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ), позволяя быстро обнаруживать вирусные АГ и АТ к ним в жидкостях организма. При этом многие из предлагаемых методов просты, удобны и воспроизводимы в больничных лабораториях, что позволяет увеличить возможность диагностики ГВИ в медицинских учреждениях различного профиля. Не меньшее значение эти методы имеют и в эпидемиологической практике, способствуя оперативному эпидемиологическому анализу и формированию целенаправленных противоэпидемиологических мероприятий в очаге вирусных инфекций.

Микроскопия. Вирус ветряной оспы может быть обнаружен в содержимом кожных высыпаний (соскоб из папул, жидкость из везикул, пустул, чешуйки, корочки) и носоглоточном отделя-

Таблица 16

Методы выявления VZV

Подход	Метод
Непрямой:	
- Выделение - Идентификация изолятов	Культура ткани, куриные эмбрионы, лабораторные животные, совместное культивирование с перmissive клетками или вирусами-помощниками. Реакция нейтрализации, РСК, ИФ, ПИЭФ, реакция изолятов преципитации, агглютинации, ИФ
Прямой:	
- Цитология - Гистология - Структура - Определение антигенов - Определение местной выработки антител - Молекулярно-биологические подходы	Мазки: цветовая иммунофлюоресценция Патоморфология клетки Эмбриональная микроскопия, иммуно-электронная микроскопия ИФ, ПИЭФ, РИМ, ИФА IgM, IgG, IgA: ИФА, РИА Молекулярная гибридизация, ПЦР

емом. Мазки и отпечатки окрашивают по Морозову. Вирус ветряной оспы в окрашенных препаратах при световой микроскопии имеет вид мелких, довольно полиморфных образований, расположенных по одиночке, парами, короткими цепочками. Наилучшим материалом для вирусоскопии является прозрачная жидкость только что развившихся везикул. Помимо вирусных частиц, при ветряной оспе в мазках и отпечатках из очаговых кожных поражений, окрашенных по Романовскому — Гимзе или гематоксилином и эозином, обнаруживаются многоядерные гигантские клетки с внутриядерными включениями. Для быстрой идентификации данного вируса может быть использован непрямой метод иммунофлюоресценции. Мазки и отпечатки из кожных поражений и носоглоточного отделяемого вначале обрабатывают иммунной сывороткой с высоким титром антител к вирусу, а затем антивидовым коммерческим флюоресцирующим иммуноглобулином. Специфический антиген выявляется в виде ярко люминесцирующих зерен и конгломератов внеклеточно, а также в одноядерных и многоядерных гигантских клетках (Жданов В. М., 1990).

Реакцию связывания комплемента (РСК) ставят с сывороткой реконвалесцента после ветряной оспы с известным титром специфических антител. Сыворотки переболевших опоясывающим лишаем содержат, как правило, значительно большее количество специфических антител, чем сыворотки перенесших ветряную оспу. Антигенами служат везикулярная, пустулезная жидкость и суспензия чешуек и корок, осветленные центрифугированием. В связи с невозможностью получения от больного содержимого кожных поражений в большом количестве и его слабой комплементсвязывающей активностью реакцию ставят на холоду по определенной методике (Жданов В. М., 1990).

Для выделения вируса из инфекционного материала можно использовать различные культуры клеток человека (щитовидной железы, амниона, легочной, почечной, кожно-мышечной ткани эмбрионов), почек, тестикул обезьян, кроликов, кожно-мышечной ткани коровьего эмбриона. Оптимальным для выделения вируса ветряной оспы является внесение вируссодержающего материала одновременно с посевом клеток в пробирки и инкубация зараженных культур клеток при температуре 34 – 35°C. Методика выделения вируса и трактовка полученных результатов описана в ряде изданий (Виноградская Г. Р. и др., 1990; Жданов В. М., 1990).

VZV или его антигены можно быстро выявлять в жидкости везикул посредством встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) или электронной микроскопии (Лысенко А. Я. и др., 1992). Так как жидкость удается получить далеко не всегда, то нередко прибегают к серодиагностике. Такие традиционные методы, как РСК, РН, РГА и реакция иммунофлюоресценции с использованием мембранного антигена (РИФМ), выявляют в основном выработку вирусспецифических Ig G — антител. Для обнаружения значимого повышения титра антител необходимо исследовать 2 пробы сыворотки, взятые с интервалом в 6 - 8 дней, однако при промедлении со взятием первой пробы сыворотки титр АТ уже может достичь максимального уровня. У 20% больных с предсуществующими АТ к ВПГ 1-го и 2-го типов может происходить гетеротипическое повышение титра АТ к этим вирусам (Келли Е. И. и др., 1985). Поскольку присутствие вирусспецифических IgM и IgA-антител свидетельствует о первичной инфекции VZV или о реактивации инфекции в форме простого герпеса, их обнаружение имеет важное значение для быстрого установления специфического диагноза, тем более что для этого требуется одна проба сыворотки. IgM-антитела можно выявить с помощью ИФ или РИМФ, однако они менее надежны, чем недавно разработанный непрямой ИФА, в котором используется коммерческий диагностикум «Энзигност». Этот метод позволяет определить на одной микротитровальной пластине IgA-, IgM-, IgG-антитела к VZV.

Ревматоидный фактор, который часто присутствует в организме беременных женщин, может быть причиной ложноположительных результатов при определении IgM-АТ [Золотарев Ф. Н., 1989], но эту трудность можно устранить посредством адсорбции сыворотки латексным реагентом или АТ к IgG перед определением IgM-АТ. Иногда очень высокие концентрации IgG-АТ могут снизить чувствительность определения вирусспецифических IgM. Эту проблему можно решить также путем меченая АГ, как это делается при определении специфических IgM-АТ к ЦМВ и ВПГ 1-го и 2-го типов (Рахманова А. Г. и др., 1990). Однако иногда даже эта реакция ИФ с использованием ИСТ с АМП дает ложноположительные результаты из-за присутствия антинуклеарных АТ, направленных против АГ, которые содержатся в полуочищенных препаратах вирусов из культур диплоидных клеток человека, поскольку в этих препаратах имеются также ядра клеток. Эту проблему можно решить

посредством добавления неинфицированного контрольного АГ к меченому АГ перед использованием последнего. Если сыворотки взяты в период от 3 - 5-го дня до 2 - 4 месяца после возникновения ветряной оспы или опоясывающего герпеса, то диагноз можно поставить посредством определения классспецифических АТ. Соответствующий тест может быть завершен в течение 6 часов.

Существует целый ряд экспрессных методов выявления вирусов и вирусных антигенов (Бикбулатов Р. М. и др., 1982; Исаков В. А. и др., 1991; Лысенко А. Я. и др., 1992; Рахманова А. Г. и др., 1990). Некоторые из них иммунофлюоресценция (ИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), тонкослойный иммунный анализ (ТИА) имеют высокую специфичность, но более низкую чувствительность по сравнению с методом выделения вируса в клеточных культурах (Виноградская Г. Р. и др., 1990; Жданов В. М., 1990).

Хорошие результаты получены при использовании ИФ для быстрого обнаружения ЧВЧ в препаратах из кожных поражений. Хотя прямое цитологическое исследование не позволяет дифференцировать этот вирус от вируса простого герпеса, диагноз герпесвирусной инфекции можно установить через 1 - 2 часа от начала анализа. Специфичность ИФ при этом достаточна велика — при обследовании 28 больных специфическая флюоресценция выявлена в 86% случаев (Исаков В. А. и др., 1991).

При постановке перекрестных реакций, что особенно важно при дифференциальной диагностике герпесвирусных инфекций, обнаружена очень высокая специфичность ТИА. Метод ТИА основан на способности различных биополимеров, включая молекулы антигенов и антител, сорбироваться на гидрофобных поверхностях синтетических материалов, в частности на полистероле. Эти сорбировавшиеся антигены и антитела обычно образуют очень тонкий слой, который состоит, как правило, из 1 ряда молекул, сохраняющих свою иммунологическую активность. При этом взаимодействие антигенов и антител происходит очень быстро, что позволяло учитывать результаты уже через 15 - 30 секунд, а более длительная инкубация пластинок в течение 1 - 24 часов повышала чувствительность ТИА в 16 - 64 раза. При исследовании 18 больных, от которых были выделены ЦМВ, ВОГ и ВЭБ, ни в одном случае не отмечено ложноположительных результатов (Виноградская Г. Р. и др., 1990).

Имеются сообщения о многочисленных модификациях радиоиммунного метода (РИМ). К преимуществам РИМ относятся высокая специфичность и чувствительность, возможность стандартизации, быстрого получения результатов. Опасность радиации не является недостатком РИМ, так как при соблюдении элементарных мер безопасности она сводится к минимуму. Разработан ускоренный метод РИМ с использованием в качестве твердой основы ферромагнитных шариков, покрытых поликарбонатом. Исследователи применяли шарики разных цветов для одновременного выявления антител к вирусам простого герпеса, ветряной оспы-опоясывающего лишая, Эпштейна — Барр. В данной работе показано, что при определении антител к VZV РИМ более чувствителен, чем РСК, ИФ, ИФА и РН (Виноградская Г. Р. и др., 1990).

Для быстрого выявления в клинических материалах различных герпесвирусов с помощью латекс-агглютинации апробирован специальный тест (Бюлл. ВОЗ, 1985).

Экспресс-диагностика герпесвирусов может осуществляться также с помощью моноклональных антител. Считается, что диагноз может быть поставлен в течение 5 минут (Ивановская Г. Е. и др., 1989).

Молекулярно-биологические методы исследования для определения генетического материала вируса ветряной оспы используются с 80-х годов. Для диагностики данной инфекции методом выбора является также гибридизация молекулярных зондов *per se* или с клетками инфицированной ткани на срезах или в мазках *in situ*, позволяющая выявлять менее одного геномного эквивалента в клетке (Петров Р. В. и др., 1984). Исследованию подлежат пунктаты, биоптаты, срезы легких, смывы бронхов больных людей и экспериментально зараженных животных.

Принцип метода заключается в выявлении вирусспецифических нуклеиновых кислот в исследуемом материале путем гибридизации с меченым зондом. Метод основан на комплементарности азотистых оснований конкретного молекулярного зонда и определяемой ДНК вируса. В качестве зонда используются рекомбинантные молекулы, содержащие специфические последовательности вирусного генома (Бикбулатов Р. М. и др., 1982). При этом происходит соединение (комплементарных) участков меченого молекулярного зонда с аналогичными участками исследуемой ДНК. Для учета результатов анализа используют

визуальную оценку эффективности гибридизации последовательно разведенных препаратов нуклеиновых кислот. Так изучали возможность использования ДНК - ДНК гибридизации для выявления последовательностей вирусной ДНК в лимфоцитах, используя плазмиду с клонированными последовательностями вирусной ДНК, меченной радиоактивным ^{32}P (Скрипкин Ю. К. и др., 1988). Обнаружено, что метод ДНК - ДНК гибридизации обнаруживает вирус раньше, чем иммунологические методы. Предел чувствительности данного метода 4 - 15 пикограмм вирусной ДНК, при этом гетерологичные ДНК (включая ДНК других герпесвирусов) не мешали определению.

В настоящее время используются различные варианты метода гибридизации *per se* и *in situ* для выявления в клетках нуклеиновых кислот данного герпесвируса. Как правило, эти различия связаны не с самой процедурой гибридизации, а с методами мечения зондов и способами их визуализации. Наибольшее распространение имеет способ радиоактивного мечения с помощью ^{32}P в реакции ник-трансляции с последующим выявлением метки методом автордиографии. В последние годы для повышения специфической удельной активности молекулярных зондов используется метод случайного праймирования, при котором удельная активность мечения повышается на 1 - 2 порядка. Это значительно увеличивает чувствительность метода, позволяя выявлять единичные геномные эквиваленты вирусов в клетках.

Так исследовали материалы от 58 больных с ахалазией на наличие сывороточных антител к ВПГ, ЦМВ и ВОГ. Контрольная группа состояла из 40 здоровых лиц. Удалось выявить различия между опытной и контрольной группами только по титру антител к ВОГ. У 9 больных были исследованы ткани Plexus mysenterius на наличие ДНК VZV в реакции гибридизации *in situ*, в трех случаях была выявлена персистирующая инфекция VZV (Семенов Б. Ф., 1982).

Наибольшей чувствительностью для выявления ДНК герпесвирусов характеризуется полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР может считаться самой чувствительной и быстрой реакцией применительно к целям лабораторной диагностики VZV-инфекции (Коломиец А. Г. и др., 1982).

В основе метода лежит полимеразная реакция с использованием термостабильной полимеразы и праймеров, соответствующих определенным участкам искомой ДНК. В качестве праймеров используют олигонуклеотиды, содержащие обычно около

20 оснований. В процессе амплификации ДНК, основанной на ПЦР, имеется 3 периода, составляющих один цикл. В начале реакции происходит денатурация ДНК при температуре $+90 - 95^{\circ}\text{C}$.

Следующий период — отжиг праймеров на одонитивую ДНК при температуре около 50°C . Синтез в присутствии полимеразы протекает при температуре около 70°C . Продолжительность каждого периода — от 1 до 3 минут. Число циклов обычно колеблется от 20 до 40. Чувствительность метода позволяет определить одну молекулу искомой ДНК в образцах, содержащих 10 клеток. Экспоненциальная аккумуляция фрагментов ДНК позволяет получить их в количестве 2п, где п — число циклов. В большинстве случаев ПЦР требует предварительного биохимического выделения ДНК из исследуемых образцов. Однако W. Spann (1991) опубликовал работу, посвященную амплификации ДНК вируса ЦМВ при проведении ПЦР непосредственно в клетках. Метод позволяет визуализировать пораженные и интактные клетки в мазках костного мозга и периферической крови при использовании радиоактивной метки. Конкретно, ПЦР была использована для обнаружения последовательностей ДНК VZV в серийных образцах СМЭК 21 больного с острым асептическим менингитом (ОАМ). Средний возраст больных составлял 26,6 года. Диагноз VZV-менингита был поставлен на основании наличия специфических IgG в СМЭК. У 10 больных были типичные зостериформные поражения кожи в начале заболевания ОАМ, или же они появились спустя 3 дня. У 11 больных поражений кожи не было вообще. Последовательности ДНК VZV обнаружены в СМЖ всех больных с кожными поражениями (10/10), а также у 6 больных (55%) без таковых. В 6 случаях вирусная ДНК присутствовала в СМЖ еще до появления в ней специфических антител. В 7 первоначально позитивных случаях ДНК VZV исчезла из СМЖ при дальнейшем наблюдении. Полученные результаты свидетельствуют о роли VZV в этиологии ОАМ у взрослых. По мнению авторов, из латентно инфицированных ганглиев VZV может проникать непосредственно в ЦНС, инфицируя мягкие мозговые оболочки (Коломиец А. Г. и др., 1982).

Как известно, в патогенезе ОГ важное место принадлежит изменениям иммунологического статуса больных (Богомолов Б. П. и др., 1984; Филдс Б. и др., 1989; Гирин В. Н. и др., 1991). Эти изменения с полным основанием могут быть охарактеризованы как вторичный (приобретенный) иммунодефицит, при ко-

тором страдает прежде всего клеточное звено иммунной системы. Знание механизмов и динамики развития «поломок» иммунной системы при ОГ имеет не только теоретическое значение для уяснения аспектов хронизации инфекции, но и важное прикладное значение, так как позволяет прогнозировать возможные варианты клинического течения и исходов, обосновывать направление и контролировать эффективность специфической противовирусной химио- и иммунокорректирующей терапии. Определение иммунологического статуса больного ОГ основано на постановке ряда тестов, дающих функциональную и количественную оценку Т- и В-систем иммунитета, а также интерфероновой системы.

Для оценки Т-системы иммунитета используют методы определения количества Т-лимфоцитов в крови (метод «спонтанных» розеток) и бласттрансформации лимфоцитов, динамики бласттрансформации, постановки кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа с антигенами ГВИ.

При оценке В-системы иммунитета определяют количество В-лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов классов А, М, G, наличие и уровни вирусспецифических АТ в крови и других биологических жидкостях организма (спинномозговой жидкости и др.).

При нормальном иммунном ответе на первичную инфекцию VZV происходит эволюция подкласса антител IgG с преобладанием типа IgG1, а также повышается авидность антител. Исследовали 23-х иммунокомпетентных детей, у которых в анамнезе — от 2 до 5 заболеваний ветрянкой. Исследовали после повторного заболевания серии сывороток и мочу на содержание подклассов антител IgG методом ИФА. В первые 8 недель повторного заболевания ветрянкой средний уровень антител у 11 детей составлял $31,1 \pm 26,81$, а в контроле — $65,1 \pm 12,38$. У 7 из 11 обнаружены низкая авидность антител, а также избыток IgG3, как при первичной ветрянке. У двух из 11 детей выявлены антитела с высокой авидностью, что характерно для анамнестического ответа. В течение 8 недель и позже наблюдали созревание авидности и истощение подкласса антител IgG, кроме IgG 1. По крайней мере у 9 детей отсутствовал вторичный иммунный ответ на VZV на ранней стадии повторной инфекции (Рахманова А. Г. и др., 1990).

Исследовали уровень клеточного и гуморального иммунитета против VZV у 15 детей с острой лейкоцитарной лейкемией (ОЛЛ), у 8 здоровых иммунных взрослых, у 2 здоровых неиммунных

Таблица 17

Лабораторная диагностика инфекции, вызываемой VZV

Диагностические проблемы	Методы	Ожидаемые результаты
Острая первичная инфекция	1)*	Обнаружение VZV через 2 часа
	2)*	Уровень антител растет медленно
	3)*	Присутствуют через 3 дня после инфекции
Острая реактивированная инфекция	1)*	Обнаружение VZV через 2 часа
	2)*	Уровень антител растет медленно
	4)*	Присутствуют через 4 дня после появления высыпаний

Примечание:

1.* — Определение VZV в жидкости везикул ВИЭФ;

2.* — Серология: РСК, ИФА, направленные на выявление IgG;

8.* — Серология: ИФА, направленные на выявление IgM;

4.* — Серология: ИФА, направленные на выявление IgA, IgM.

Таблица 18

Методы лабораторной диагностики инфекции, вызываемой VZV

Методы	Время, необходимое для получения результатов	Примечания
Выделение вируса в культуре клеток и его идентификация с помощью иммунофлуоресценции	3 - 14 дней 2 - 8 дней	Медленный, трудоемкий
Определение вирусного антигена в жидкости везикул:		
• иммунофлуоресцентное окрашивание	6 часов	Менее специфичный
• электронная микроскопия	3 часа	Малодоступен
• встречный иммуноэлектрофорез	2 часа	Быстрый, специфичный
Серологические методы:		
• РСК	2 дня	Стандартный, трудоемкий
• РГА	1 день	Простой, специфичный
• РИМФ	6 часов	Сложный
• ИФА (ОВА, М, Д, А)	6 часов	Быстрый, простой

Таблица 19

**Методы обнаружения иммунного ответа
на *Varicella-Zoster Virus***

Подход	Метод
Обнаружение повышения титра антител во вторых сыворотках	РСК, РТГА, РИГА, Реакция нейтрализации ИФ, РИМ, ИФА
Обнаружение IgM, IgA, классспецифических антител в первой пробе сыворотки	ИФА, ИФ, РИМ, Латекс-агглютинация ТИА

взрослых и у 10 доноров. Критерием оценки клеточного иммунитета служила частота клеточного ответа (ЧКО) против антигенов VZV, проявлявшегося в лимфопротеративной реакции. Показано, что у 4 из 10 детей с ОЛЛ не регистрировался положительный уровень ЧКО, причем у 3 из этих 4 детей были выявлены IgG специфические антитела. У всех здоровых взрослых и всех пациентов с ОЛЛ повторный контакт с VZV или реактивация вируса приводили к подъему VZV-специфического иммунитета. Указывается, что лица с высоким уровнем ЧКО имели наиболее низкий уровень специфических IgG антител (Семенова Т. Б. и др., 1990).

2.5. ДИАГНОСТИКА ЦМВИ

В настоящее время в распоряжении практических врачей и научных исследователей имеются разные лабораторные методы диагностики ЦМВИ.

Культуральный метод выращивания ЦМВ на фибробластах эмбриона человека является точным, чувствительным и достоверным [Lang D. J. et al., 1974; Woods G. L. et al. 1990], но определение цитопатогенного действия ЦМВ требует 2 - 4 недели. Для более раннего обнаружения антигенов ЦМВ в культуре тканей используют иммунофлуоресценцию. Диагностические результаты при этом могут быть получены через 25 часов (Margall N. et al., 1989; Wunderll W. et al., 1989).

Для выявления антигенов ЦМВ в клетках и сыворотке крови используют иммуногистохимический анализ с моноклональными антителами (Ashley R. et al., 1989; The T. H. et al. 1990). Методика позволяет определять антигены ЦМВ, в том числе и в тканях, фиксированных формалином и заключенных в парафиновые блоки. С. В. Тоогкеу и D. R. Carrigan (1989) описали метод иммуногистохимического определения немедленного

раннего антигена ЦМВ в различных клетках: макрофагах, лимфоцитах, клетках головного мозга, в альвеоле- и бронхоцитах, гепатоцитах, звездчатых ретикулоэндотелиоцитах. Морфологически эти клетки не отличались от здоровых. Исследование проводилось как у серонегативных, так и у серопозитивных пациентов.

Электронная микроскопия позволяет быстро выявлять ЦМВ, однако следует учитывать, что с помощью этого метода диагноз можно поставить только в случае наличия в исследуемом материале очень большого числа вирусных частиц ($> 10^6$ /мл). Кроме того, далеко не везде имеются электронные микроскопы.

В настоящее время в распоряжении практических врачей и научных исследователей имеются разные лабораторные методы диагностики ЦМВИ. Одним из рекомендуемых способов прижизненной диагностики ЦМВИ является обнаружение специфических клеток в осадках слюны и мочи (Демидова С. А. и др., 1976). Однако метод является довольно трудоемким и сравнительно малоинформативным, поскольку позволяет выявить инфекцию лишь при максимальной выраженности процесса.

Мочу и слюну от больных собирают в центрифужные пробирки, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 минут, после чего удаляют надосадочную жидкость, а из осадка готовят мазки. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом и окрашивают азуrom-эозином. В полученных препаратах обнаруживаются крупные клетки с гиперхромным ядром. В ядре — внутриядерные включения, ядро окружено светлой зоной просветления. В цитоплазме также определяют включения — «совиный» глаз.

Для экспресс-диагностики ЦМВИ у беременных исследованию подвергают вагинальный и цервикальный секрет. Для этого материал забирается тампоном из заднего свода влагалища (вагинальный секрет) и из канала шейки матки (цервикальный секрет). Исследуемый материал помещают на 2 - 3 обезжиренных предметных стекла, разделенных пополам: на одну половину помещают вагинальный секрет, на другую — цервикальный и каждую половинку аккуратно маркируют. Мазки высушивают и затем фиксируют в смеси Никифорова, после чего проводят окрашивание азуrom-эозином. В. В.Тюкавкин(1989), предложивший эту методику, отмечает, что эффективность ее для выявления ЦМВИ у беременных женщин в 1,5 - 3,4 раза выше по сравнению с исследованием осадка слюны и мочи у этой же группы.

Большое распространение получила серологическая диагностика, основанная на реакциях нейтрализации, связывания компонента, непрямой гемагглютинации (Gireaudot P. et al., 1989; Gleaves C. A. et al., 1990; Muller R. et al., 1989). Серологические методики позволяют оценить эпидемиологическую ситуацию, в ряде случаев — выявить сероконверсию, что особенно важно у беременных женщин (Chang C. P. et al., 1989; Landini M. R. et al., 1989). Однако широкая распространенность инфицированности ЦМВ зачастую затрудняет интерпретацию полученных данных, особенно если не определяются классы иммуноглобулинов, к которым принадлежат выявленные антитела (Nigro G. et al., 1989).

Реакция нейтрализации

Для идентификации и титрования АТ к ЦМВ предложен микрометод РН, проводимый в пластиковых панелях на культуре диплоидных фибробластов человека. Двукратные разведения сыворотки соединяют со 100 ТЦД 50 адаптированного к диплоидным клеткам вируса. Этот метод позволяет получить окончательный результат реакции через 10 дней после внесения в культуру смесей вируса и сыворотки. Этот же метод позволил установить, что вируснейтрализующие АТ обнаруживаются в крови только через 7 недель после появления симптомов инфекции (Перадзе Т. В. и др., 1985).

Реакция связывания компонента

Сравнение РСК при определении АТ к ЦМВ с другими методами по чувствительности показывает, что она превосходит ВИЭФ, хотя и уступает другим реакциям. Имеются данные о возможности обнаружения IgM к ЦМВ в РСК при использовании в качестве АГ клеточных экстрактов или оболочек вируса. РСК, уступая по чувствительности РНГА при выявлении АТ, более пригодна для определения динамики титров. Показана полная корреляция результатов РСК и РНГА у больных ЦМВИ, хотя титры последней были в 5 - 10 раз выше (Перадзе Т. В. и др., 1985).

При сравнительном изучении диагностической ценности прямого МФА, РСК и выделения вируса при данной инфекции показано, что первый метод более чувствителен при обнаружении всех видов АТ, чем второй. Следует отметить, что при применении РСК в серологической диагностике ЦМВИ результаты

часто зависят от свойств используемого АГ, полученного путем замораживания и оттаивания, а также препарата в буферном растворе, обнаружено, что с помощью последнего АТ выявлялись на 3 недели раньше.

Предприняты попытки получения АГ для РСК из внеклеточных и связанных с клетками человеческих ЦМВ. Установлено, что качество АГ зависит от клеточного субстрата и используемого штамма, от числа активных единиц в инокуляте и от тщательности выполнения методики. Высокоактивные АГ можно получить при концентрации ПЕК и последующей экстракции глицериновым буферным раствором, однако такой метод дорог и трудоемок. Рекомендовано более технологичное получение АГ с помощью ультразвуковой обработки. При изучении стабильности комплементсвязывающего АГ человеческого ЦМВ обнаружено, что его активность не снижается при 10-кратном замораживании и оттаивании или хранении в течение 2 месяцев при 4°C (Перадзе Т. В. и др., 1985).

При ЦМВИ в РСК с сыворотками 7 больных применяли необработанный АГ (центрифугат после 2-кратного замораживания и оттаивания) и АГ, очищенный в градиенте плотности сахарозы. АТ к последнему появлялись позднее других комплементсвязанных АТ (одновременно с вируснейтрализующими АТ). Рекомендовано использовать в РСК очищенный АГ ЦМВ при обнаружении в первой сыворотке высоких титров АТ с неочищенным АГ.

У детей с ЦМВИ комплементсвязывающие АТ появляются только через 2 - 7 месяцев после начала вирусемии. Отмечено, что у новорожденных при этой инфекции обнаружить указанные АТ довольно трудно. При врожденных инфекциях титр АТ в РСК может значительно снижаться, а затем стабилизироваться или снова возрастать. Следует учитывать возможность значительных колебаний результатов: титры могут варьировать от 1: 4 до 1: 512. При постановке РСК с 8 зашифрованными сыворотками в 27 лабораториях разных стран наблюдали 8-кратное колебание титров при 90% совпадении серопозитивных результатов (Перадзе Т. В. и др., 1985).

Реакция агглютинации латекса

Для выявления АТ к ЦМВ была использована модифицированная РАЛ, основанная на агглютинации частиц латекса, сенсibilизированных АТ к IgG и IgM в присутствии иммунных комплексов, в состав которых входили соответствующие имму-

ноглобулины. Уже в первых исследованиях было показано, что данная модификация РАЛ превосходит по чувствительности РСК и почти аналогична РН, а частота положительных результатов при исследовании сывороток 35 больных всеми тремя методами была абсолютно одинаковой. Позже эти данные были подтверждены на значительно большем клиническом материале — 187 сывороток от более чем 120 больных ЦМВИ на разных стадиях заболевания. У многих больных уже в первые дни болезни, когда РСК была еще отрицательной, РАЛ позволила выявить противовирусные IgM-антитела (Перадзе Т. В. и др., 1985). По мнению авторов, данную модификацию РАЛ следует широко использовать для рутинной серологической диагностики ЦМВИ.

Для серологической диагностики ЦМВИ применяется определение как антигенов самого вируса, так и специфических антител различных классов к нему.

В 70 - 80 гг. было показано, что в клетках, инфицированных ЦМВ, и в тканях человека могут быть определены ранние неивирионные антигены, которые могут быть обнаружены как в ядре, так и на ее мембране (Hudson, 1988). Определение ранних антигенов проводится при изучении клеток, зараженных клиническим материалом с ЦМВ, причем ранние антигены появляются через 24 - 36 часов после заражения. Описаны также очень ранние антигены, появляющиеся через 4 часа после заражения. Для инокуляции чаще всего используются клетки легкого эмбриона человека. Предложена модификация метода — медленное центрифугирование (1000 об/мин) заражаемых клеток вместе с клиническим материалом, что способствует повышению инфицирующих свойств вируса. В качестве АГ используется 10% клеточный экстракт, полученный 5-кратным замораживанием и оттаиванием. Все АГ уравниваются по белку, определяемому на спектрофотометре. Сыворотки получают иммунизацией кроликов водно-солевым экстрактом клеток легкого человека через 24 - 36 часов после их инфицирования. Для устранения неспецифических АГ сыворотки подвергают истощению обработкой клетками нормальных тканей человека. Выявление ранних АГ проводят в РИФ, в которой ранние АГ определяются по очень яркому свечению ядра (ядерные) или оболочки (мембранные) клетки.

Палайкене с соавт. (1987) проводила обследование большой группы детей на наличие специфических IgG, IgM и IgA к ранним

и поздним АГ ЦМВ и подтвердила, что обнаружение АТ к поздним АГ в титре 1: 256 и более и АТ к ранним АГ в титре 1:16 и более свидетельствует о высокой эффективности методики, позволяющей диагностировать острую инфекцию на основе исследования одной только сыворотки.

А. М. Корсакова и др. (1988) подробно описывает методику определения АТ в НРИФ.

В качестве клеточной культуры используют фибробласты легкого человека, выращенные на среде Игла с 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота. При образовании монослоя клетки заражают либо готовым штаммом ЦМВ, либо материалом от больного, содержащим вирус, и культивируют при 37°C (поддерживающая среда — среда Игла с 2% сывороткой). После того как цитопатогенный эффект распространится на 70 - 80% монослоя, клетки снимают 0,25% трипсином, ресуспензируют в фосфатно-солевом буфере (рН = 7,2 — 7,4), тщательно пипетируют, наносят небольшими каплями на предметное стекло стерильной пастеровской пипеткой (по 8 капель на стекло), высушивают препараты на воздухе 60 - 90 минут, фиксируют в холодном ацетоне — 10 минут. Полученные препараты можно хранить при -20°C не более 3-х месяцев.

Сыворотки от больных разводят в геометрической прогрессии физиологическим раствором. Исходный титр для IgG составил 1:10, для IgM — 1: 20, сыворотки предварительно адсорбируют латексовым реактивом.

Разведенные и адсорбированные сыворотки инкубируют с человеческими фибробластами, зараженными ЦМВ, и фиксируют ацетоном на предметном стекле при 37°C в течение 37 минут для обнаружения IgG и 18 часов — для IgM.

Затем при постоянном перемешивании препараты промывают в фосфатно-солевом буфере (15 минут для IgG и 45 минут — IgM) и высушивают. Комплекс АГ - АТ визуализируют с помощью свиных АТ против IgG человека (инкубируют 30 минут при 37°C) и АТ против IgM (инкубируют 60 минут при 37°C), обработанных флюоресцином. IgG достаточно 10 минут промывки и для IgM 15 минут фосфатно-солевым буфером. Препараты покрывают смесью фосфатно-солевого буфера с глицерином (7 : 3) и просматривают в люминесцентный микроскоп. Результат (титры антител) оценивают по последнему разведению сыворотки, показавшей явное свечение препаратов IgG и IgM.

Методом иммуноблота (ИБ) выявляли АТ к белкам ЦМВ в сыворотках здоровых серопозитивных людей (1) и в сыворотках больных, перенесших трансплантацию органов, страдающих первичной или вторичной ЦМВ-инфекцией (2). Гуморальный ответ в обеих группах был направлен на один и тот же набор вирусспецифических полипептидов с молекулярной массой от 28 до 235 кД, однако частота обнаружения АТ и степень их взаимодействия с АГ были более высоки в группе (2). Наличие АТ к полипептидам с молекулярной массой 85, 76, 66, 46, 44, 38 и 32 кД имело большое значение для ограничения ЦМВ (van Zanten et al., 1993).

В целях диагностики для обнаружения антигена в ранней стадии активной ЦМВИ использовали тест флюоресцирующих антител (Visontai I., et al., 1992) при применении анти-ЦМВ моноклональных АТ. Иммуногистохимическую окраску лейкоцитов крови проводили непрямым МФА в высушенных и фиксированных на стекле клетках или иммунопероксидазной окраской препаратов из центрифугированных клеток. Второй метод более результативен. Выявление антигена коррелировало с результатами выделения ЦМВ в клетках фибробластов человека.

Для выявления антигенов ЦМВ в клетках и сыворотке крови используют иммуногистохимический анализ с моноклональными антителами (Evans A. S., 1989; Levy J. et al., 1990; Warford A. L. et al., 1989). Методика позволяет определять антигены ЦМВ, в том числе и в тканях, фиксированных формалином и заключённых в парафиновые блоки. С. В. Тоогкеу и D. R. Carrigan (229) описали метод иммуногистохимического определения немедленного раннего антигена ЦМВ в различных клетках: макрофагах, лимфоцитах, клетках головного мозга, в альвеолах, бронхоцитах, гепатоцитах, звездчатых ретикулоэндотелиоцитах. Морфологически эти клетки не отличались от здоровых. Исследование проводилось как у серонегативных, так и у серопозитивных пациентов.

Группа японских ученых под руководством Minematsu Toshio et al. (1994) использовала для постановки реакции прямого иммунопероксидазного метода моноклональные антитела С7 против АГ р65 ЦМВ. Установили, что меченные пероксидазой Г(аВ')₂-фрагменты С7-антител были более стабильны, чем эквивалентные Р(аВ')-фракции. Метод позволял выявлять одну ЦМВ-позитивную клетку среди 50.000 лейкоцитов, что

обеспечивало необходимые воспроизводимость и практичность при определении ЦМВ-антигеномией и способствовало ранней диагностике.

В последнее время получили распространение молекулярно-биологические методы диагностики и исследования ЦМВИ и других вирусных инфекций (Aurelius E. et al., 1991; Fiss E. et al., 1989; Gentilomi G. et al., 1989; Porter-Jordan K. et al., 1990). Это такие методы, как гибридизация с использованием ДНК и РНК зондов, меченых радиоактивными элементами или биотином (Spector S. A. et al., 1989; Yuan C. F. J. et al., 1990). Распространение получили как гибридизация *in situ*, так и *dot gibridization* (Hendrix M. G. R. et al., 1989; Kimpton C. P. et al., 1990; Marcante R. et al., 1989; Seto E., et al., 1987). Гибридизация позволяет выявлять инфекции и при отсутствии цитомегалических клеток, т. е. когда ЦМВИ еще не определяется гистологически (Rook R. et al., 1989; Rosen-Wolff A. et al., 1989).

Метод молекулярной **гибридизации** для выявления герпес-вирусов. Принцип метода основан на комплементарности азотистых оснований конкретного молекулярного зонда и определяемой ДНК из группы герпесвирусов. В качестве зонда используют уже клонированный фрагмент ДНК. При этом происходит соединение (комплементарных) участков меченого молекулярного зонда с аналогичными участками исследуемой ДНК. Для учета результатов анализа используют визуальную оценку эффективности гибридизации последовательно разведенных препаратов нуклеиновых кислот.

В работе J. T. McClintock и др. (1989) приводятся результаты прямой и непрямой иммунофлюоресценции, которые сравниваются с данными, полученными при использовании гибридизации *in situ* с биотинизированным ДНК-зондом и гибридизации *in situ* с ДНК-зондом, меченным пероксидазой хрена. Отмечается наибольшая надежность непрямой иммунофлюоресценции и гибридизации с зондом, меченным пероксидазой хрена.

Имеются работы, посвященные выявлению вирусной ДНК методом амплификации (Evans A. S., 1989; Warford A. L. et al., 1989), в том числе и в случаях, где отсутствовали характерные для данной инфекции клеточные включения. При этом в подавляющем большинстве случаев для анализа брали клинические образцы (кровь, мочу, мокроту, выделения). Лишь

в единичных работах для этой цели использовались ткани, фиксированные в формалине и заключенные в парафиновые блоки. Полученный при ПЦР амплификат можно верифицировать различными молекулярными методами: гибридизацией с известной последовательностью ДНК, расщеплением амплификата в определенном сайте рестриктазой, секвенированием амплифицированной ДНК (Виноградская Р. Г. и др., 1990; Boehnke M. et al., 1989; Canessa A., 1990; Giebel L. B. et al., 1990).

Секвенирование обычно осуществляют методом, описанным А. Махат и W. Gilbert (Махат А. et al., 1980), или по F. Sanger (Sanger F. et al., 1977). Условием для секвенирования по А. Махат и W. Gilbert является наличие меченной радиоактивной меткой ДНК, которую последовательно расщепляют в четырех отдельных реакциях, соответствующих каждому из четырех нуклеотидов. Распределение полученных отрезков ДНК в геле при электрофорезе согласно их длине позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность исследуемой ДНК (Matsuoka J. et al., 1990; Maxam A. et al., 1980).

Секвенирование по F. Sanger предусматривает использование меченных радиоактивной меткой трифосфатов и четырех видов терминаторов, в роли которых выступают дидезоксирибонуклеотиды. Проведение четырех параллельных реакций полимеризации, в каждой из которых используется определенный терминатор, дает возможность проследить последовательность нуклеотидов в ДНК (Gyllensten U. B. et al., 1985; Rager R. et al., 1984; Stoflet E. S. et al., 1988).

В работе D. L. Taylor и соавт. (1988) описан рестрикционный анализ ДНК ЦМВ. Оценивали 37 изолятов ЦМВ, полученных от 20 больных. При рестрикционном анализе ДНК все эпидемиологически неродственные штаммы ЦМВ обнаружили разный характер миграции фрагментов. От 9 пациентов были выделены последовательные изоляты ЦМВ либо из разных мест, либо из одного и того же места, но в разное время. У 7 человек вирусы имели лишь минимальные различия в профиле рестрикции, представляющие, вероятно, субпопуляции эндогенного штамма ЦМВ. У 2 больных отмечалась реинфекция другим штаммом. Делается вывод о возможности реинфекции ЦМВ, однако выделение вируса с кардинальными отличиями в структуре его генома с помощью рестрикционного анализа считается нереальным.

Наиболее полное представление о генетическом коде дает проведение секвенирования. Последнее позволяет оценить нуклеотидную последовательность, выявить различные варианты хромосомных нарушений (Бее С. С. *et al.*, 1988; Ил Н. *et al.*, 1988; 1989; Мизлаш М. *et al.*, 1989). Э. Спой (1990), приводя обзор различных способов диагностики ЦМВИ, говорит о необходимости дифференцирования носительства от болезни. Сообщается об использовании гибридизации ДНК, в том числе и в гистологических срезах. Применение биотиновой метки позволяет определять только активную инфекцию, но использование радиоактивных зондов дает возможность диагностировать и латентные формы. Подчеркивается перспективность ПЦР в изучении латентных форм инфекции. В то же время ПЦР может выявлять минимальные количества ДНК, что обуславливает необходимость оценки результатов совместно с данными клиники и других лабораторных методов. Отмечается важность ПЦР для предупреждения ЦМВИ у реципиентов костного мозга и внутренних органов (Оогензек М. «I. *et al.*, 1988; Л\та М. *et al.*, 1990).

В качестве примера использования современных методов для лабораторного подтверждения диагноза ЦМВИ можно привести результаты исследований Б. БашеИа *et al.* (1987), которые впервые выделили ЦМВ человека в культурах клеток носоглотки, которая, как предполагали, является участком первичного заражения. Хотя ЦМВ может быть выделен из носоглотки при реактивации, однако точный участок, в котором протекает латентная инфекция, неизвестен. В данной работе получены результаты, свидетельствующие о локализации ЦМВ при латентной инфекции в небных миндалинах. Материал 30 миндалин, полученных при тонзилэктомии, анализировали на наличие ЦМВ.

Попытки выделить инфекционный ЦМВ или другие вирусы в культурах клеток не дали положительных результатов. Вирусные антигены в тканях миндалин не обнаружены также и иммунопероксидазным методом. В то же время с помощью точечной блот-гибридизации в 4 из 30 миндалин выявлена вирусная ДНК.

Группа японских исследователей Такето1;о У *et al.* (1993) подвергали сравнительному обследованию 7 больных, у которых был поставлен клинический диагноз интерстициальной пневмонии. Исследовали кровь, мочу и бронхоальвеолярные

Таблица 20

**Методы лабораторной диагностики
цитомегаловирусной инфекции**

Методы	Время, необходимое для получения результатов	Примечания
Вирусологический		
• Электронная микроскопия	3 часа	Малодоступен
• Выделение вируса в культуре клеток (ЦПД)	4 - 20 дней	Стандартный
• Иммунофлуоресцентное окрашивание ранних АГ с применением моноклональных антител	2 - 4 дня 6 часов	Медленный Менее специфичный
Цитологический	2 - 3 часа	Менее специфичный
Серологический		
• РСК	2 дня	Стандартный
• РГА	1 день	Трудоемкий
• РИФ	6 часов	Простой, специфичный
• НРИФ	6 часов	Сложный
• РИМФ	6 часов	Сложный
• ИФА (IgM, IgG)	6 часов	Быстрый, простой
• Иммуноблот	6 часов	Дорогостоящий
Молекулярно-биологический		
• МГ	5 - 7 дней	Дорогостоящий, трудоемкий
• ПЦР	3 часа	Дорогостоящий

смывы, взятые на ранней стадии заболевания. Полученные образцы исследовали при помощи ПЦР, прямым иммунопероксидазным методом, серологически — путем определения специфических IgG и IgM и вирусологически — путем прямого выделения вируса. Показано преимущество ПЦР для быстрой диагностики с получением ответа через 5-6 часов после сбора образцов. Применение ПЦР дало положительные результаты при исследовании крови — 85,7%, мочи — 57% и бронхоальвеолярных смывов — 100%.

2.6. ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЭШПТЕЙНА — БАРР

Вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ) является возбудителем инфекционного мононуклеоза, с ним связывают развитие лимфомы Беркитта, опухолей из герминативных тканей. Этот вирус был впервые обнаружен при электронной микроскопии культуры клеток злокачественной лимфомы Беркитта.

Считают, что ВЭБ поражает 2 типа клеток:

1. Эпителиальные клетки верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта, вызывают продуктивную инфекцию.
2. В-лимфоциты, которые в результате вирусной инфекции активируются, размножаются и иммортализируются, то есть переходят в «бессмертное» состояние.

К числу заболеваний 1-го типа относят инфекционный мононуклеоз, к заболеваниям 2-го типа — злокачественную лимфому Беркитта. Эти болезни относятся к ряду СПИД-индикаторных патологий. Его роль при ВИЧ-инфекции в настоящее время интенсивно изучается (Рахманова А. Г. и др., 1990). Имеются работы, в которых ВЭБ рассматривается как кофактор прогрессирования ВИЧ-инфекции (Рахманова А. Г. и др., 1990).

Волосистая лейкоплакия — является характерным для СПИДа поражением слизистой оболочки полости рта, этиологическая роль ВЭБ при этом доказана (Кевшк Б. е! а!., 1988).

Описаны энцефалиты у больных ВИЧ-инфекцией, при которых были выявлены в СМЖ антитела против ВЭБ (Маг+дпо С V. е! а!., 1990). Имеются данные о роли ВЭБ в возникновении энцефалопатии при ВИЧ-инфекции (БибтьиЫ Б. М. е! а!., 1993).

Было высказано предположение, что у больных СПИДом лимфоцитарная интерстициальная пневмония (ЛИП) развивается в результате кофакторного воздействия ВЭБ (Кевшк Б. е! а!., 1988).

Обсуждается возможность развития неходжкинской лимфомы и синдрома лимфаденопатии у зараженных ВИЧ за счет избыточной пролиферации ВИЧ-специфических В-лимфоцитов, которые ранее были активированы ВЭБ (Атаа'ог! А. еЪз!., 1989).

Проведены работы, показывающие, что В-клетки могут служить источником вируса у ВИЧ-инфицированных ВЭБ-позитивных лиц (Тогг! V. е! а!., 1989).

Обнаружена связь ВЭБ с эпителиоидным ангиоматозом при СПИДе.

Полученные данные представлены как первые по обнаружению генетической информации ВЭБ в эндотелиальных клетках. Считают, что сосудистые поражения могут отражать неспецифический ответ на инфекцию и ВЭБ может быть вовлечен в патогенез некоторых поражений при СПИДе (Guarner J. et al., 1990).

Выявлена персистенция ВЭБ в эпителиальных клетках и при этом обсуждается участие данного герпесвируса в патогенезе опухолевых процессов при ВИЧ-инфекции (Nicholson L., 1994).

Имеются сообщение о корреляционной зависимости между повышением уровня антигена р24 и обнаружением ДНК ВЭБ *in vitro*, выявлено клиническое влияние данного эффекта на прогрессирование ВИЧ-инфекции (Lardelli P. et al., 1992).

Диагноз инфекционного мононуклеоза основывается на ведущих клинических симптомах и гематологических изменениях. Существенное значение имеют дополнительные лабораторные методы диагностики.

При инфекционном мононуклеозе в процессе заболевания появляются гетерофильные антитела (АТ) к эритроцитам различных животных (барана, лошади, быка и др.). В 1932 году Пауль и Буннель предложили реакцию, основанную на обнаружении в сыворотке крови больного противобараньих агглютининов. В дальнейшем было установлено, что эта реакция может быть положительной и при ряде других патологических состояний (пневмония, лейкоз, туберкулез, онкологические заболевания) и даже у здоровых людей, поэтому в настоящее время постановка этой реакции нецелесообразна.

В 1938 году Давидсон модифицировал реакцию Пауль — Буннеля; реакция считается положительной в том случае, если в сыворотке крови больного имеются АТ, которые агглютинируют бараньи эритроциты. Данные антитела адсорбируются при обработке сыворотки экстрактом из эритроцитов быка, не удаляются при адсорбции сыворотки экстрактом почки морской свинки. Диагностическими титрами считают 1:14 — 1 : 28.

Имеются и микромодификации этой серологической реакции, в которых для проведения реакции достаточно очень небольших количеств сыворотки. В частности, для постановки реакции Ловрика на стекло наносят 2 капли сыворотки больного; к одной добавляют суспензию эритроцитов баранов, к другой — те же эритроциты, обработанные протеолитическим

Таблица 21

**Серологический ответ пациентов
с ВЭВ-ассоциированными заболеваниями**

Состояние	Антн-УСА			Анти-ЕА		Анти-ЕВНА	(гетерофильные)
				Общие ЕА	Огранич. ЕА		
Неинфицированное	-	-	-	-	-	-	-
Инфекционный мононуклеоз	+	++	±	+	-	-	+
Состояние после ИМ	-	+	-	-	-	+	-
Хроническая активная инфекция		+++	±	+	++	±	
Посттрансплантационное		++	±	+	+	±	
Лимфома Беркитта	-	+++	-	±	++	+	-
Нозофарингеальная карцинома		+++	+	++	±	+	

Примечания:

- — отсутствие антител;

± — вероятное присутствие антител;

+

++ — стабильный уровень антител;

+++ — высокий уровень антител;

Анти-УСА — антитела к антигенам оболочки ВЭВ;

Анти-ЕА — антитела к раннему антигену ВЭВ;

Общие ЕА — общие антитела к раннему антигену ВЭВ, определяющиеся в острой фазе заболевания и в ядре и в цитоплазме клетки;

Огранич. ЕА — ограниченные антитела к раннему антигену ВЭВ, определяющиеся и разгар заболевания только в цитоплазме клетки

Анти-ЕВНА — антитела к ядерному антигену ВЭВ.

растительным ферментом папаином. Реакция считается положительной, если сыворотка больного агглютинирует нативные и не агглютинирует обработанные папаином эритроциты.

Эта реакция положительна у 78,7% больных инфекционным мононуклеозом.

На стекле ставится и реакция Гоффа — Бауэра, предложенная в 1965 году. К капле сыворотки больного добавляют каплю взвеси 4% формализированных эритроцитов лошади; резуль-

таты учитывают через 2 минуты. При инфекционном мононуклеозе реакция высокоспецифична.

Предложены и другие модификации гетероагглютинации, но они не нашли широкого практического применения.

Разрабатывается ИФ метод диагностики инфекционного мононуклеоза. АТ классов Ig G и M в сыворотке больного определяют путем ее инкубации с лимфобластами, зараженными ВЭБ, и последующей обработки флюоресцирующими АТ. В остром периоде заболевания АТ к вирусному капсидному АГ определяют в титре 1:160 и выше (Рахманова А. Г. и др., 1990).

Использовали (Taylor Y. et al, 1993) метод ПЦР для выявления ВЭБ в соскобах шейки матки. 327 женщин были инфицированы ВЭБ: 98 женщин из 235 с нормальными мазками и 33 из 92-х — с дискариотическими мазками. Это составляет около 40%.

2.7. ДИАГНОСТИКА ГВИ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 (ВГЧ-6), 7 (ВГЧ-7) И 8 (ВГЧ-8)

ВГЧ-6 типа был впервые выделен в 1986 году у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. Предварительные сероэпидемиологические исследования в различных регионах мира позволяют сделать заключение о широком распространении ВГЧ-6 в человеческой популяции (Исаков В. А. и др., 1991; Pruksananonda P. et al., 1992; Salahuddin S. Z. et al., 1985).

В 1992 году группой британских ученых под руководством E. Stacey была секвенирована область длиной 10 079 пар нуклеотидов штамма U1102 ВГЧ-6, соответствующим фрагментам SAII-H и Smal-G. Она содержит 6 целых открытых рамок считывания и 2 неполных. 7 из них имеют гомологи только у ЦМВ человека, но не у ВПГ-1 и 2-го типов, ВЗВ, ВЭБ. Полученные данные указывают на близкое родство ВГЧ-6 и ЦМВ и на то, что кластеры родственных tandemных генов являются общим признаком геномов γ -герпесвирусов (Stacey E. et al., 1992).

ВГЧ-6 был первично связан с инфекцией и репликацией в линиях Т-клеток. Характеристика ВГЧ-6 типа показала, что он антигенноотличен от других хорошо известных герпесвирусов — ВПГ-1, ВПГ-2, Ю Г, ЦМВ, ВЭБ. Выделены 2 вида изолятов ВГЧ-6 (А и В), которые могут быть дифференцированы

молекулярно-биологическими и иммунологическими способами (Ablashi D. V. et al., 1991). Отмечено, что в западной популяции человечества с большей частотой выявляют ВГЧ-6В типа. Это основано на молекулярных и иммунологических методах, с использованием рестрикции энзимов, ПЦР и специфических моноклональных АТ. ВГЧ-6 образцы, полученные у пациентов с ВЭ, были ВГЧ-6В. Еще не ясно, вызывает ли ВГЧ-6А какое-либо заболевание. Более того, в настоящее время нет адекватного метода дифференцировки АТ к различным вариантам ВГЧ-6.

Сотрудниками R. C. Gallo экспериментально показан синергизм патогенного действия ВИЧ-1 и ВГЧ-6 (Gallo R. C., 1990). ВГЧ-6, как и ВИЧ-1, инфицирует Т4-лимфоциты человека. Сам по себе ВГЧ-6 способен убивать инфицированную им Т-клетку. При этом один ВГЧ-6 не вызывает общего иммунодефицита организма. При совместной инфекции одной клетки ВГЧ-6 типа и ВИЧ первый способен активировать латентный провирус ВИЧ-1 до состояния активной репликации. Наряду с этим в литературе имеются сообщения и о подавлении размножения ВИЧ под влиянием ВГЧ-6 (Carrigan D. R. et al., 1990). Природа ингибирующего эффекта ВГЧ-6 пока остается неясной.

Особый интерес представляют работы по изучению спектра клинических и лабораторных данных, связанных с ВГЧ-6 типа (Bovenzi P. et al., 1993; Lusso P. et al., 1994; MacLean G. et al., 1994; Steeper T. et al., 1990). Имеются данные, косвенно указывающие на вероятность участия ВГЧ-6 в развитии злокачественной В-клеточной лимфомы, саркоидоза, синдрома Шегрена, лимфогранулематоза, не связанного с ВЭБ (Paulus W. et al., 1993). Выявлена причастность ВГЧ-6 к развитию острых гепатитов у взрослых и детей, в том числе и злокачественных форм заболевания с fulminantным течением. Роль ВГЧ-6 в этиопатогенезе поражений во всех этих случаях была подтверждена результатами иммунологических исследований (Исаков В. А. и др., 1991). К настоящему времени можно считать установленной этиологическую роль ВГЧ-6 в возникновении внезапной экзантемы (ВЭ) у детей раннего возраста и синдрома хронической усталости (СХУ) (Koichi J., 1995).

Вначале связь ВГЧ-6 с каким-либо специфическим заболеванием была неясна. В 1988 году высказано предположение, что ВГЧ-6 является первопричиной ВЭ. ВЭ поражает детей и впервые описана Загорским в 1910 году. Начало заболевания

характеризуется внезапным подъемом температуры тела в течение нескольких дней, появлением сыпи на теле и лице с последующим распространением на нижние конечности по мере угасания лихорадки. Доказательством вирусной этиологии заболевания являются следующие факты: во-первых — длительный инкубационный период и лейкопения, во-вторых — отсутствие клинического эффекта от антибактериальной терапии, в-третьих — отсутствие роста бактерий при посевах различного материала из биологических жидкостей больного, а также воссоздание экспериментальной инфекции путем иннокуляции крови больного ВЭ в культуру чувствительных клеток (КокЫЛ., 1995).

ВЭ является частым заболеванием детей и в основном протекает со стертыми клиническими симптомами. В большинстве случаев дети поправляются через несколько дней после возникновения ВЭ без каких-либо осложнений. Однако у некоторых детей была выявлена дисфункция печени, связанная с этим заболеванием. В одном из первых таких сообщениях описан случай фульминантного гепатита, очевидно, вследствие ВГЧ-6 инфекции, а в другом — случай дисфункции печени, последовавший за внезапной лихорадкой. У обоих пациентов ВГЧ-6 был выделен из периферической крови.

Другим частым осложнением, связанным с ВЭ, могут быть конвульсивные судороги, но даже в этом случае отмечают благоприятный прогноз. Энцефалиты и другие осложнения со стороны ЦНС при ВЭ — достаточно редки. Частота энцефалитов варьирует от 0,6 - 5,0%, но четкие случаи судорог, связанных с ВЭ, трудно определить. ВЭ может также рассматриваться как фактор риска для повторных фебрильных судорог.

Описано несколько случаев энцефалита, вызванных ВГЧ-6. Ниже приведен случай энцефалита, в котором доказана этиологическая роль ВГЧ-6 типа. 14-месячная девочка, страдающая острым менингоэнцефалитом с лихорадкой, имела сыпь после жара, слабость, фебрильные подергивания с генерализованными клоническими и тоническими судорогами, частыми правосторонними клоническими подергиваниями. Количество клеток в ликворе было повышено и в острой фазе, одновременно из ее крови выделили ВГЧ-6 типа. Титр антител к ВГЧ-6 показал сероконверсию. ЭЭГ выявила продолжительный вольтаж медленных волн, преимущественно в левой церебральной гемисфере. После прохождения судорожного синдрома в течение 4-х месяцев

наблюдали поражение правого лицевого нерва и гемипарез правых конечностей. На 14 день от начала заболевания краниальная компьютерная томография выявила легкую атрофию левых фронтально-центральных долей. На 21 день при томографии (СПЕСТ) с 99 m TcHMPQO было показано снижение кровотока в левой гемисфере (Koichi J., 1995).

ПЦР теперь делает возможным выявление вирусспецифической ДНК, а использование специальных праймеров повышает специфичность и чувствительность данного метода. ПЦР с использованием праймеров для определения ВГЧ-6 в ликворе выявила связь неврологических симптомов с вирусной инфекцией. Образцы спинномозговой жидкости у пациентов с ВЭ при неврологической симптоматике (судороги, рвота, раздражительность, вздутие родничка) во время фебрильной фазы заболевания при исследовании данным методом давали положительный результат по выявлению в них ДНК ВГЧ-6.

Эти данные подтверждают, что ВГЧ-6 может поражать мозг в острую фазу ВЭ и что возобновление фебрильных подергиваний может быть связано с реактивацией вируса. ВГЧ-6 также может определяться ПЦР в тканях головного мозга здоровых, умерших и больных, погибших от СПИДа, а недавно ВГЧ-6 геном был выявлен у пациента с множественным склерозом. Имеются сообщения о связи с ВГЧ-6 инфекцией — инфекционного мононуклеоза, лимфаденопатии, пневмонии. Однако до настоящего времени остается неясным, возникли ли эти заболевания вследствие первичной инфекции ВГЧ-6 или ее реактивации.

Серологические исследования при ВЭ указывают на то, что титр АТ к ВГЧ-6 в парных образцах сывороток у детей с острой и реконвалесцентной стадией ВЭ имеет четкую корреляцию между ВЭ и ВГЧ-6 инфекцией. Когда образцы сывороток, полученные у пациентов с ВЭ в остром и реконвалесцентном периодах, изучались на антительный ответ к IgG и IgM, было установлено, что АТ к IgM выявлялись на 7 день и в течение последующих 3 недель. Данные АТ в большинстве сывороток не определялись спустя месяц. АТ к IgG не были выявлены на 7 день после начала заболевания, но в течение 3-недельного периода нарастали и определялись на протяжении 2-х месяцев. Интересно отметить, что титры к ВГЧ-6 выявлялись во время других вирусных инфекций, таких как ВГЧ-7 инфекция и корь (Koichi J., 1995).

В течение некоторого времени попытки выявить причинный агент ВЭ были безуспешными, но в настоящее время ВГЧ-6 типа был выделен у пациента с острой фазой этого заболевания. Мононуклеарные клетки периферической крови больного ВЭ были собраны в фебрильный период этого заболевания и прокультивированы в среде, содержащей ИЛ-2 совместно с фитогемагглютинином. Примерно 10 дней спустя после культивации наблюдался цитопатогенный эффект. Данные клетки были фиксированы и выделены из сыворотки при ранней и поздней реконвалесценции.

Электронная микроскопия ядер и цитоплазмы указывала на участки, типичные для поражения ГВ. Диаметр вируса был 90 - 110 нм в ядре, в то время как в цитоплазме — 150 - 170 нм. Специфические для других ГВ сыворотки не реагировали на данный антиген. АГ к ВГЧ-6 (229 участок, выделенный Лоренсом) реагировали на парные сыворотки пациента с ВЭ. Никаких АТ не обнаруживалось к обоим АГ в острую фазу, но их титр повышался к обоим АГ в стадии реконвалесценции. Это указывало на то, что антигенно выделенный у пациентов с ВЭ вирус был ВГЧ-6 типа. Выделение ВГЧ-6 из моноцитарных клеток у больных с ВЭ более быстро во время фебрильной стадии, чем во время экзантемы и особенно сложно происходит выделение ВГЧ-6 типа у более старших детей и взрослых.

Поскольку ВГЧ-6 может быть выделен у пациентов с иммунодефицитными состояниями, было сделано предположение, что вирус может быть реактивирован, например, у больных СПИДом, лейкемией, лимфомами, после трансплантации, при синдроме СХУ и у больных коллагеновыми заболеваниями. ДНК ВГЧ-6 или ее антиген также определялись в тканях некоторых лимфоузлов, почек и слюнных желез. Кроме того, вирусные АГ определялись в гломерулярных клетках почек, гистиоцитов и лимфоцитов отторгнутых почек и в лимфатических узлах пациентов с ЛАП.

Эти данные указывают, что после первичной инфекции ВГЧ-6 становится латентным внутри организма и может быть реактивирован при таких условиях, как иммуносупрессия. Патогенез ВГЧ-6 во время реактивации, однако, до сих пор не ясен, а место латентной ВГЧ-6 инфекции также не до конца изучено. ВГЧ-6 был изолирован из слюны, а ВГЧ-6 АГ был определен в слюнных железах. Можно предположить, что вирус может постоянно инфицировать слюнные железы и выделяться из них.

ДНК ВГЧ-6 случайно определили в периферической крови здоровых взрослых. Для идентификации действительного места латентной инфекции *in vivo* был проведен следующий эксперимент. Периферическая кровь пациентов с ВЭ была получена в острой и реконвалесцентной фазах заболевания, а также у здоровых взрослых. Были разделены фракции моноцитов и лимфоцитов; ДНК выделялась из клеток и определялась посредством ПЦР. ДНК ВГЧ-6 была обнаружена в обеих фракциях в острую фазу, но в основном только в моноцитной фракции крови пациентов в стадии выздоровления и у здоровых взрослых. Хотя вирус не может быть выделен из клеток выздоравливающих или здоровых взрослых, он может латентно инфицировать моноциты и макрофагальные клетки. Эти данные позволяют предположить, что ВГЧ-6 может оставаться латентным на некоторое время в моноцитах и макрофагах. Хотя еще не ясно, действительно ли эти клетки являются основным местом латентной ВГЧ-6 инфекции *in vivo*.

Анализ межштаммовых изменений в предполагаемом предраннем участке ДНК ВГЧ-6 позволил (Chou S. et al.) в 1994 году получить вариант-специфические последовательности групп А и В, которые можно использовать в качестве праймеров для выявления в ПЦР данных вариантов вместе и в отдельности (Chou S., 1990).

В 1990 году Френкелем был впервые выделен другой ГВ — ВГЧ-7 типа из CD4 лимфоцитов здоровых людей. Сероэпидемиологические работы показали, что первичное заражение происходило в детстве и ВГЧ-6 и ВГЧ-7, но ВГЧ-7 — несколько позже (Frencel N. et al., 1990).

Ablashi D. V. et al. (1994) сообщает, что ВГЧ-7, выделенный впервые в 1990 году у здорового человека, является повсеместным агентом. Второе независимое выделение ВГЧ-7 от пациента с синдромом хронической усталости было описано в 1992 году. В США частота встречаемости ВГЧ-7 превышает 85 %, однако в Японии описывается более низкая частота. ВГЧ-7 чаще может быть выделен из слюны, чем ВГЧ-6. Первичное заражение ВГЧ-7 происходит позже, чем ВГЧ-6. ВГЧ-7 более тесно связан с ВГЧ-6 и цитомегаловирусом, чем другие члены семейства герпесвирусов.

Позже группа американских ученых под руководством Р. Галло (1992) получила новый штамм ВГЧ-7 у больного с СХУ. Выделенный ВГЧ-7 был охарактеризован как Т-лимфотропный

вирус, обладающий способностью инфицировать СБ4 и СБ8 лимфоциты, а также клетки **виР-И** и незрелые Т-клетки. Методом блотинга показана аналогия генома ВГЧ-7 с геномом ВГЧ-6 на уровне 58,8%. Секвенирование ДНК подтвердило наличие гомологии с ВГЧ-6 на уровне 57,5% и показало гомологию с ЦМВ на уровне 36%. Выделенный ВГЧ-7 классифицируется как дополнительный член Ъ-герпесвирусов человека.

КоJoЛeI al. (1995) в связи с сообщением о выделении ВГЧ-7 из СБ-4 лимфоцитов периферической крови у здоровых людей провел поиск антител к данному вирусу среди здоровых мексиканцев. 200 образцов крови от кандидатов в доноры в Главном госпитале в Мехико было исследовано с помощью непрямого иммуноферментного теста (ИФА) на инфицированность в 8ирТ1 клетках. 83,5% обследованных были мужчины, средний возраст 28,8 года, и 16,5% женщины, средний возраст 31,5 года. Доноры приехали из 12 штатов Мексики, преимущественно из городов и имели различное социальное положение. Практически все образцы крови (98,5%) были положительны по ВГЧ-7. Другие исследования обнаружили 1% положительных по бруцелле, 1% — по гепатиту В, 2% — по сифилису, НСТ и НГУ тесты были отрицательны во всех исследуемых группах. Отмечалась высокая частота определения ВГЧ-7 в исследуемых группах — более 50% имели высокие титры. Эти результаты должны быть изучены для определения титров, указывающих на активную инфекцию, а также на связь с другими заболеваниями.

Тотцое в.еБа! (1995) описывал 22 случая ВГЧ-7 инфекции. ВГЧ-7 инфекция возникает позже, чем ВГЧ-6 инфекция, и вызывает внезапную экзантему у 47,1% детей. ВГЧ-7 инфекция ассоциирована с внезапной экзантемой и другими симптомами, которые наблюдаются при ВГЧ-6 инфекции.

РогЫаш М. etal. (1995), описывает, что вирус, выделенный из лимфоцитов периферической крови детей с неспецифическим лихорадочным синдромом, был идентифицирован как ВГЧ-7 на основе анализа нуклеотидной последовательности ДНК с помощью ПЦР, специфичной для ВГЧ-7. Предполагается связь между ВГЧ-7 и фебрильной лихорадкой у детей.

АвапоУ. еI al. (1995) исследовал клиническую картину у вирусологически подтвержденных пациентов с первичной ВГЧ-7 инфекцией и взаимоотношения между ВГЧ-7 и ВГЧ-6 инфекцией. В работе приведена история болезни 13-летнего мальчика, перенесшего в 6-месячном возрасте внезапную экзантему,

сопровождавшуюся 3-х дневной лихорадкой и кожной сыпью, возникшей после снижения температуры. Заболевание протекало с неспецифическими симптомами, такими как анорексия, раздражительность, диарея, отек век, слабый фарингит и затылочный и шейный лимфаденит. Для выделения ВГЧ-6 и ВГЧ-7, а также определения обеих вирусных ДНК с помощью ПЦР использовали гепаринизированную кровь. Другие жидкости организма были также обследованы на наличие вирусной ДНК с помощью ПЦР. Оба типа антивирусных антител были определены с помощью непрямой иммунофлюоресценции и реакции нейтрализации. Культура мононуклеарных клеток от пациента в активной фазе заболевания давала морфологические изменения при взаимодействии только с моноклональными антителами к ВГЧ-7, но не ВГЧ-6. Оба вируса не определялись в крови во время реконвалесценции. Антительный ответ пациента выявлял сероконверсию к ВГЧ-7, но не к другим микробным агентам, включая ВГЧ-6 и *Mycoplasma pneumoniae*. Обе вирусные ДНК были определены в мононуклеарах периферической крови как в острую, так и в стадию ранней реконвалесценции. ДНК ВГЧ-7 экскретировалась со слюной и транзиторно с калом в стадии ранней реконвалесценции, следовавшей за экскрецией ВГЧ-6 со слюной. Ни ВГЧ-7, ни ВГЧ-6 не экскретировались с мочой. Клиническая картина у пациента с вирусологически подтвержденной первичной ВГЧ-7 инфекцией похожа на клинику ВГЧ-6 инфекции, и ВГЧ-7 инфекция может реактивировать ВГЧ-6.

Tanaka K. et al. (1994) выделили ВГЧ-7 из мононуклеаров периферической крови двух детей с типичной внезапной экзантемой. HindIII-, BamHI-, EcoRI- ДНК участки выделенных вирусов были очень похожи на такие участки прототипа ВГЧ-7 (RK тип), но отличались от ВГЧ-6. В течение периода реконвалесценции у первого пациента титр антител к ВГЧ-7 нарастал от $< 1:10$ до $1:320$ в иммунофлюоресцентном антительном тесте, в то время как титр антител к ВГЧ-6 оставался $< 1:10$. У второго пациента, который имел два независимых эпизода внезапной экзантемы в течение двух месяцев, были выделены как ВГЧ-6, так и ВГЧ-7. Сероконверсия в первом случае была к ВГЧ-6, а во втором к ВГЧ-7. Сыворотки от 15 других детей с эпизодом внезапной экзантемы были серологически обследованы на антитела к ВГЧ-6 и ВГЧ-7 с помощью иммунофлюоресцентного антительного теста. Пять из семи пациентов име-

ли антитела к ВГЧ-7 сразу после типичных симптомов внезапной экзантемы. Эти результаты позволяют предположить, что ВГЧ-7 является одной из причин внезапной экзантемы.

Foa-Tomasi L. et al. (1994) установили, что гипериммунные кроличья и мышинная сыворотки, специфические для человеческих ВПГ-7 инфицированных клеток, и человеческая иммунная сыворотка идентифицированная 20[35S]methionine-[35S]cystein белками, специфичная для ВПГ-7 пораженных мононуклеарных клеток, имели белки, молекулярная масса которых варьировала в участках от М(г)136К до 30К. Большинство белков имели спектры от 121К, 100К, 87К, 85К, 60К, 51К, 46К, 42К, 40К и 36К. Человеческая сыворотка также определялась с помощью 7[3H]glucosamine-**raHKonpoTeHflbi**, с участками М(г) спектра 100К, 89К, 82К, 67К, 63К, 53К и 41К. Сообщают о выделении 4-х моноклональных АТ животных, специфических для ВГЧ-7 пораженных клеток. Из них 2 про-реагировали с 5-АГсвязанными полипептидами (p85-комплекс), а 2 — с другой группой полипептидов (p121-комплекс). Была использована также и человеческая сыворотка, которая реагировала с теми же полипептидами, таким образом оба эти белка p85 и p121 являются иммунодоминантными как для людей, так и для лабораторных животных. Гипериммунизированная мышинная сыворотка и некоторые из моноклональных АТ показали перекрестную реакцию с ВПГ-6А и ВПГ-6В инфицированными клетками. Причастность перекрестной реакции к человеческому иммунному ответу на ВПГ-6 и 7 инфекции и преобладание анализов обсуждается.

Группа американских ученых под руководством Р. Галло (1994 г.) получила два типа ВГЧ-7 из фитогемагглютинин-активированных мононуклеаров периферической крови пациента с синдромом хронической усталости и здорового донора. Генетические различия между этими двумя типами определялись с помощью Southern блотинга, использовавшего новый ВГЧ-7 генетический клон (pVL8) в качестве пробы. Они определили оптимизированные условия для размножения ВГЧ-7 *in vitro*, используя обогащенные популяции активированных CD4⁺ Т лимфоцитов, происходящих из нормальной периферической крови, которые привели к продукции высококонцентрированного внеклеточного вируса ($> 10^6$ инфицирующих доз/мл). Достоверное синцитиообразование было получено как в нормальных CD4⁺ Т лимфоцитах, так и в Sup-T1 CD4⁺ Т-клеточных

линиях после заражения высококонцентрированным ВГЧ-7. Был разработан синцитий-ингибирующий тест для определения нейтрализации антител к ВГЧ-7. Различные титры синцитий-нейтрализующих антител были определены во всех человеческих сыворотках, что доказывает высокую частоту встречаемости ВГЧ-7 в человеческой популяции.

До сих пор еще не установлено, как ВГЧ-6 и ВГЧ-7 передаются детям. Известно, что передача вирусных инфекций у новорожденных происходит либо через плаценту, либо горизонтально, т. е. от лиц, тесно связанных с новорожденными (матерей, врачей и медсестер). Сероэпидемиологические исследования показали, что уровень АТ положительных к ВГЧ-6 постепенно снижался от момента рождения до 5 месяцев, а затем возрастал до 100% к 1,5 года. Никаких различий не было выявлено в уровне антител к ВГЧ-6 инфекции у детей, находящихся на естественном и на искусственном вскармливании, а также у детей, рожденных естественным путем или родившихся в результате кесаревого сечения.

Методом ПЦР выделена ДНК ВГЧ-6 из слюны и глотки у пациентов с ВЭ и здоровых взрослых людей, включая матерей. Однако ДНК ВГЧ-6 не определялась ПЦР в пуповинной крови, а Ig М ВГЧ-6 типа не были также выявлены в периферической крови у новорожденных. В 1994 году Hall сообщил, что ДНК ВГЧ-6 мог быть выявлен в крови у новорожденного за счет материнских антител, обычно присутствующих при рождении и постепенно снижающихся в первые несколько месяцев жизни.

Локальное распространение и сезонные вспышки ВЭ редки, хотя иногда наблюдается рост ВГЧ-6 инфекции в детских учреждениях. В соответствии с последними данными не было значительной разницы ДНК ферментной рестрикции изолятов из периферической крови у детей и слюны их матерей. Таким образом, постоянная экскреция и/или возвратные эпизоды выявления ВГЧ-6 из слюны и почти 100% уровень сероконверсии может предположить тесную связь и контакт как путь передачи в раннем периоде жизни, первично от матери к ребенку.

Некоторые исследователи сообщают, что ВГЧ-7 может быть выделен из слюны здоровых взрослых. Пути передачи ВГЧ-7 еще не определены, хотя некоторые исследователи указывают, что вирус может быть нередко выделен из слюны здоровых взрослых. Наоборот, чрезвычайно тяжело выделение ВГЧ-6 из слюны, однако подобный путь передачи ВГЧ-6 может быть ана-

логичен ВГЧ-7, хотя еще не ясно, почему ВГЧ-7 инфекция зачастую возникает позднее в жизни, чем инфицирование ВГЧ-6 типа (Kolcsy 3., 1995).

Хотя ВГЧ-7 типа был выделен у практически здоровых взрослых и у пациентов с СХУ, клинические признаки ВГЧ-7 инфекции не были установлены. Недавно ВГЧ-7 были идентифицированы в ПМК крови у 2 детей с ВЭ.

Участки ДНК изол изолированных вирусов, выделенные с помощью различных рестриктаз, были очень схожи с ВГЧ-6 (1Ж-участок).

Во время периода реконвалесценции 1-го пациента титр АТ к ВГЧ-7 иммунофлюоресцентным методом антительным тестом рос значительно, в то время как титр АТ к ВГЧ-6 оставался отрицательным. У 2-го пациента, который имел 2 независимых эпизода ВЭ за 2-месячный период, оба ВГЧ-6 и ВГЧ-7 были выделены и секвенированы. Сероконверсия происходила к ВГЧ-6 во время 1-го эпизода ВЭ, а к ВГЧ-7 — во время второго.

Эти результаты дают основание предположить, что ВГЧ-7 является причинным агентом ВЭ. Интересно отметить, что 2-й эпизод ВЭ был вызван ВГЧ-7. АТ к ВГЧ-7 у некоторых пациентов с этой ВЭ обнаружены в период реконвалесценции. Более того, у некоторых пациентов, сероконвертировавших ВГЧ-7 только после того как имели типичные признаки симптомов 2-го эпизода ВЭ, определяли АТ к ВГЧ-7, хотя никаких признаков ВГЧ-7 инфекции не наблюдалось.

Гсбшг Т. Г. е! а1. (1995) выделили из биоптата у пациента с саркомой Калоши вирусоподобные частицы, содержащие ДНК с элементами гомологии к ВЭБ и герпесвирусу обезьян саймири. При этом было отмечено, что если вновь идентифицированный вирус вызывает саркому Калоши, его логично называть — вирус герпеса человека 8 типа (ВГЧ-8).

2.8. ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ ГЕРПЕСВИРУСОВ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Выяснение зависимости между характером течения ГВИ, выявлением специфических маркеров и степенью изменений иммунологических показателей, как гуморальных, так и клеточных, может иметь существенное клинико-патогенетическое значение. В настоящее время стало очевидным, что

ГВИ у взрослых и детей по существу является обострением персистентной инфекции на фоне иммуносупрессии (Галкин Ю. Н. и др., 1990; Martino G. V. et al., 1990; Matsuoka J. et al., 1990; Maхam A. et al., 1980; McGuire, 1993). Это особенно отчетливо проявилось в последние годы в связи с резкой активизацией ВИЧ-инфекции, которая весьма часто сопровождается обострением и генерализацией ГВИ (Скрипкин Ю. К. и др., 1988).

Экспериментальные и клинические данные показали различные механизмы, формы и исходы взаимодействия герпес-вирусов в культуре ткани и организме инфицированного человека (Bovenzi P. et al., 1993). При этом смешанные инфекции могут быть вызваны различными типами одного вируса (Dubrenil-Lemaire M. et al., 1993).

Диагностика и терапия таких микст-инфекций представляют значительные трудности. Это связано не только со сложностью дифференциальной диагностики, но и с особенностями их патогенеза, обусловленными прежде всего формированием иммунодефицита (Келли Е. И. и др., 1985; Рахманова А. Г. и др., 1990; Семенов Б. Ф. Hflp., Giebel L. B. et al., 1990). В связи с этим особое значение приобретают ВИЧ — ГВИ-инфекции, поскольку показаны возможности реактивации одним вирусом другой латентной инфекции и их активации.

В группу обследованных больных входили пациенты с различными герпесвирусными инфекциями. Отмечено, что прогрессирование основного заболевания (ВИЧ-инфекции) сопровождается присоединением большого количества сопутствующих герпесвирусных инфекций.

Большой интерес представляет изучение специфических маркеров, выявляемых молекулярной гибридизацией (МГ). В частности, обнаружение нуклеотидных последовательностей герпесвирусов в периферических моноклеарах является дополнительным фактором постановки диагноза ГВИ. Возникает также необходимость сопоставления полученных данных с имеющимися и ставшими традиционными методами цитологического, серологического и иммунологического обследования.

В этой работе предпринимается попытка комплексной оценки течения ГВИ с учетом состояния системы иммунитета у больных ВИЧ-инфекцией по стадиям инфекционного процесса.

Специфические маркеры ГВИ методом МГ определялись у всех больных с момента поступления в стационар в среднем

на 5 ± 2 день болезни и затем в динамике в течение всего срока наблюдения.

Во ПБ стадии ВИЧ-инфекции маркеры ГВ, определявшие-ся методом МГ, отсутствуют у 13 ($72,2 \pm 10,6\%$) взрослых ВИЧ-инфицированных и один маркер ГВ обнаруживается у 5 ($27,8 \pm 10,5\%$). У всех 5 обследованных методом МГ выявляли ДНК ВПГ-1. Нуклеотидные последовательности ДНК ВПГ-2, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 выявлены не были. При этом в контрольной группе частота выявления ДНК ВПГ-1 составила $6,6 \pm 4,5\%$.

В стадии ПВ ВИЧ-инфекции нуклеотидные последовательности ДНК ВПГ-1 были выявлены у 11 больных ($36,7 \pm 8,7\%$). По мере прогрессирования ВИЧ-инфекции достоверно чаще ($p < 0,001$) выявляли ДНК ВПГ-1 (ША-Б — $68,9 \pm 8,45\%$ и ШВ — $88,5 \pm 5,8\%$).

Наряду с молекулярно-биологическими методами исследования у взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов проводили цитологическое и специфическое серологическое обследование на наличие маркеров ГВИ (табл. 22 и 23).

Из приведенных данных видно, что при серологическом обследовании взрослых ВИЧ-инфицированных в стадии ПВ частота обнаружения IgG к ВПГ-1,2 не отличалась от контрольной группы и составила 100%. Ag ВПГ-2 на данной стадии заболевания обнаружен у 3,3% больных. Частота выявления ДНК

Таблица 22

Частота выявления (%) маркеров ВПГ-1 и ВПГ-2 у взрослых ВИЧ-инфицированных в различные стадии болезни

Стадия	Методы			
	Серологические		Молекулярно-биологические	
ВИЧ-инфекции	IcСвВПГ-1 + ВПГ-2	Ag ВПГ-2	ВПГ-1	ВГГГ-2
Контроль (n = 30)	100	—	$6,6 \pm 4,5$	—
ИБ (n = 18)	100	—	$27,3 \pm 10,5^{**}$	—
ПВ (n = 30)	100	$3,3 \pm 3,2$	$36,6 \pm 8,7^{**}$	$6,7 \pm 4,5$
ША-Б (n = 31)	$92,3 \pm 4,5$	$6,6 \pm 4,4$	$68,9 \pm 8,5^{**}$	$41,5 \pm 8,8$
ШВ (n = 16)	$87,4 \pm 8,2$	$15,4 \pm 9,0$	$88,5 \pm 7,9$	$76,9 \pm 10,5$

Примечание: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; n — число больных

Таблица 23

**Частота выявления (%) маркеров ЦМВ
у взрослых ВИЧ-инфицированных в различные стадии болезни**

Стадия ВИЧ-инфекции	Методы			
	Серологические		Молекулярно-биологические	
	IgG ВПГ-1 + ВПГ-2	Ag ВПГ-2	ВПГ-1	ВПГ-2
Контроль (n = 30)	—	—	100	$3,6 \pm 3,2$
ИБ (n = 18)	—	—	100	—
ИБ (n = 30)	$26,7 \pm 8,1$	$23,3 \pm 7,7$	100	$34,3 \pm 8,6^{**}$
ША-Б (n = 31)	$32,6 \pm 8,4$	$29,0 \pm 8,1$	$93,5 \pm 4,4$	$68,9 \pm 8,3^{**}$
ШВ (n = 16)	$41,8 \pm 12,3$	$25,0 \pm 10,8$	$81,3 \pm 9,7$	$92,3 \pm 6,6^{**}$

Примечание: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; n — число больных

ВПГ-1 и ВПГ-2 (соответственно 36,7% и 6,7%) в стадии ИВ ВИЧ-инфекции была достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$).

Уровень IgG к ВПГ-1,2 в ША-Б и ШВ стадиях ВИЧ-инфекции был высоким и соответственно составил 92,3% и 87,4%. По мере прогрессирования ВИЧ-инфекции у взрослых частота обнаружения Ag ВПГ-2 возрастала — с 6,5% в ША-Б стадиях до 15,4% в ШВ. Достоверно чаще ($p < 0,001$) выявляли ДНК ВПГ1 (ША-Б — 68,9% и ШВ — 88,5%) и ДНК ВПГ-2 (ША-Б — 41% и ШВ — 76,9%).

Наряду с маркерами ВПГ-1 и ВПГ-2 в стадии НВ выявляли маркеры ЦМВИ (цитологическим и серологическим методами). Частота обнаружения клеток, пораженных ЦМВ, при цитоскопии осадка мочи и слюны составила 26,7%. Выявление у 23% больных IgM к ЦМВ и у 34,3% пациентов ДНК ЦМВ может свидетельствовать о реактивации латентной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) на данной стадии.

Частота обнаружения клеток, пораженных ЦМВ, составила в стадиях ША-Б — 32,6% и в стадии ШВ — 41,8%. Уровень IgM и Ig G к ЦМВ в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных взрослых не изменялся ($p > 0,05$). Напротив, частота выявления нуклеотидных последовательностей ЦМВ методом молекулярной гибридизации возрастала ($p < 0,001$) в ША-Б и в ШВ стадиях (соответственно составила 68,9% и 92,3%).

Во IIВ стадии ВИЧ-инфекции у 23,3% взрослых пациентов наблюдали преимущественно локализованные формы герпетических поражений. При этом отмечали редко рецидивирующий герпес кожи и слизистых (не чаще 1 раза в 1 - 3 года). У 2 пациентов (6,7%) выявлено сочетание орофациального и генитального герпеса.

Таким образом, у взрослых больных на стадиях первичных проявлений ВИЧ-инфекции комплексное лабораторное обследование с применением молекулярно-биологических, серологических и цитологических методов позволило выявить манифестные и стертые формы ГВИ.

В стадиях GOA-B у 32% ВИЧ-инфицированных взрослых наблюдали герпетические поражения кожи (у 38,7%), слизистых оболочек ротовой полости (у 6,5%) и половых органов (у 9,7%). В стадии ШВ частота выявления герпетических поражений (52%) и их рецидивов (1 раз в 3 - 6 месяцев) возрастала. При этом преобладали распространенные формы поражения кожи (язвенно-некротический герпес в 12,5%), слизистых оболочек ротовой полости (везикулярно-эрозивный гингивит 18,8%) и половых органов (22,5%).

Клиническая манифестация цитомегаловирусной инфекции на стадиях вторичных проявлений протекала в виде хориоретинитов и увеитов. По мере прогрессирования ВИЧ-инфекции их частота достоверно возрастала с 15,5% в стадии GOA-B до 46,3% в стадии ШВ ($p < 0,01$). У 4 (25%) ВИЧ-инфицированных в терминальной стадии происходило значительное снижение остроты зрения, а у 1 (6,3%) — наступила слепота. Необходимо отметить, что отсутствие четких клинических признаков ЦМВИ при ВИЧ-инфекции, очевидно, было связано с присоединением вторичных бактериальных и кандидозных поражений различных систем и органов на данных стадиях заболевания.

У детей, инфицированных ВИЧ, специфические маркеры ГВИ методом МГ определялись также с момента поступления в стационар и затем в динамике в течение всего срока наблюдения.

При исследовании мононуклеаров периферической крови выявили ДНК ВПГ-1 — в $61,9 \pm 10,5\%$ случаев в ША-B и в $92,8 \pm 6,9\%$ — в ПГО стадиях ($p < 0,01$). Соответственно ДНК ВПГ-2 обнаружили у $14,2 \pm 7,61\%$ пациентов в стадиях ША-B и у $21,4 \pm 10,96\%$ в стадии ШВ ВИЧ-инфекции (рисунок 4.6 и 4.7). ДНК ЦМВ выявляли в $62,0 \pm 10,5$ случаев в стадии ША-B и в $93 \pm 6,9\%$ случаев в стадии ШВ ВИЧ-инфекции ($p < 0,01$).

ДНК вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) обнаружена у детей, инфицированных ВИЧ, в ША-Б стадиях у $42,8 \pm 12,4\%$ детей, а в ШВ стадии — $86 \pm 8,6\%$ (рисунок 4.8, 4.9). При этом только у 4 детей ($28,6 + 11,2\%$) на стадии ШВ ВИЧ-инфекции были выявлены методом молекулярной гибридизации нуклеотидные последовательности вируса Эпштейна — Барр.

У детей, входящих в контрольные группы, были выявлены ДНК ВПГ-1 ($17,8\% \pm 7,2\%$), ДНК ВПГ-2 ($3,6\% \pm 3,5\%$), ДНК ЦМВ и ВГЧ-6 соответственно ($21,1 \pm 7,48\%$ и $10,7\% \pm 7,7\%$).

Обнаружение нуклеотидных последовательностей к указанным вирусам подтверждает литературные данные о высокой степени инфицированности человеческой популяции, начиная с раннего детства. Наряду с этим имеются работы, указывающие на участие герпесвирусов в развитии острых респираторных заболеваний, при этом наблюдали отсутствие антител к другим респираторным вирусам. Наряду с молекулярно-биологическими методами исследований у детей, инфицированных ВИЧ, проводили цитологическое и специфическое серологическое обследование на наличие маркеров ГВИ (см. табл. 22 и 23).

У детей в IIIА-Б и ШВ стадиях уровень IgG к ВПГ-1,2 был высоким и соответственно составил 91% и 93%. Ag ВПГ-2 в сыворотке крови больных детей выявлен не был.

При цитоскопии осадка мочи и слюны обнаружили клетки, пораженные ЦМВ: в стадии ША-Б у 52%, а в стадии ШВ — у 57% детей. Частота обнаружения IgG к ЦМВ в данных стадиях была высокой и составила 91% — 93%. IgM к ЦМВ выявляли в 57% случаев в ША-Б стадиях, в 43% случаев — на ШВ. При этом ДНК ЦМВ выявляли в 62% случаев в стадии ША-Б и в 93% случаев в стадии ШВ ВИЧ-инфекции ($p < 0,01$).

Герпетические поражения в IIIА-Б стадиях выявляли у 47,6% больных, которые нарастали (до 78,5%) в стадии ШВ ВИЧ-инфекции ($p < 0,01$). Распространенные герпетические поражения кожи у пациентов на данной стадии ВИЧ-инфекции диагностировали в 2 раза чаще, чем на стадиях ША-Б ($p < 0,05$). Генерализация герпетической инфекции с поражением ЦНС и подострым течением процесса в нашем исследовании была выявлена у 1 ребенка в ШВ стадии ВИЧ-инфекции.

У 15% ВИЧ-инфицированных детей в стадиях ША-Б диагностирована цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ), клиническим проявлением которой был, вероятно, сиалоаденит. В стадии ШВ частота его обнаружения возрастала до 50% ($p < 0,01$).

Наряду с этим у ВИЧ-инфицированных взрослых (в стадии ИВ у 6,7%, в ША-Б у 12,5%, а в ШВ — у 65,4%) и у детей (на стадии ШВ — 29%) были выявлены методом молекулярной гибридизации нуклеотидные последовательности вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ). При этом клинической картины инфекционного мононуклеоза не было зарегистрировано ни у одного из больных. Вместе с тем в единичных случаях у обследуемых пациентов выявляли остроконечные кондиломы, волосистую лейкоплакию языка, язвенно-некротические поражения кожи. Полученные нами результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные об этиологической роли ВЭБ в поражении слизистых оболочек полости рта, о связи данного герпесвируса с эпителиоидным ангиоматозом, а также его возможном участии в патогенезе опухолевых процессов при ВИЧ-инфекции (Weber J. N. et al., 1988; Guarner J. et al., 1990; Nicholson L. et al., 1994).

ДНК вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) обнаружена у 27% взрослых пациентов в стадии ПВ ВИЧ-инфекции. Частота ее обнаружения в ША — Б стадии достигала 41,9% и достоверно возрастала до 88% в ШВ стадии ВИЧ-инфекции ($p < 0,001$). Аналогичные данные отмечены и в группе детей, инфицированных ВИЧ. В ША-Б стадиях частота обнаружения ДНК к ВГЧ-6 типа составила 42,8%, а в ШВ стадии — 86%. Клинически это соответствовало прогрессированию астено-вегетативного синдрома вплоть до появления синдрома «хронической усталости» на стадии ИВ, что отмечалось у 37,5% взрослых пациентов.

Полученные результаты подтверждают литературные данные о возможном этиологическом значении ВГЧ-6 в поражении головного мозга при ВИЧ-инфекции, формировании СПИД-деменции (Picard F. J. et al., 1993; Knox K. K. et al., 1994).

Таким образом, метод молекулярной гибридизации с использованием широкого спектра зондов (к ДНК ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6) позволяет дифференцировать герпесвирусные заболевания при ВИЧ-инфекции.

Нами была проанализирована частота комплексного выявления нуклеотидных последовательностей герпесвирусов по мере прогрессирования ВИЧ-инфекции (табл. 24).

Из приведенных данных видно, что на стадии ПВ ВИЧ-инфекции частота выявления ДНК ВПГ-1, ЦМВ и ВГЧ-6 достоверно выше, чем ДНК ВПГ-2 и ВЭБ.

Таким образом, анализируя частоту выявления нуклеотидных последовательностей герпесвирусов на разных стадиях

Таблица 24

**Частота комплексного выявления
нуклеотидных последовательностей герпесвирусов
на разных стадиях ВИЧ-инфекции ($P \pm t\%$)**

ДНК герпес- вирусов	Стадии ВИЧ-инфекции			
	НБ(и-18)	ПВ(п-30)	ША-Б (п-31)	ШВ(в-16)
ВПГ-1	27,3 $\pm$ 10,5	36,6 $\pm$ 8,7**	68,8 $\pm$ 8,5	88,5 $\pm$ 7,9
ВПГ-2	—	6,7 $\pm$ 4,5	41,5 $\pm$ 8,8	76,9 $\pm$ 10,5
ЦМВ	—	34,3 $\pm$ 8,6**	68,9 $\pm$ 8,3	92,3 $\pm$ 6,6
ВЭБ	—	6,7 $\pm$ 4,5	12,5 $\pm$ 5,9	65,4 $\pm$ 11,8
ВГЧ-в	—	26,6 $\pm$ 8,1*	42,8 $\pm$ 8,8	86,0 $\pm$ 8,6

Примечание: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; п — число больных

ВИЧ-инфекции, можно выявить наиболее значимый при прогрессировании заболевания комплекс вирусов.

Нами установлено, что у взрослых больных по мере прогрессирования ВИЧ-инфекции наблюдалось увеличение количества выявляемых ДНК герпесвирусов. Так, в стадии ПВ ВИЧ-инфекции нуклеотидные последовательности, определявшиеся методом МГ, отсутствуют у 13 (72,2%) инфицированных, и один маркер ГВ обнаруживается у 5 (27,8%). У всех 5 обследованных методом МГ выявлялся ВПГ-1. Нуклеотидные последовательности к ДНК ВПГ-2 ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 выявлены не были. На стадии ПВ ВИЧ-инфекции при определении ДНК герпесвирусов таковые отсутствовали у 1 (3,3%) инфицированного, один маркер ГВ обнаруживался у 24 (80%) пациентов и два маркера у 5 (16,7%) пациентов. При этом достоверно чаще на данной стадии выявляли ДНК ВПГ-1, ЦМВ и ВГЧ-6, чем ДНК ВПГ-2 и ВЭБ. Наряду с этим изменялись и показатели клеточного иммунитета: наблюдали достоверное снижение общего количества СБЗ лимфоцитов ($K — 1,58 \pm 0,07 \times 10^9$ л) до $1,31 \pm 0,09 \times 10^9$ л и абсолютного количества Т-хелперов ($Й — 0,87 \pm 0,08 \times 10^9$ л) до $0,59 \pm 0,09 \times 10^9$ л в стадии ПВ ($p < 0,01$). При этом коэффициент СБ4/СБ8 ДО — $1,21 \pm 0,07$) был также снижен и составил $0,8 \pm 0,07$ ($p < 0,001$).

В стадии ША-Б ВИЧ-инфекции среди маркеров ГВ, определявшихся методом МГ, один маркер ГВ обнаруживается у 3 (9,6%) пациентов, два маркера у 12 (38,7%), три маркера ГВИ у 14 (45,2%) и у 2 (6,5%) пациентов выявляли ДНК одновре-

менно к четырем герпесвирусам. Наиболее часто с равной частотой (68,8%) определяли ДНК ЦМВ и ДНК ВПГ-1, у 42 - 43% - ДНК ВГЧ-6 и ДНК ВПГ-2 и у 12,5% — ДНК ВЭБ.

На стадии ШВ ВИЧ-инфекции у 12,5% выявляли ДНК 3 герпесвирусов. Наиболее часто — у 10 (62,5%) из 16 пациентов определяли одномоментное присутствие в моноклеарах периферической крови нуклеотидные последовательности 4 герпесвирусов. В 25% случаев выявляли положительные результаты на наличие ДНК ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6. Данные пациенты находились в терминальной стадии ВИЧ-инфекции (СПИД). Анализируя частоту комплексного выявления ГВ, нами установлено, что в 86 - 92% случаев выявляли наиболее значимый в прогрессировании ВИЧ-инфекции комплекс герпесвирусов (ДНК ЦМВ, ДНК ВПГ-1, ДНК ВГЧ-6, ДНК ВПГ-2 — в 76,9% случаев и у 65,4% пациентов — ДНК ВЭБ.

Таким образом, нами установлено, что количество выявляемых маркеров ГВ, определяемых методом МГ, возрастает по мере прогрессирования основного заболевания.

Наряду с этим у взрослых ВИЧ-инфицированных пациентов в стадии ША-Б происходило дальнейшее снижение СБЗ-лимфоцитов до $0,98 \pm 0,03 \times 10^9$ л, а в стадии ШВ — до $0,56 \pm 0,08 \times 10^9$ л ($p < 0,001$). Т-хелперы также были снижены: в ША-Б — до $0,42 \pm 0,02 \times 10^9$ л, а в стадии ШВ были минимальными и составили $0,14 \pm 0,07 \times 10^9$ л ($p < 0,001$). Коэффициент СШ/СГО (И — $1,21 \pm 0,07$) у ВИЧ-инфицированных был достоверно снижен: в стадии ША-Б — $0,6 \pm 0,09$, ШВ — $0,45 \pm 0,08$ ($p < 0,001$).

Таким образом, проведенными комплексными клинико-лабораторными исследованиями, включая метод молекулярной гибридизации, установлено значение маркеров герпесвирусов в прогрессировании ВИЧ-инфекции. Увеличение числа герпесвирусов, выявляемых данным методом, коррелировало с характером и степенью иммунологических нарушений, уровнем Т-хелперов и манифестацией СПИДа. При этом прогностически наиболее значимым можно считать комплексное определение ДНК ВПГ-1, ЦМВ и ВГЧ-6 у больных с ВИЧ-инфекцией. Проведенные исследования показывают, что выявление комплекса герпесвирусов при ВИЧ-инфекции опережает клинико-иммунологические нарушения и позволяет прогнозировать клиническую манифестацию СПИДа. Полученные нами данные имеют значение как для прогноза, так и для совершенствования способов терапии ВИЧ-инфекции.

2.9. ДИАГНОСТИКА СОПУТСТВУЮЩИХ ГЕНИТАЛЬНОМУ ГЕРПЕСУ ИНФЕКЦИЙ

Лабораторная диагностика хламидиоза

Для идентификации хламидий в случае отсутствия серологических и культуральных методов исследуют препараты, окрашенные по Романовскому — Гимзе. У мужчин так диагностировать инфекцию удастся лишь у 10%. При обследовании женщин следует обратить особое внимание на высокую частоту поражений цервикального канала. Цитологическая окраска соскоба при этом позволяет идентифицировать включения до 40% случаев. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют метанолом в течение 10 минут. После этого просушивают. На сухой препарат наносится краска Романовского — Гимзы; элементарные тельца хламидий имеют розовый свет, а ретикулярные тельца — от голубого до синего. При этом ядра клеток имеют вишневый оттенок, а цитоплазма — нежно-голубая.

В целях совершенствования диагностики урогенитального хламидиоза были предложены иммуноферментные и иммунофлюоресцентные методы. Эти методы являются чувствительными и специфическими для постановки правильного диагноза. Обнадеживающие результаты получены при использовании ИФА и выявлении хламидий в соскобном материале с использованием моноклональных антител, меченных флюоресцеин-изотиоцианатом.

Метод прямой иммунофлюоресценции с реагентами фирмы «Орион» (США) технически прост, чувствителен, специфичен и быстровоспроизводим. Взятый соскобный материал помещают на предметное стекло, равномерно распределяя тонким слоем на площади не более 8 мм. Стекла затем высушивают на воздухе. Фиксацию материала осуществляют безводным уксусным методом нанесения его на препарат в количестве 0,5 мл или путем погружения препарата на 5 минут в метиловый или этиловый спирт. После фиксации препарат вновь высушивается на воздухе. Хранение препаратов возможно при комнатной температуре в течение 7 дней.

Окраска препарата моноклиональными антителами

1. Приготовление реагентов.

К лиофильно высушенным моноклональным антителам, меченным флюоресцеин-изотиоцианатом и содержащим краси-

таль Эванса голубой для окрашивания фона, добавляют раствор 0,1% азида натрия. В этом растворе реагент СЫатувел может сохраняться до 14 недель, если соблюдаются условия хранения (в темном месте при температуре 2 - 8°C).

2. Нанесение реагента на препарат.

30 мкл реагента с помощью микропипетки наносят на специальную лунку предметного стекла, в которой находится исследуемый материал. Перед нанесением реагента рекомендуется убедиться в наличии материала на стекле. С помощью наконечника пипетки или запаянной пастеровской пипетки равномерно распределяют реагент по всей поверхности лунки с материалом.

3. Инкубация препаратов.

Препараты с нанесенным на них реагентом инкубируют во влажной камере при комнатной температуре, периодически проверяя их состояние во избежание высыхания реагента на препарате, что может привести к ложноположительным результатам. Инкубация производится при горизонтальном положении предметных стекол в течение 15 минут.

4. Промывание стекол.

По истечении срока инкубации стекла тщательно промывают в дистиллированной воде в течение 10сек., остатки воды удаляют с краев стекла с помощью фильтровальной бумаги и высушивают на воздухе.

5. На препарат наносят 20 мкл забуференного глицерина (глицерин в 0,1 Трис-буфере, pH 8,5 1:1 или в 0,2 М К²НР04, pH 9,0 - 1:1 или 9:1).

6. Покрывают препарат обезжиренным покровным стеклом.

7. Просматривают препарат в люминесцентном микроскопе (макс, длина волны возбуждения — 490 нм, средняя длина волны излучения 520 нм). Увеличение в 400 - 500 раз, а при необходимости уточнения деталей объекта до 1000 раз — с использованием нефлюоресцирующего иммерсионного масла.

Препарат рекомендуется просматривать сразу же после приготовления. Смонтированные препараты можно сохранить при температуре 2 - 8°C не более 24 часов.

Высокая специфичность моноклональных антител позволяет диагностировать наличие элементарных телец хламидий, расположенных внеклеточно и представляющих собой ярко-зеленые образования с ровными краями округлой формы. Размеры

их составляют 1/100 от окружающих эпителиальных клеток. Можно наблюдать также и ретикулярные тельца, размеры которых в 2 - 3 раза больше элементарных. Внутриклеточные включения наблюдаются не более чем в 5% случаев. Любой флюоресцирующий материал неправильной формы или другого цвета, а также имеющий неярко-зеленую окраску, рассматриваются как артефакт. Диагностику можно проводить только в том случае, если при прокрашивании препарата видны окрашенные в красный цвет эпителиальные клетки.

Диагноз считается положительным, если в препарате удастся обнаружить не менее 10 не вызывающих сомнения телец хламидий. При наличии в препарате меньшего числа телец хламидий результат рассматривается как сомнительный и рекомендуется провести повторный анализ. Отрицательный диагноз считается при наличии красных эпителиальных клеток, в то время как хламидий не определяются. Для того чтобы отрицательный диагноз можно было считать достоверным, рекомендуется просматривать все поле препарата не менее 3 минут. Реагенты следует хранить при температуре 2 - 8°C и перед применением держать при комнатной температуре не менее 5 минут.

Изоляция возбудителя на культуре клеток

Лучшим методом диагностики хламидийных поражений урогенитального тракта является изоляция возбудителя на культуре клеток, обработанных различными антиметабоитами. Для этой цели используют культуру клеток McCoу, обработанных антиметаболитом — циклогексимидом, или культуру мышинных фибробластов L-929, обработанных DEAE-декстраном.

Установлен ряд факторов, влияющих на вероятность идентификации включения и выделения *C. trachomatis* на культуре клеток:

1. Состав группы. Процент выделения хламидий выше у женщин, чем у мужчин.
2. Прием антибиотиков. Во время подобных исследований необходимо исключить из обследуемого контингента тех лиц, которые принимали антимикробные средства (обычно за месяц до обследования), поскольку это может оказать отрицательное влияние на вероятность выделения хламидий.
3. Длительность уретритов. Обнаружено, что хламидий значительно чаще выделяются у мужчин с негонококковыми урет-

ритами, имеющих сопутствующие симптомы в течение семи дней и более.

4. Метод забора материала. Наибольшее число положительных результатов получают из соскобов, производимых при помощи эндоуретральных кюреток или ложки Фолькмана.
5. Время, проходящее между взятием образца и нанесением материала на клеточный монослой, должно быть минимальным. После хранения образцов (клинический материал) в транспортной среде при температуре 4°C в течение 24 часов вероятность выделения хламидий снижается. Хранение при -20°C и -7°C также дает снижение изоляции возбудителя, хотя и меньшее.
6. Чувствительность методики также зависит от применяемой линии культуры клеток, предварительной обработки линии антиметаболитами, скорости и температуры при центрифугировании.

Материалы:

- культура клеток McCoу;
- ростовая среда (среда Игла без глутамин — 400 мл, 3% глутамин — 5 мл, эмбриональная сыворотка теленка — 4% от общего объема, гентамицин — 40 мкг/мл;
- изолирующая среда (среда с антибиотиком для заражения клеток клиническим материалом): состав среды тот же, как и ростовой среды, но эмбриональная сыворотка теленка берется в количестве 8% от общего объема и глюкозы 10% — 5 мл;
- транспортная среда (для забора и хранения клинического материала): готовят фосфатный буфер с сахарозой: сахароза — 48,46 г; K_2HPO_4 (б/в) — 1,88 г.

Каждый компонент растворяется в 60 мл дистиллированной воды, растворы сливают вместе, полученный объем доводится с помощью HCl или NaOH до 7,0.

Буфер разливается по 48 мл в одинаковые объемы, автоклавируется при 115°C в течение 15 минут. Хранение при 4°C в течение 1-2 месяцев.

Перед использованием к 48 мл буферного раствора добавляется инактивированная нагреванием сыворотка крупного рогатого скота — 2 мл (4% от общего объема), стрептомицин — 50 мкг/мл, амфотерицин В — 25 мкг/мл среды.

В качестве транспортной среды можно использовать также ростовую среду, к 99 мл которой вносят следующие добавки: 1 мл

5% глюкозы, стрептомицин и амфотерицин В в концентрации 50 и 25 мкг/мл среды соответственно. После чего транспортная среда разливается по 2 мл стерильно в пенициллиновые флаконы и хранится при -20°C в течение месяца.

Поддержание клеток McCoу

В каждый матрас, предназначенный для пассирования, добавляется 4 - 5 мл среды роста, поверхность стекла смачивается средой, матрасы ставятся на 10 минут в термостат при 37°C для уменьшения щелочности стекла.

В это время подбирается клеточная культура для пассирования, сливается прежняя среда, добавляется 0,2% версен и трипсин в соотношении 2:1 и удаляется, как только визуально появятся «трещины» в клеточном монослое. Для прекращения действия версена и трипсина монослой промывается средой Игла, после чего наливается 5 мл ростовой среды для получения взвеси, которая разделяется в новые матрасы, стерильно добавляется среда роста, закрывается, ставится дата, номер пассирования и инкубируется в термостате при 37°C до получения нового монослоя.

Инокуляция клинического материала и окрашивание образца для микроскопии. Приготовление циклогексимидина (ЦГ): порошок хранится сухим при температуре 4°C . Перед использованием готовят раствор ЦГ на изолирующей среде в концентрации 2 мкг/мл (препарат токсичен).

Приготовление плоскодонных пробирок и покровных стекол для заражения клинического материала от больных: в стерильные плоскодонные пробирки с помещенными в них покровными стеклами добавить по 2 мл клеточной суспензии, предварительно подсчитав в камере Горяева (или гемоцитометре) количество клеток в 1 мл среды (примерно 1×10^6 /мл суспензии). Плоскодонные пробирки с клетками помещаются в термостат (37°C) на 16 - 24 часа.

Добавление клинического материала в плоскодонные пробирки с монослоем. Энергично механически или на магнитной мешалке встряхивают в течение 30 сек пенициллиновые флаконы с транспортной средой, содержащей клинический материал. После чего во флаконы добавляют по 2 мл свежеприготовленной изолирующей среды. В плоскодонных пробирках с монослоем перед внесением инфекционного материала производится замена ростовой среды. Распределяют изолирую-

шую среду из пенициллиновых флаконов с инфекционным материалом приблизительно по 2 мл в каждую плоскодонную пробирку с монослоем и центрифугируют их в течение часа при 3000 об/мин (2400g) в центрифуге с горизонтальным ротором. Инкубируют в термостате 2 часа. Затем отсасывают надосадочную жидкость и добавляют новую порцию изолирующей среды, содержащей ЦГ (2 мкг/мл) по 2 мл в каждую пробирку.

Фиксация и окраска по Романовскому — Гимзе монослоя клеток McCoу. Из пробирок удаляется среда, не нарушая монослоя, добавляется 1 - 2 мл метанола, фиксируется в течение 10 минут, пробирки осторожно встряхиваются для ресуспендирования белкового осадка. Промываются фосфатным буфером (рН 6,8). Краска по Романовскому-Гимзе готовится на фосфатном буфере рН 6,8 - 1 : 10 (1 часть краски и 9 частей фосфатного буфера). Приливается по 1 мл краски в каждую пробирку, через 30 - 60 минут удаляется, просветляется препарат 30% метанолом на фосфатном буфере. Высушенные покровные стекла монтируют при помощи канадского бальзама на предметное стекло (толщиной 0,8 - 1,0 мм). Препарат просматривают в темнопольном микроскопе на присутствие включений при увеличении в 400 - 600 раз. В темном поле включения хламидий дают желто-зеленую флюоресценцию. В сомнительных случаях рекомендуется исследовать в световом микроскопе под иммерсией с объективом х90, при этом элементарные тельца хламидий имеют розовый, а ретикулярные — синий цвет.

Лабораторная диагностика уреаплазм

Общепринятым для обнаружения уреаплазм является бактериологический метод исследования. Наиболее простым методом определения в клинических образцах является тест на уреазу (цветной тест) в жидкой среде с последующим культивированием на плотную среду и прямой тест — пятно на уреазу с индикатором — сульфатом марганца или посев на плотную среду, содержащую сульфат марганца. Индикация уреаплазм основывается на свойстве расщеплять мочевины. При росте уреаплазм в жидкой питательной среде микроорганизмы расщепляют мочевины на углекислый газ и аммиак, что приводит к изменению реакции среды от кислой к щелочной и наблюдается изменение цвета индикатора (бромтимолового си-

вето) от лимонно-желтой окраски до зеленой и при высоких титрах до синего цвета.

Приготовление жидкой питательной среды

В 0,5 л термоустойчивую колбу берется по 18 мл гидролизата бычьего сердца и гидролизата казеина (рН доводится до 5,5 добавлением 10% NaOH), добавляется свежедистиллированная вода до 300 мл и кипятится 10 минут. К концу кипячения добавляется 4,0 г пептона без кристаллов виолета и 0,4% бромтимолового синего — 5,7 мл. После растворения пептона добавляется свежедистиллированная вода до 500 мл, раствор доводится до кипения и фильтруется через колбу, добавляется K_2P0_4 — 0,064 г и 2 г сухих пекарских дрожжей, рН доводится до 6,0 + 0,5, далее основа стерилизуется в автоклаве при 121°C 15 минут. После стерилизации основа охлаждается при комнатной температуре до 37 - 38°C и производится ее обогащение следующими стерильными добавками: лошадиная сыворотка ненагретая, лучше без консерванта — 40 мл (10%); мочевины 10% — 2 мл (0,05%); L-цистеин гидрохлорид 2% — 2 мл (0,01%); пенициллин 1.000.000 ЕД. Приготовленную среду перемешивают, устанавливают рН 6,0 и разливают по 1,8 мл в стерильные микробиологические пробирки с ватно-марлевыми пробками, цвет среды — лимонно-желтый. Среду хранят при -20°C и перед использованием отстаивают. В случае отсутствия низкотемпературных холодильников среду можно хранить при +4°C. Среда пригодна для использования в течение месяца и более. Для подавления роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* при взятии материала у женщин в среду добавляют амфотерицин В — 10 ЕД/мл или водорастворимый амфоглюкамин — 10 ЕД/мл. Чистую культуру уреаплазм получают, добавляя в среду водорастворимый динкомицин гидрохлорид, что приводит к появлению роста классических микоплазм (*M. hominis*). При совместном росте *M. hominis* и *U. urealyticum* (среда без динкомицина) часто наблюдается синяя окраска среды, в то время как присутствие в клинических образцах только *M. hominis* не дает характерного изменения цвета среды. Рост *U. urealyticum* наблюдается через 16 - 24 часа (в редких случаях через 38 - 48 часов) *M. hominis* — через 48 - 72 часа. Цвет изменяется во всей пробирке без каких-либо помутнений. Осадок в среде появляется при неправильной технологии приготовления среды, при избытке клинического материала, в особенности из вагины, и при ро-

сте пенициллинрезистентных уреазопродуцирующих бактерий. Может иметь место совместный рост микроорганизмов, что легко проверяется субкультивацией культуры из жидкой на плотную среду. Пересев должен проводиться в начальной стадии роста уреоплазм (начало изменения цвета в бульоне, что является оптимальным для сохранения жизнеспособности этих микроорганизмов. При щелочной реакции среды с мочевиной культуры уреоплазм быстро погибают. Жизнеспособность культур уреоплазм при 37°C сохраняется в течение 48 - 72 часов (некоторые штаммы выживают в течение 7 дней), а при низких температурах выращивание в жидкой среде уреоплазм производят в аэробных условиях. Уреоплазмы весьма чувствительны к ацетату таллия, применяемого в соответствии со стандартными методиками выделения классических микоплазм.

Приготовление основы для плотной питательной среды

Техника приготовления основы для плотной питательной среды такая же, как и для жидкой. В 0,3 л термоустойчивую колбу помещают 12 мл гидролизата бычьего сердца и гидролизата казеина (рН доводится до 5,5 добавлением 10% ИаОН), 3,6 г агар-агара и добавляется свежедистиллированная вода до 200 мл. Агар-агар растворяют при комнатной температуре и к концу кипения добавляется 2,62 г пептона без кристалл виолета и после растворения пептона добавляется свежедистиллированная вода до 300 мл. Раствор доводится до кипения и фильтруется через колбу, добавляется K_2HPO_4 — 0,36 г, 0,043 г сульфата марганца и 1 г сухих пекарских дрожжей, рН доводится до $6,0 \pm 0,5$, далее основа стерилизуется в автоклаве при 121°C 15 минут. После стерилизации основа охлаждается при комнатной температуре до 37 - 38° С и производится ее обогащение следующими стерильными добавками: лошадиная сыворотка ненагретая, лучше без консерванта — 40 мл (20%); мочевины 10% — 2 мл (0,05%); Ы-цистеин гидрохлорид 2% — 1 мл (0,01%); пенициллин 500.000 ЕД. Приготовленную среду перемешивают, устанавливают рН 6,0 и разливают в стерильные чашки Петри одноразового пользования (6x50) по 1,5 - 2,0 мл. Чашки после затвердения агара оставляют на рабочем месте в боксе в перевернутом положении на ночь. Для предупреждения потерь влаги чашки хранят завернутыми в целлофановые пакеты при 4°C (в перевернутом положении). При сокультивировании уреоплазм на плотной среде рост колоний наблюдается через 48 - 72 часа и на 5-е

сутки. Чашки помещают в увлажненном герметически закрытом эксикаторе с зажженной свечой, что позволяет получить повышенное содержание CO_2 , и инкубируют при $37^\circ C$.

Техника субкультивирования: после изменения цвета жидкой среды (начало роста культур) на поверхность плотной среды стерильной пастеровской пипеткой наносят 1 каплю со дна пробирки, чашку с посеянным материалом инкубируют, как было описано выше. Предварительно плотная среда подсушивается в термостате не более 20 минут. Если плотная среда содержит индикатор Кларка без буфера, то рост колоний характеризуется изменением цвета среды. Если среда содержит индикатор сульфат магния, то колонии уреаплазм окрашиваются в коричневый или золотисто-желтый цвет. Чашки просматривают в световом микроскопе при малом увеличении соответственно 50х при 200х при прямом прохождении света. Можно также нарезать хирургическим скальпелем агаровые блоки на кусочки размером 1 см, перенести эти блоки на предметное стекло. Поверхность агара с колониями устанавливают сверху, добавляют каплю краски Деинесса или без окраски, на поверхность кусочков агара накладывают покровное стекло, фиксируют края парафином и просматривают препарат при увеличении 400х.

Колонии уреаплазм размером 20 - 50 мкм наблюдаются при росте только центральной зоны, видны углубления в центре, края колонии зубчатые, поверхность сморщенная, они погружаются целиком в агар и покрыты тонким слоем агара. При росте периферической зоны в виде тонкого слоя размер колонии увеличивается до 100 мкм и более. Колонии М. полите отличаются морфологически и остаются бесцветными.

При непосредственном внесении патологического материала асептически на плотную среду колонии уреаплазм после инкубации отличаются в большинстве случаев от описанных выше. В этом случае «мочевые нити», содержащие колонии уреаплазм в результате окраски двуокисью марганца, имеют темно-коричневый, а иногда черный цвет: такая же окраска у эпителиальных клеток. Если на эпителиальных клетках имеются несколько колоний уреаплазм, то колонии выглядят в виде округлых образований, расположенных неправильными кольцевидными фигурами с ярким окрашенным центром без периферических зон. Рост колоний в этом случае происходит лучше при 20% содержании CO_2 . Выращивание происходит в термо-

стате при 36°C. Среда для выделения уреоплазм может быть приготовлена из ингредиентов отечественного производства практически в любом учреждении медицинского профиля.

Лабораторная диагностика гарднереллеза

Диагноз гарднереллеза ставится на основании комплексно-основных и вспомогательных критериев. К основным диагностическим критериям относится наличие «ключевых» клеток — клеток влагалищного эпителия, сплошь покрытых небольшими грамвариабельными коккобактериями — этот критерий является патогномоничным признаком гарднереллеза. «Ключевые» клетки могут быть выявлены при исследовании нативного материала, при окраске по Грамму. Другим основным критерием служит наличие аномальных аминов в вагинальном секрете, которые находятся при гарднереллезе в виде солей. Добавление щелочи (10% КОН) переводит их в свободные основания, которые летучи и обуславливают неприятный рыбий запах, так называемая проба с КОН. Для постановки диагноза необходимо наличие 2-х критериев с обязательными выявлениями «ключевых» клеток.

Дополнительными критериями при постановке диагноза являются: рН выделений от 5,0 до 6,5 при значительном уменьшении или полном отсутствии молочно-кислых бактерий, при отсутствии лейкоцитоза, грамвариабельности коккобацилярной микрофлоры.

Глава 3. CD АНТИГЕНЫ

«Кластеры Дифференцировки», или CD (от англ. Clusters of Differentiation) представляет собой группы моноклональных антител, которые выявляют одноименные молекулы на поверхности клетки: при этом, каждая молекула мембраны обозначается как CD с соответствующим номером; наличие при некоторых CD буквы 'w' (workshop = рабочая группа) указывает на неполностью охарактеризованный антиген.

Возможность выделения «Кластеров Дифференцировки» стала реальной только после начала полномасштабного применения в исследованиях моноклональных антител (мАт), применяемых в методике проточной цитометрии. Поскольку основной задачей в описании экспрессии антигенов было и остается выявление позитивных клеток разного происхождения, то стали считать, что если применяемые мАт дают одинаковые картины мечения, это означает, что они метят один и тот же антиген. Начало таким исследованиям было положено в середине 1980-х годов; при этом рабочим органом для официальной идентификации новых CD антигенов традиционно является очередное рабочее совещание. Правомочно считается, что этот систематический подход имел безусловное преимущество, поскольку позволил ввести общую CD номенклатуру не только для антигенов человека, но и для гомологичных антигенов других видов животных. Хочется отметить, что первым и самым важным следствием CD номенклатуры стало возможным обнаружение уникальных антигенов, а также последующее их изучение с клонированием и более глубоким изучением условий их экспрессии, функциональных вариантов и т.д. Помимо чисто фундаментального применения CD номенклатуры также стала значимой и возможность направленного воздействия на реализацию отдельных функций изучаемых

клеток через взаимодействие мАт к конкретному CD антигену. Так, если CD4 служит (в основном) маркером для Т-хелперов, то стало возможным показать помимо этого и значение этого маркера, например, по отмене смешанной лимфоцитарной реакции и блокаде ряда аутоиммунных заболеваний *in vivo* при использовании аНТН-CD4 мАт. А вот другое анти-СШ мАт может активировать Т-клетки. Таким образом, знание экспрессии CD антигенов при разных состояниях конкретных клеточных типов позволяет понять картину активирующих и подавляющих воздействий и пытаться в последствии модулировать нужные состояния *in vivo*. CD антигены ниже в виде табл. 25.

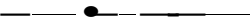
Примечания к таблице 25. Кодовое выделение: CD2 — молекулы адгезии; CD3 — антигены, важные в реализации специфических функций Т и В клеток; *CD11a* — интегриновые компоненты и их лиганды; CD16 — представители Fc-рецепторов; *CD2S* — рецепторы цитокинов; CD35 — компоненты системы комплемента. МНС — главный комплекс гистосовместимости; TCR — Т-клеточный рецептор; ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; Тх — Т-хелпер; в/к — внутриклеточный; ИФН — интерферон; ВЭБ — вирус Эпштейна — Барр; ФРН — фактор роста нервов; PSG-1 — гликопротеид 1 специфичный для беременности; С* — комплемент; ФНО — фактор некроза опухоли; ЭРФ — эпидермальный ростовой фактор; АЛПС — аутоиммунный лимфопролиферативный синдром человека (у мыши аналогом является фенотип *lpr*, а *gld* — следствие мутаций в *FasL*; пиеболдизм — аутосомно-доминантное расстройство пигментации (участки депигментации на голове, груди, локтях и коленях при наличии типичного белого локона); Г-КСФ — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ФТР — фактор трансформации роста; СКЛ — смешанная культура лимфоцитов; М-КСОР — рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора; МДС — миелодиспластический синдром; ГМ-КСФ — рецептор гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора; ОСМ — онкостатин М; ФТЛ — фактор торможения лейкемии; КФ1 — кардиотрофин-1; Х-ТКИД — тяжелый комбинированный иммунодефицит, сцепленный с Х-хромосомой; ТФРИ — рецептор тромбоцитарного фактора роста; тм — трансмембранный, зр — зрелый, ск — секреторный; и.ф. — изоформа; ADAM — A Disintegrin And Metalloprotease, дизинтегрин и металлопротеаза; HUVES — культура эндотелиоцитов пупочной вены человека; ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты; РМ — рецептор-мусорщик; Гипер-IgM синдром — иммунодефицит, сцепленный с Х-хромосомой (сопровождается гипер-В^hМ-емией и отсутствием переключения синтеза Ig); НК — помимо известных представителей с ITAM & ГИМ-молекул (суперсемейство иммуноглобулинов) также есть рецепторы НК клеток, образуемые при контакте CD94 и NKG2 (семейство лектинов С-типа), который узнает большой спектр HLA-A, B, С аллелей.

Таблица 25

Основные характеристики СО-антигенов

СО антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (Ы>а)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
СТ ^{>} 1а, Ь, с, (1	Кортикальные тимоциты, клетки Лангерганса, дендритические клетки, В-клетки (СЯ51с), эпителий кишечника (С01<1)	4 3 - 4 9		МНС-1-подобная молекула, ассоциированная с Р ^а -микро-глобулином. Возможно участие в презентации непептидных антигенов	Т6	Суперсемейство иммуноглобулинов аевг)
С02	Т-клетки, тимоциты, натуральные киллеры	4 5 - 5 8		Молекула адгезии, взаимодействует с С058 (ЬРА-3). Может активировать Т-клетки	Т11, 1ЯА-2	Суперсемейство иммуноглобулинов
СТ>2Ь	Активированные Т-клетки	4 5 - 5 8		Конформационный вариант СТ2 при ее активации	Т11-3	Суперсемейство иммуноглобулинов
с03	Тимоциты, Т-клетки	7 : 2 5 - 2 8 8: 2 0 Е: 2 0 0 1 6 Ц-..22		Ассоциирован с ТСК. Необходим для экспрессии ТСК и передачи от него сигналов	Т3	Суперсемейство иммуноглобулинов (уОЕ), ^/Г) родственны РсКу цепи
ст	Подтипы тимоцитов, Т-хелперов и Т-клеток воспаления (Тх2 и Тх1; около 7 ³ периферических Т клеток), моноциты, макрофаги	55		Корецептор для МНС-П молекулы. Присоединяет р56 ^л со стороны цитоплазмы. Рецептор для gr120 вирусов ВИЧ-1 и ВИЧ-2	Т4, 13Т4 (мышь) \\У3/25 (крыса)	Суперсемейство иммуноглобулинов
СТ>5	Тимоциты, Т-клетки, подтип В-клеток	67		Неизвестна, может взаимодействовать с Сй72	Т1, Ьу1, Ьеи-1	Рецептор-мусорщик
СЛ6	Тимоциты, Т-клетки, В-клеточная хроническая лимфатическая лейкемия, мозг	1 0 0 - 1 3 0		На эпителии тимуса связывается с лигандом АЬСАМ	Т12	Рецептор-мусорщик
С07	Плюрипотентные гемопоэтические клетки, тимоциты, Т-клетки, ранний маркер Т-коммиттированных предшественников	40		Неизвестна. Маркер для Т-клеточной острой лимфатической лейкемии и лейкоемий плюрипотентных стволовых клеток	gr40	Суперсемейство иммуноглобулинов
СП8	Подтипы тимоцитов, цитотоксические Т-клетки (около 1/3 периферических Т-клеток), отдельные НК клетки (Сйва), а у крысы — на всех НК клетках	а: 3 2 - 3 4 В: 3 2 - 3 4		Корецептор для МНС-1 молекул. Присоединяет р56 ^м со стороны цитоплазмы; показана растворимая форма СБ8а	Т8, Ьу12/3 (мышь)	Суперсемейство иммуноглобулинов
ст	Эозинофилы, базофилы, тромбоциты, рге-В-клетки	2 2 - 2 7		Возможно участие в агрегации и активации тромбоцитов; маркер 90% не-Т острых лимфобластных лейкозных и 50% острых миелоидных и хронических лимфоидных лейкоемий		Суперсемейство «змеевик», также называемое Суперсемейство белков, пронизывающих мембрану 4 раза

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
с т о	Предшественники Т- и В-клеток, стромальные клетки костного мозга, высокая плотность на эпителии щеточной каемки почек и кишечника	100		Zn-металлопротеиназа, маркер острой рге-В лимфатической лейкемии	CALLA (нейтральная эи-допептидаза, общий антиген острой лимфоцитарной лейкемии), эвкефалиназа, gp100	
CD 11a	Лимфоциты, гранулоциты, моноциты и макрофаги	180		О ^а -субъединица интегрин LFA-1 (связана с СШ8); взаимодействует с CD54 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3	LFA-1	
CD 11b	Миелоидные клетки и натуральные киллеры	170		а ^м -субъединица интегрин CR3 (связана с CD18); взаимодействует с CD54, iC3b компонентом комплемента и белками внеклеточного матрикса	Mac-1	
CD 11c	Миелоидные клетки	150		а ^х -субъединица интегрин CR4 (связана с CD18); взаимодействует с фибриногеном	gp150, 95	
CD w12	Моноциты, гранулоциты, тромбоциты	90 - 120		Неизвестна		
CD13	Миеломоноцитарные клетки, эпителий тонкого кишечника и проксимальных канальцев почки, синаптические мембраны ЦНС, фибробласты и остеокласты	150 - 170		Zn-металлопротеиназа, участие в метаболизме регуляторных пептидов	Аминопептидаза N, gp150	
CD14	Миеломоноцитарные клетки, В-клетки	53 - 55		Рецептор для комплекса из липополисахарида и ЛПС-связывающего белка (LBP)		
CD15	Нейтрофилы, гранулоциты, тромбоциты, эмбриональные ткани, аденокарциномы, миелоидные лейкемии и клетки Рид - Штернберга			Разветвленные пентасакхариды на гликолипидах и многих гликопротеинах клеточной мембраны; сиалированная форма CD15S служит лигандом для CD62E (ELAM)	Lewis x (Le ^x), лакто-N-фукопентаоза ГП (LNF1U), 3-фукоил-N-лактозамин (3-FAL)	
CD16	Нейтрофилы, натуральные киллеры, макрофаги	50 - 80		; Компонент низкоаффинного Fc, FcyRI, опосредует фагоцитоз и антителозависимую клеточную цитотоксичность	FcyRI	 Суперсемейство иммуноглобулинов

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD w17	Нейтрофилы, моноциты, тромбоциты			Лактозилцерамид (гликосфинголипид мембраны)	БасСег	
CD18	Лейкоциты	95		В,-субъединица интегрина, связывается с СЭПа, Ыи с; генетический дефект лежит в основе синдрома недостаточности адгезии		
CD19	Фолликулярные дендрциты, предшественники В-клеток (до СОЮ и в/к Нц-цепи), В-клетки	95		Образует комплекс с СГ>21 (СК2), СШ1 и Ёи13; корецептор для В-клеток	В4	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD20	В клетки (нет в плазматитах)	33 - 37		Возможно участие в регуляции активации В-клеток	В1, Вр35	Сходство с КсШ Р-цепью
CD21	Зрелые В клетки, фолликулярные дендрциты, эпителий глотки в цервикального канала	145		Рецептор для С361, вируса Эпштейна — Барр. Вместе с СШ9, Ёи13 и СШ1 образует корецептор для В-клеток; может быть важным рецептором для ИФНа в В-клетках	СК2, ВЭВ-рецептор, С3&-рецептор	Суперсемейство белков, контролирующих комплемент (ССР)
CD22	Зрелые В-клетки (60-80%), волосатоклеточная лейкемия	а: 130 Р:140		Адгезия В клеток в моноцитах, Т клетках; СШ5ИО и СБ75-лиганды	ВЬ-САМ	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD23	Зрелые В-клетки, активированные макрофаги, эозинофилы, фолликулярные дендрциты, тромбоциты	45		Низкоаффинный рецептор для ^Е, лиганд для корецепторного комплекса 1ви13:Ст9:СБ2:СБ81; растворимая форма служит митогеом для Т- и В-клеток, усиливает синтез ИФНуиФНОа	РСЕКН, ВЬАБТ-2	Лектив С-типа
CD24	В-клетки, гранулоциты, В-клеточная лейкемия	35 - 45		Неизвестна	Возможно, является человеческим гомологом мышинного теплостабильного антигена (НВА) или Лй	
CD25	Активированные Т-, В-клетки, моноциты	55		а-цепь рецептора ИЛ2, ассоциирует с СБ122 и ИЛ2Ку цепью	Тас	
CD26	Активированные Т- и В-клетки, макрофаги, эпителий щеточной каемки почки и кишечника, желчные протоки печени	110		Протеаза. Недавно выдвинуто предположение об участии в проникновении вируса ВИЧ в клетку	Дипептидилпептидаза ГУ	

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции		Принадлежность к семействам
CD27	Активированные В-клетки я плазматиче-ские, медуллярные тимокиты, Т-клетки	50 - 55 гомоди-мер		Связывается с ФНО-подобным лигандом, CD70		Суперсемейство ФН-рецепторов
CD28	Т-клетки (95% CD4 ⁺ и 50% CD8 ⁺), активированные В-клетки	44		Активация наивных Т-клеток, рецептор для сигнала костимуляции (сигнал 2) связывается с CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2)	Тр44	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD29	Лейкоциты	130		р\-субъединица интегринов, взаимодействует с CD49a в составе интегрина VLA-1		
CD30	Активированные Т- и В-клетки, лимфомы, клетки Ходжкина и Рид — Штернберга	105 - 120		Связывается с ФНО-подобным белком мембраны CD30-L; существует растворимая форма	Ki-1, Вег-Н2 антиген	Суперсемейство ФН-рецепторов
CD31	Моноциты, тромбоциты, гранулоциты, В-клетки, эндотелиоциты	130 - 140		Возможно, является молекулой адгезии	PECAM-1 (тромбоцитарная молекула-1 адгезии на эндотелии)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD32	Моноциты (А-С формы), нейтрофилы (А и С), В клетки (В), эозинофилы, трофобласты плаценты, эндотелиоциты	40		Низкоаффинный Fc рецептор для иммунных комплексов и агрегированных Ig	FcγRII	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD33	Миелоидные клетки-предшественники, моноциты	67		Неизвестна; маркер миелоидной лейкемии		Суперсемейство иммуноглобулинов
CD34	Гемопоэтические предшественники, эндотелий капилляров	105 - 120		Лиганд для CD62L (L-селектин)		
CD35	Эритроциты, В-клетки, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, фолликулярные дендроциты, подоциты почки	250		Рецептор 1 компонента, связывается с C3b и C4b, опосредует фагоцитоз, подавляет активацию C*	CR1, C3b/C4b рецептор	Суперсемейство белков, контролирующих комплемент
CD36	Тромбоциты, моноциты, эндотелий пупочной вены	88		Возможно, связывает пораженные PL falciparum эритроциты	Тромбоцитарный гликопротеин IV, ОКМ5 антиген	
CD37	Зрелые Т- и В-клетки, миелоидные клетки	40 - 52		Неизвестна	gp52 - 40	Суперсемейство «змеинок»
CD38	Ранние Т- и В-клетки, активированные Т клетки, В клетки зародышевого центра, моноциты	45		Неизвестна	T10	
CD39	Активированные В-клетки, активированные НК клетки, макрофаги, дендритные клетки	78		Неизвестна, возможно, опосредует адгезию В клеток	gp80	

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD40	В-клетки, моноциты, дендритные клетки	50		Рецептор для сигнала ко-стимуляции для В-клеток, связывается с Сй40 лигандом (СМО-Ь)	gp50	Суперсемейство ФРН-рецепторов
CD41	Тромбоциты, мегакариоциты	125/122 димер		(Х [^] -интегрин, взаимодействует с С I Ш с образованием в Р Ш), связывается с фибронектином, фибриногеном, фактором Виллебранда, тромбоспондином	GPIIbBGPnia комплекса, a^b -интегрин	
CD42 a, b, c, d	Тромбоциты, мегакариоциты	a: 23 b: 135, 23 c: 22 d: 85		Связывается с фактором Виллебранда, тромбином; важен для адгезии тромбоцитов в местах повреждения	a: GPIX b: GPIba c: GPIbp d: GPV	
CD43	Лейкоциты, кроме покоящихся В-клеток, тромбоциты, стволовые клетки костного мозга	115 - 135 (нейтрофилы) 95 - 115 (Т клетки)		Муциноподобный гликопротеин, взаимодействует с C054 , усиливает антигензависимую активацию Т-клеток; изменение экспрессии при синдроме Вискотта-Олдрича; растворимая форма сыворотки — галактогликопротеин	Лейкосиалин, сиалофориин	
CD44	Лейкоциты, эритроциты, эпителиоциты, белое вещество ЦНС, фибробласты	80 - 95		Связывается с гиалуроновой кислотой, опосредует адгезию лейкоцитов (но не на эпителии)	Pgp-I (фагоцитарный гликопротеин-1), антиген Hermes, ЕСМШП (рецептор типа III внеклеточного матрикса), Hutch-1, In(Lu)-родственный p80, p85, Ly-24 (мышь)	Link(?)
CD45	Все клетки гемопоэтического происхождения, кроме эритроцитов	180 - 240		Фосфотирозинфосфатаза, усиливает передачу сигнала через рецепторы антигенов Т- и В-клеток; множественные изоформы образуются при альтернативном сплайсинге (см. ниже)	LCA (общий лейкоцитарный антиген), T200, B220, Ly-5	
CD45RO	Подтипы Т- и В-клеток, моноциты, макрофаги	180		Изоформа Сй45, не содержащая экзонов А, В, С		

Продолжение табл. 25

CD		Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD45RA	В-клетки, наивные Т-клетки, моноциты	205 - 220		Изоформы СШ5, содержащие экзон А		
CD45RB	Подтипы Т-клеток, В-клетки, моноциты, макрофаги, гранулоциты	190 - 220		Изоформы СБ45, содержащие экзон В	T220	
CD46	Гемопоэтические и другие карициты	56/66 (варианты сплайсинга)		Кофакторный белок мембраны, связывается с СЗб и С4б, что приводит к их деградации через фактор I	МСП, HuLy-m5, TLX (общий антиген для трофобласта и лейкоцитов)	Суперсемейство белков, контролирующих комплемент
CD47	Все клетки	47 - 52		Интегрин-ассоциированный гликопротеин, сцеплен с группой крови Ш1		Суперсемейство иммуноглобулинов
CD48	Лейкоциты, эпителий бронхов и слюнных желез	40 - 47		Неизвестна	Blast-1, HuLy-m3, BCM1 антиген, MRCOX-45	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD49a	Активированные Т-клетки, моноциты	210		α '-интегрин, взаимодействует с C029, связывается с ламинином, коллагеном	VLA-1 (антиген-1 очень поздней активации)	
CD49b	В-клетки, моноциты, тромбоциты	165		α^r -интегрин, взаимодействует с CЛ>29, связывается с ламинином, коллагеном	VLA-2	
CD49c	В-клетки	125		α^3 -интегрин, взаимодействует с C029, связывается с ламинином, фибронектином	VLA-3	
CD49d	В-клетки, тимоциты	150		α '-интегрин, взаимодействует с СР29, связывается с фибронектином, веннами с высоким эндотелием (НЕР) в Пейеровых бляшках, УСАН-1	VLA-4	
CD49e	Т-клетки памяти, моноциты, тромбоциты	135,25 димер		α '-интегрин, взаимодействует с C029, связывается с фибронектином	VLA-5	
CD49f	Т-клетки памяти, тимоциты, моноциты	120,25 димер		α '-интегрин, взаимодействует с C029, связывается с ламинином	VLA-6	
CD50	Тимоциты, Т- и В-клетки, моноциты, гранулоциты	130		Связывается с интегринами СЛ11а/СШ8	ICAM-3	Суперсемейство иммуноглобулинов

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD51	Тромбоциты, мегакариоциты	125,24 димер		α^y -интегрин, взаимодействует с CD61, связывается с витронектином, фактором Виллебранда, фибриногеном и тромбоспондином	Рецептор витронектина	
CD52	Тимоциты, Т-клетки, В-клетки (кроме плазматиков), моноциты, гранулоциты (15%), эозинофилы (30%)	21 - 28		Неизвестна, мишень для антител, применяемых в терапии для удаления Т-клеток из костного мозга	CAMPATH-1	
CD53	Лейкоциты, остеобласты и остеокласты	35 - 42		Неизвестна	МИС ОХ44 (крыса)	Суперсемейство «змеевик»
CD54	Гемопозитические и другие клетки	85 - 110		Внутриклеточная молекула адгезии-1 (ICAM-1), связывается с интегрином CD11a/CD18 (LFA-1) и интегрином CD11b/CD18 (Mac-1), рецептор для риновируса	ICAM-1	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD55	Гемопозитические и другие клетки	60 - 70		Фактор ускорения распада (DAF), связывается с C3b, вызывает диссоциацию C3/C5 конвертазы	БАР	Суперсемейство белков, контролирующих комплемент
CD56	Пан-НК клеточный маркер, ряд опухолей и нейрональных тканей	175 - 185		Изоформа нейтральной молекулы клеточной адгезии (NCAM), участие в МНС независимой цитотоксичности, молекула адгезии	ІЛШ-1, Іли-19, Ы-САМ изоформа	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD57	НК клетки, 25% Т- и В-клеток, моноциты (< 20%), ряд нейрональных тканей			Олигосахарид, обнаружен на многих поверхностных гликопротеинах	ЮЛС-І (іли-7) антиген	
CD58	Гемопозитические и другие клетки	55 - 70		Связывается с CD2, молекула адгезии; участие в образовании Е-розеток	и?А-3 (антиген-3, ассоциированный с функцией лейкоцитов)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD59	Гемопозитические клетки, эндотелий сосудов, эпителиоциты, плацента	19		Связывается с C8 и C9 компонентами комплемента, блокирует сборку мембраноатакующего комплекса	Протектин, Мас-ингибитор, млн* ншж Р-18, Н19, МАС№	Суперсемейство Lu-6
CD60	Т-клетки (25-45%), тромбоциты, моноциты			Олигосахарид на поверхности ганглиозидов	ЦМ404	

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функция	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD61	Тромбоциты, мегакариocyты, макрофаги	105		В ³ -субъединица интегрина, взаимодействует с CD41 (GPIIb/IIIa) или CD51 (рецептор витронектина)	ОРШавСРНЬ-Ша комплексе, В-субъединица рецептора витронектина	
CD 62E	Эндотелий	140		Молекула адгезии лейкоцитов к эндотелию (ELAM), связывается с сиалил-Lewis x, опосредует перекачивание нейтрофилов по эндотелию	ЕБАМ-1, Е-селектин	Лектин С-типа, суперсемейство белков ЭРФ и ССР
CD 62L	Т- и В-клетки, моноциты, НК клетки	150		Молекула адгезии лейкоцитов (LAM), связывается с CD34, GlyCAM, опосредует перекачивание по эндотелию	иш-1, Б-селектин, ЦЕСАМ-1	Лектин С-типа, суперсемейство белков ЭРФ и ССР
CD 62P	Тромбоциты, мегакариocyты, эндотелий	140		Молекула адгезии, связывается с сиалил-Lewis x, опосредует при-соединение тромбоцитов к нейтрофилам, моноцитам, а также перекачивание нейтрофилов по эндотелию	Р-селектин, РАШЕМ	Лектин С-типа, суперсемейство белков ЭРФ и ССР
CD63	Активированные тромбоциты, моноциты, макрофаги, слабо на гранулоцитах и лимфоцитах; идентичен меланомаассоциированному антигену ME491	53		Неизвестна, является мембранным белком лизосом, который транслируется на плазмалемму после активации	Антиген активациотромбоцитов, M1A1, РТШ Р40	Суперсемейство «змеевик»
CD64	Моноциты, макрофаги	72		Высокоаффинный рецептор для IgG	РсуШ	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD65	Много на гранулоцитах			Олигосахаридный компонент церамид-додекасахарида 4с; взаимодействие с гликолипидами 2 тина с Fuc в положении п-1, а также с подобными длинноцелочечными ганглиозидами	У1М-2; СВквБ	
CD 65s	Много на гранулоцитах			Сиалированная форма CD65		
CD 66a	Нейтрофилы, часть миелоидных предшественников костного мозга, эпителий щеточной каемки толстого кишечника	160-180		Неизвестна, представитель семейства карцино-эмбриональных антигенов (CEA)	Билиарный гликопротеин-1 (ВвР-!)	Суперсемейство иммуноглобулинов

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD 66b	Гранулоциты	95 - 100		Неизвестна, представитель семейства карциноэмбриональных антиген оп (СБА)	Раньше как С067 (продукт гена Ш М 6)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 66c	Нейтрофилы, карцинома подвздошной кишки	90		Неизвестна, представитель семейства карциноэмбриональных антигенов (СБА)	Неспецифический перекрестно-реагирующий антиген (ИСА)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 66d	Нейтрофилы	30		Неизвестна, представитель семейства карциноэмбриональных антигенов (СБА)		Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 66e	Эпителий подвздошной кишки взрослого, карцинома подвздошной кишки	180 - 200		Неизвестна, представитель семейства карциноэмбриональных антигенов (СЕА)	Карциноэмбриональный антиген (СЕА)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 66f	Много насинцитиотрофобласте			Неизвестна, представитель семейства карциноэмбриональных антигенов (СБА); сек ретируется	РвСМ	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD68	Моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, большие лимфоциты	110		Неизвестна	Макросиалин (мышь)	
CD69	Активированные Т- и В-клетки, активированные макрофаги, НК клетки, тромбоциты	28,32 гомодимер		Неизвестна, антиген ранней активации	Индукторная молекула активации (A1M), <u>EAL.MLR.-3</u> , Беи-23	Лектин С-типа
CD70	Активированные Т- и В-клетки, макрофаги	75,95,170		Лиганд для CD27	K1-24	ФНО-подобная
CD72	Активированные лейкоциты, большинство делящихся кариоцитов, эндотелий головного мозга	90 - 95 гомодимер		Рецептор трансферрина (присоединяет 2 молекулы трансферрина), участие в пролиферации	T9	Показано наличие 43,6% идентичности со стрептококковой С5а пептидазой
CD72	В-клетки	42 гомодимер		Неизвестна; возможно, является лигандом для CD5	БуВ-2 (мышь)	Лектин С-типа
CD73	Т-клетки (10% CD4, 50% CD8), слабо на тимоцитах, В-клеток (70%), ряд эндотелиоцитов и эпителиев	69		Экто-б'-нуклеотидаза, дефосфорелирует нуклеотиды, после чего происходит поглощение нуклеозидов		
CD74	В клетки, макрофаги, моноциты, МНС-П-позитивные клетки, ряд активированных Т-клеток	33, 35, 41, 43 (альтернативная инициация и сплайсинг)		Взаимодействие с продуктами протеолиза DM, CLIPs, в компартментах нагрузки антигеном позволяет пептидам связываться с МНС-П молекулами	МНС-И-ассоциированная инвариантная цепь, Ii, Iy	

Продолжение табл. 25

СО антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (кДа)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
СО Ш75	Зрелые В-клетки, подтипы Т-клеток, эпителиоциты, предшественники эритроцитов в костном мозге			Неизвестна; возможно, является олигосахаридом в зависимости от сиалирования		
	Подтипы Т-клеток, зрелые В-клетки, меланоциты, гепатоциты, почечные каналы			Неизвестна, возможно, является олигосахаридом в зависимости от сиалирования		
СОП	В-клетки зародышевого центра			Неизвестна	Глобо-триаоциллера-мид(ОЬЗ), Р ^к группа крови	
СО ш78	В-клетки			Неизвестна	Ва	
СП79о,э	В-клетки	а: 32 – 33 6: 37 – 39		Компоненты В-клеточного рецептора антигенов, аналогичные СШ, необходимы для экспрессии на клетке и проведении сигнала	1с0, 1сР	Суперсемейство иммуноглобулинов
СО80	Подтип В-клеток	60		Костимулятор, лиганд для СП28иСТЪА-4	В7 (теперь В7.1), ВВ1	Суперсемейство иммуноглобулинов
СШ1	Лимфоциты	26		Взаимодействует с СШ9 и С02\ с образованием ко-рецептора В-клетки	ТАРА-1 (мишень для адгипролиферативного антитела)	Суперсемейство «змеевик»
С082	Лейкоциты	50 – 53		Неизвестна	П2	Суперсемейство «змеевик»
С083	Активированные Т- и В-клетки, циркулирующие дендрциты (клетки с вуалью)	43		Неизвестна	НВ15	
СО&4	Моноциты, тромбоциты, циркулирующие В-клетки	73		Неизвестна	0116, СГМ84	
СМ5	Моноциты, циркулирующие В-клетки	120,83		Неизвестна		
СБ86	Моноциты, активированные В-клетки	80		Неизвестна	пж-і, ок65	
СО&7	Гранулоциты, моноциты, макрофаги, активированные Т-клетки	50 – 65		Рецептор плазминогенового активатора урокиназы	ЦРА-Е	Суперсемейство Бу-6
СО&&	Полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, мастоциты	40		Рецептор для С5а компонента комплемента	С5аК	Суперсемейство родопсина

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный Вес(kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD89	Моноциты, макрофаги, гранулоциты, нейтрофилы, подтипы Т- и В-клеток	50 - 70		Рецептор IgA	FcOR	Суперсеме́йство иммуноглобулинов
CD90	CD34* протимоциты человека, тимоциты, Т-клетки мыши	18		Неизвестна	Thy-1, CD90	Суперсеме́йство иммуноглобулинов
CD91	Моноциты	600		Рецептор для CV макроглобулина		
CDw92	Нейтрофилы, моноциты, тромбоциты, эндотелий	70		Неизвестна	GR9	
CD93	Нейтрофилы, моноциты, эндотелий	120		Неизвестна	GR11	
CD94	Подтипы Т-клеток, NK клетки	43		Неизвестна	KP43	
CD95	Широко распространен среди клеточных линий, распределение <i>in vivo</i> не изучено	43		Связывается с ФНО-подобным лигандом Fas, индуцирует апоптоз; лежит в основе АЛПС (у мыши — 1rg)	Apo-1, Fas	
CD96	Активированные Т-клетки	160		Неизвестна	Фактор повышенной поздней экспрессии при активации Т-клеток (TACTILE)	
CD97	Активированные Т-клетки	74, 80, 90		Неизвестна	GR1	
CD98	Т- и В-клетки, NK клетки, гранулоциты, нечеловеческие линии клеток	80,40 гетеродимер		Неизвестна	4F2	
CD99	Лимфоциты периферической крови, тимоциты	32		Неизвестна	MIC2, E2	
CD100	Широко представлен на гемопоэтических клетках	150		Неизвестна	GR3	
CDw101	Много на моноцитах, гранулоцитах, CD1a* дендритических клетках, Т-клетках слизистой, активированных Т-клетках; слабо на свежих тимоцитах, Т- и В-клетках, НК клетках	130 гомодимер		Неизвестна, может участвовать в активации Т-клеток (α-CD101 могут подавлять СОЗ-стимуляцию Т-клеток в СКЛ)	BPC#4, CD101	
CD102	Покоящиеся лимфоциты, моноциты, клетки сосудистого эндотелия (максимально)	55 - 65		Связывается с CD11a/CD18 (LFA-1), HecCD11b/CD18 (Mac)	ICAM-2	Суперсеме́йство иммуноглобулинов
CD103	Интраэпителиальные лимфоциты, 2-6% лимфоцитов периферической крови	150, 25		О ₄ -интегрин	HML-1, α ₄ , 0 ⁺ - интегрин	

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD 104	Эпителии, клетки Шванна, некоторые опухолевые клетки	220		В4-интегрин	Р4-интегрино-иная цепь	
CD 105	Эндотелиоциты, подтип костномозговых клеток, активированные <i>in vitro</i> макрофаги	95 гомодимер		Связывается с ФТР-(\$	Эндоглин	
CD 106	Эндотелиоциты	100,110		Молекула адгезии, лиганд для У1А-4	УСАМ-1	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 107a	Активированные тромбоциты	110		Неизвестна, является мембранным белком лизосом, транслоцируемым на плазмалемму после активации	БАМР-1 (лизосомальный белок, ассоциированный с мембраной)	
CD 107b	Активированные тромбоциты	120		Неизвестна, является мембранным белком лизосом, транслоцируемым на плазмалемму после активации	БАМР-2	
CD w108	Активированные Т-клетки и селезенке, некоторые клетки стромы	80		Неизвестна		
CD 109	Активированные Т-клетки, тромбоциты, эндотелиоциты	170/50		Неизвестна	Фактор активации тромбоцитов, <Ж56, СОш109	
CD 110-113	Пока не определены					
CD 114	Миелоидные предшественники, зрелые нейтрофилы, моноциты, слабо на тромбоцитах	84/89,6		Рассматривается как лиганд для Г-КСФ и регулирует дифференцировку нейтрофилов	Г-КСФЫ	Суперсемейство иммуноглобулинов, суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фибронектина Ш типа (участок подобия СО130)
CD 115	Моноциты, макрофаги, плацента, хориокарцинома	150		Рецептор М-КСФ; созревание моноцитов/макрофагов; гомозиготные рецессивные больные по гену М-КСФИ показаны при МДС	М-КСФИ, с-Лго, СЕЗР-1 (колониестимулирующий фактор-1)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 116	Моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, эндотелий	70-85		α-цепь рецептора ГМ-КСФ; фактор роста и созревания для нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, а также эритроидных предшественников	ГМ-КСФИα, СГлиПб	Суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фибронектина Ш типа

Продолжение табл. 25

СИ-антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (кДа)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
117	Гемопоэтические предшественники, мастоциты, меланоциты, сперматогонии, овоциты	145		Рецептор фактора стволовых клеток (ФСК); рост и созревание гемопоэтических, пигментных и половых клеток; показано участие в развитии пигментации	с-кН	Суперсемейство иммуноглобулинов, тирозинкиназа
св 118	Широко представлен на клетках			Рецептор для ИФН α .В	ИФН α ,вн	
св 119	Макрофаги, моноциты, В-клетки, эндотелий	90 - 100		Рецептор для интерферона γ	ИФН γ	
св 120a	Гемопоэтические и другие клетки, максимально на клетках эпителиев	50 - 60		Рецептор ФНО, связывается с ФНСч и с ФНО α	ФЮЖ-1	Суперсемейство ФРН-рецепторов
св 120b	Гемопоэтические и другие клетки, максимально на миелоидных клетках	75 - 85		Рецептор ФНО, связывается с ФНО α и с ФНО β	ФНОИ-П	Суперсемейство ФРН-рецепторов
св 121a	Тимоциты, Т-клетки	80		Рецептор ИЛ11 типа, связывается с ИЛ1 α и ИЛ1 β	ИЛ11 типа, СЕ γ 121a	Суперсемейство иммуноглобулинов
св u>121b	В-клетки, макрофаги, моноциты	60 - 70		Рецептор ИЛ11 типа, связывается с ИЛ1 α и ИЛ1 β	ИЛ11 типа	Суперсемейство иммуноглобулинов
СИ> 122	14К клетки, покоящиеся Т-клетки, некоторые В-клеточные линии	75		В цепь рецептора ИЛ2/15, входит в состав средне и высокоаффинных И	илгир	
СИЮ 123	Стволовые клетки костного мозга, гранулоциты, моноциты, мегакарициты	70		а цепь рецептора ИЛ3	ИЛ3ка, СВТУ123	Суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фиброэктинина III типа
св 124	Зрелые Т- и В-клетки, предшественники гемопоэтических клеток	130 - 150		Рецептор ИЛ4	ИЛ4И, СВУ124	Суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фиброэктинина III типа
СИ> 125	Эозинофилы, базофилы	55 - 60		а цепь рецептора ИЛ5	илбИa	Суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фиброэктинина III типа
св 126	Активированные В-клетки и плазматические (много), большинство лейкоцитов (мало)	80		(Х цепь рецептора ИЛ6	илбИa	Суперсемейство иммуноглобулинов, суперсемейство цитокиновых рецепторов, суперсемейство фиброэктинина III типа

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD 127	Костномозговые лимфоидные предшественники	68 - 79 (возможно, образуют гомодимеры)		Рецептор ИЛ7, CDw127		Суперсемейство фиброектина III типа
CD w128	Нейтрофилы, базофилы, подтип Т клеток	58 - 67		Рецептор ИЛ8		Суперсемейство родопсина
CD 129	Пока не определен					
CD 130	Активированные В-клетки и плазматиты (много), большинство лейкоцитов (мало), эндотелиальные клетки	130		Общая субъединица для ИЛ6, ИЛИ, ОСМ, ФТЛ, КТ1	ИЛ6Н ⁺ I3O сигнальный трансдуктор, CDw130, илввд-, и л i т В-,ФТЛНр-, ОСМНр-субъединица	Суперсемейство иммуноглобулинов, суперсемейство циткиновых рецепторов, суперсемейство фиброектина III типа
CD w131				Общая субъединица для ИЛ3, 5 & ГМ-КСФ	ассоциированный сигнальный трансдуктор, общая р ⁰ -цепь	Суперсемейство циткиновых рецепторов
CD 132				Общая субъединица для ИЛ2,4, 7, 9 & 15; генетический дефект лежит в основе синдрома Х-ТКИД	ИЛ2Ву-ассоциированный сигнальный трансдуктор, общая у ^c -цепь	Суперсемейство циткиновых рецепторов
CD 133	Не описана					
CD 134	Маркер активации Т-клеток у мышей и крыс			Неизвестна	ОХ40	Семейство Ф Ш Ж
CD 135	Костномозговые стволовые клетки и ранние клетки-предшественники, головной мозг	130 - 155		Рецепторная тирозинкиназа, участие в регуляции роста примитивных гемопоэтических клеток	БШ. вТК I. Ккг (фетальная печеночная киназа-2)	
CD w136	Макрофаги			Является протоонкогеном RON, рецепторная тирозинкиназа	МБР-К (рецептор макрофагстимулирующего белка)	Семейство фактора роста гепатоцитов и фактора рассеяния
CD w137	Активированные Т-клетки	39		Усиление пролиферации Т клеток при первичном ответе, индукция синтеза ИЛ2 и ИФНγ	4-1BB	Семейство Ф Ш Ж

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD 138	Фибробласты, эпителий, костномозговые предшественники В-клеток, плазматцы	30		Участие в связывании с антитромбином Ш и фибронектином	Синдекан-1	
CD 139	В-клеточные фолликулы, фолликулярные дендрциты	202, 209				
CD 140a	Фибробласты, миоциты, глиоциты и хоидроциты	170		а-субъединица ТФРИ	PDGFRa (а-субъединица рецептора тромбоцитариого фактора роста)	Суперсемейство иммуноглобулинов, тирозинкиназа
CD 110b	Фибробласты, миоциты, глиоциты и хондроциты	180		В-субъединица ТФРЫ	PDGFRB(В-субъединица рецептора тромбоцитариого фактора роста)	Суперсемейство иммуноглобулинов, тирозинкиназа
CD 141	Эндотелиоциты	68		Связывается с тромбином и катализирует его перевод в белок С, лежащий в основе антикоагуляции	Тромбомодулин	
CD 142					Тканевой фактор	
CD 143				Участие в протеолизе ангиотензина	АСЕ, ангиотензинконвертаза	
CD 144					VE-кадгерин	
CD w145						
CD 146					MUC18, S-эндо	
CD 147	Тимоциты, клетки костного мозга, лимфоциты, эпителий, эндотелий капилляров мозга, мышцы, нервы	28		Возможно, является передатчиком сигналов активации или транспортной молекулой	Нейротелин, базилии (мышь), MRC 0X47, HT7 (курица)	Суперсемейство иммуноглобулинов
CD 148		260		Человеческая тирозинфосфатаза T]	HPTP-r), DEP-1p260 фосфатаза	
CD w149					MEM-120/133	
CD wISO	ТхО, Тх1, Тх2 клетки, Т-клетки памяти (кровь), линии Т-клеток, незрелые тимоциты, часть В-клеток	70		Молекула коактивации Т клеток, вызывает преимущественный синтез ИФНУ СШ ⁺ Т-клетками независимо от фенотипа, а также переход Тх2 в ТхО	SLAM, IPO-3	Суперсемейство иммуноглобулинов

Продолжение табл. 25

CD антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
CD 151	Тромбоциты, эндотелий, эпителий, миоциты гладких мышц и сердца	30		Неизвестна	РЕТА-3 (тромбоцитарно-эндотелиальный антиген-3 семейства «змеевик»)	Суперсеме́йство «змеевик»
CD 152	Активированные лимфоциты	21		Связывается с В7.1/В7.2 со стороны В-клеток (Т-В кооперация) и приводит к ограничению активации В-клеток	CTLA-4	Суперсеме́йство иммуноглобулинов
CD 153					CD30L, CD30 лиганд	Семейство ФН (Ж)
CD 154	Активированные CD4 Т-клетки, базофилы	39		Связывается с CD40 на В клетках и приводит к переключению IgM на другие классы Ig; основа генетического дефекта при гипер-IgM синдроме	CD40L, CD40 лиганд, Т-ВAM, gp39	Семейство ФН (Ж)
CD 155	Моноциты; возможно, на нейронах	1) тм-а: 43, 5; 45, 3p-gp60-80 2) ск: две и.ф. x 44		Рецептор для полиовируса	PVR (рецептор для полиовируса)	Суперсеме́йство иммуноглобулинов
CD 156	Гранулоциты, моноциты, моноцитарные клеточные линии			Может участвовать в разрушении базальной мембраны и экстравазации нейтрофилов (ADAMs 1 - 7 & 13 представлены в репродуктивных органах, а 8 - 12, 14 & 15 - в других)	ADAM8, MS2 (мышь)	Семейство белков геморрагического яда змей
CD 157	Моноциты, <i>in vitro</i> дифференцировавшиеся макрофаги, гранулоциты, линии миеломоноцитарных клеток, фолликулярных дендроцитов, синовиоцитов, костномозговых стромальных клеток, HUVEC	42 - 45		Эктоэнзим с активностью ADP-рибозилциклазы и сADP-рибозогидроксилазы; также поддерживает рост rge-В-клеток и, возможно, является рецептором	BST-1, MO-5	Участки сходства с АОР-рибозилциклазой <i>Ap1y</i> & <i>Ia</i> и СОЗв
CD 158a ^{НК}	НК клетки, незначительная часть CD8 Т-клеток			Распознавание НК клетками аллелей H1A-C молекул, подавление ЦТЛ при TCR-активации	p58.1, МНС класс 1-специфические НК-рецепторы	
CD 158b	НК клетки, незначительная часть CD8 Т-клеток			Распознавание НК клетками аллелей HLA-C молекул, подавление ЦТЛ при TCR-активации	p58.2, МНС класс 1-специфические НК-рецепторы	

Продолжение табл. 25

СО антиген	Клеточная экспрессия	Молекулярный вес (kDa)		Функции	Другие названия	Принадлежность к семействам
СО 161	НК клетки			Активация НК клеток	К К К Р - 1	
СО 162	Большинство лейкоцитов периферической крови	110 гомодимер		Лиганд для С Ш 2 Р и СП62Е (контакт с последним слабый)	Р Б в И	Семейство сиаломуцина
СО 163	Моноциты, большинство макрофагов	130		Неизвестна, не связана с акцептированием материала как РМ-молекулами	М 130	Рецептор-мусорщик
СО 164	Эпителий, стромальные клетки костного мозга, С1534* гемопозитические предшественники, различные карциномы	80		Возможно участие в адгезии между клетками стромы костного мозга и гемопозитическими предшественниками	М в С - 24 (мультигликозилированный коровый белок 24 кДа)	
СО 165	Т-клетки, тимоциты, эпителиоциты тимуса, тромбоциты (слабо), нейроны ЦНС	40		Возможно участие во взаимодействии Т-клеток с кератиноцитами кожи и эпителиальными клетками тимуса	в Р 37 / А 02	
СО 166	Активированные Т- и В-клетки, эпителиоциты тимуса, фибробласты, эндотелий, кератиноциты, нейроны	100		Является лигандом для СО6, взаимодействие с которым может быть важным при контакте Т-и В клеток с активированными лейкоцитами, а также в связывании между клетками ЦНС	АБСАМ (молекула адгезии активированных лейкоцитов)	Суперсемейство иммуноглобулинов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонова Л. В., Ершов Ф. И., Григорян С. С.** и др. Интерфероновый статус женщин с гинекологическими заболеваниями, осложненными вирусной хламидийной и грибковой инфекцией // Вест. Рос. ассоц. акуш.-гинекол. 1996. № 2. С. 80 - 83.
- Ариненко Р. Ю., Аникин В. В., Малиновская В. В., Головкин В. И.** Интерферонотерапия и иммунотерапия: методы контроля и повышения эффективности // Terra Medica. 1998. № 1. С. 32 - 37.
- Ариненко Р. Ю., Аникин В. В., Малиновская В. В., Головкин В. И.** Система интерферона: первая линия защиты организма // Terra Medica. 1997. № 4. С. 11-14.
- Баринский И. Ф.** Герпетическая инфекция как вторичный иммунодефицит и пути его коррекции // ВИНТИ, серия «Иммунология». М., 1988. Т. 22. С. 126-146.
- Баринский И. Ф., Шубладзе А. К.** Лейкоцитарные культуры в вирусологических исследованиях — М.: Медицина, 1980. 175 с.
- Баринский И. Ф., Шубладзе А. К., Каспаров А. А., Гребенюк В. И.** Герпес (этиология, диагностика, лечение). — М., 1986. 206 с.
- Баринский И. Ф., Шубладзе А. К., Каспаров А. А., Гребенюк В. И.** Герпес: этиология, диагностика, лечение. — М.: Медицина, 1986. 272 с.
- Бикбулатов Р. М., Демидова С. А., Лярская А. Ф. и др.** Факторы клеточного иммунитета в патогенезе рецидивов хронической герпетической инфекции // Вопр. вирусол. 1982. Т. 27. № 4. С. 104.
- Богомолов Б. П., Бахур Е. Г.** О трудностях в диагностике опоясывающего лишая // Тер. архив. 1984. № 8. С. 138 - 140.
- Борисова В. В.** Клинико-иммунологические и прогностическое значение маркеров герпесвирусов при ВИЧ-инфекции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 1994.
- Бохман Я. В., Лютра У. К.** Рак шейки матки. — Кишинев. 1991. 239 с.
- Бочаров А. Ф., Кицак В. Я., Бочаров Е. Ф., Трухачев А. А.** Вирус простого герпеса. — Новосибирск. 1982. 322 с.
- Брызжикова Т. С.** Этиологические особенности и клинико-иммунологические проявления современной герпетической инфекции // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1995. 21 с.
- Брызжикова Т. С., Алешина Г. М., Исаков В. А., Мазинг Ю. А.** Катионные белки нейтрофильных гранулоцитов у больных рецидивирующим герпесом // Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения. Тезисы докл. науч. конф., 23 - 24 марта 1995 г. СПб. С. 351.
- Виноградская Г. Р., Горышин И. Ю., Плуталов О. В. и др.** Использование цепной реакции полимеризации для выявления вируса цитомегалии в тканях человека // VII Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов» (Москва). — 1990. С. 203.
- Вирусология в 3-х томах / Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. Перев. с англ. — М.: Мир, 1989.

- Галкин Ю. Н., Нильсон И. О., Эриксен Т. и др.** О клинической классификации синдрома приобретенного иммунодефицита // Клин. мед. 1990. Т. 68. № 10. С. 99 - 102.
- Гирич В. Н., Липкан Г. Н., Пороховнический В. Г.** Синдром приобретенного иммунодефицита. — Киев, Здоровье, 1991. 141 с.
- Гользанд И. В., Горячева Л. Г., Волков В. О. и др.** Характеристика изменений клеточных реакций у детей, больных хроническим вирусным гепатитом В, применение иммуностимулирующих препаратов // Педиатрия. 1984. № 8. С. 12 - 15.
- Егоров А. М., Осипова А. П., Дзантиев Б. В. и др.** Теория и практика иммуноферментного анализа — М.: Высш. шк., 1991. 288 с.
- Ершов Ф. И., Жданов В. М.** Система интеграции вида. — Вильнюс, 1986. С. 23 - 33.
- Ершов Ф. И.** Система интерферона в норме и при патологии. — М., 1996. 240 с.
- Жданов В. М.** Эволюция вирусов. — М.: Медицина, 1990. 376 с.
- Золотарев Ф. Н.** Разработка метода конкурентной точечной гибридизации и его использование для идентификации генного состава вирусов гриппа А // Автореф. дис. — канд. мед. наук. — Л., 1989.
- Зуев В. А.** Лабораторная диагностика латентных, хронических и медленных вирусных инфекций. — М., 1979. 183 с.
- Зуев В. А.** Медленные вирусные инфекции человека и животных. — М. 1988. 231 с.
- Ивановская Т. Е., Гусман В. С.** Заболевания, обусловленные вирусами герпеса // Патологическая анатомия болезней плода и ребенка: Руководство для врачей / Под ред. Т. Б. Ивановской, Л. В. Леоновой. — М. 1989. Т. 2. С. 266 - 271.
- Иващенко Т. Э., Лившиц Л. А., Тембовская С. А. и др.** Сравнительный анализ частоты делеции F 508 у больных муковисцидозом // Биополимеры и клетка. 1991. Т. 7. № 3. С. 49 - 64.
- Исаков В. А., Ермоленко Д. К., Брызжикова Т. С. и др.** Принципы терапии больных простым герпесом: Информационно-методическое письмо. СПб., 1993. 23 с.
- Исаков В. А., Ермоленко Д. К., Черных М. Д.** Терапия герпетической инфекции. — СПб., 1993. 40 с.
- Исаков В. А., Сафронова М. М.** Клиника и лечение генитального герпеса. — СПб., 1997. 30 с.
- Исаков В. А., Туркин В. В., Киселев О. И. и др.** Использование антиоксидантов в терапии гриппа и ОРЗ. — СПб., 1996. 52 с.
- Исаков В. А., Чайка Н. А., Ермоленко Д. К.** Вирус герпеса 6-го типа и СПИД. — Л., 1991. 28 с.
- Кощеева Т. К., Кузнецова Т. В., Рамша Ю. К.** Применение реакции специфической амплификации в пренатальной диагностике пола плода и генотипировании индивидуальных клеток // Биополимеры и клетка. 1991. Т. 7. № 3. С. 45 - 49.
- Келли Е. И., Шишов А. С.** Клинико-морфологический анализ причин летальных исходов у больных опоясывающим герпесом // Актуальн. проблемы медицинской вирусологии. Тез. докл. конференции. — М., 1985. С. 252.
- Кетлинский С. А., Калинина Я. А.** Иммунология для врача. — СПб., 1998. 155 с.
- Кибадин В. М. и др.** Простой и быстрый метод определения антител к вирусу простого герпеса // Журн. микробиол. 1989. № 1. С. 61.
- Кокряков В. Н.** Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов // Сб. научных трудов под ред. В. Е. Пигаревского. — Л., 1988. С. 12 - 51.
- Кокряков В. Н., Пигаревский В. Е., Алешина Г. М., Шамова О. В.** Синергические действия катионных белков при фагоцитозе // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций. — Горький. 1989. С. 98 - 103.

- Коломиец А. А., Вотяков В. И., Бикбулатов Р. М.** Генерализованная герпетическая инфекция: факты и концепция. Минск. 1992. 350 с.
- Коломиец А. Г., Малевич Ю. К., Коломиец Н. Д.** Многоликий герпес. Минск. 1988. 70 с.
- Лысенко А. Я., Лавдовская М. В.** СПИД-ассоциируемые инфекции и инвазии / М.: Медикас, 1992. 320 с.
- Мазинг Ю. А., Данилова М. А.** Резорбтивная клеточная резистентность // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций. — Горький, 1989. С. 103 - 109.
- Новицкий В. А., Пушкарская Н. Л., Баринский И. Ф.** // Вопр. вирусол. 1987. № 3. С. 261-277.
- Перадзе Т. В., Халонен П.** Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. — М.: Медицина, 1985. 301 с.
- Петров Р. В., Лопухин Ю. М., Чередеев Н. и др.** Оценка иммунного статуса человека: методические рекомендации. — М., 1984.
- Пренатальные и перинатальные инфекции // Отчет ВОЗ. Грац, 24 - 26 мая 1982 г. 164 с.
- Пригожина В. К., Исаков В. А., Ермоленко Д. К. и др.** Актуальные вопросы инфекционной патологии // Матер, научно-практ. конф. — Тольятти. 1990. С. 61-63.
- Пригожина В. К., Чайка Н. А., Рахманова А. Г.** Герпетическая инфекция и СПИД: рекомендации для врачей. — Л., 1990. 44 с.
- Профилактика герпесвирусных болезней и борьба с ними. Ч. I. Клиническая и лабораторная диагностика и химиотерапия // Вголи. ВОЗ. 1985. Т. 63. № 2. С. 1.
- Рахманова А. Г., Исаков В. А., Чайка Н. А.** Цитомегаловирусная инфекция и СПИД: рекомендации для врачей. — Л., 1990. 61 с.
- Рахманова А. Г., Пригожина В. К., Неверов В. А.** Инфекционные болезни: Руководство для врачей общей практики. М.; СПб., 1995. 302 с.
- Рахманова А. Г., Исаков В. А., Чайка Н. А.** Цитомегаловирусная инфекция и СПИД. — Л.: НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1990. 64 с.
- Рахманова А. Г., Мальцева И. В., Чайка Я. А.** Вирус Эпштейна — Барр и СПИД. — Л.: НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1990. 48 с.
- Семенов Б. Ф., Кауленд О., Баландин И. Г.** Клеточные и молекулярные основы противовирусного иммунитета. М: Медицина, 1982. С. 35 - 47.
- Семенова Т. В., Посева Т. А., Карнович Л. Г. и др.** Вестник дерматол. и венерол. 1987. № 6. С. 43 - 47.
- Семенова Т. Б., Красников Д. Г., Судариков А. Р.** Клиника, диагностика и лечение генитального герпеса у женщин // Акуш. и гинекол. 1990. № 6. с. 70.
- Скрипкин Ю. К., Дилекторский В. В., Борисенко К. К. и др.** Урогенитальные хламидоз, уреаплазмоз, гарднереллез (диагностика, лечение, профилактика) // Методические рекомендации. — М., 1988.
- Сухих Г. Т., Ванько Л. В., Кулаков В. И.** Иммуноцитопатический герпес. — Н. Новгород—Москва, 1997. 221 с.
- Тотолян А. А., Марфицева Н. А., Тотолян Н. А.** Иммуноглобулин в клинической лабораторной диагностике. — СПб., 1996. Вып. 3. 28 с.
- Фрейдли И. С.** Иммунная система и ее дефекты. — СПб., 1998. 110 с.
- Нинзерлинг А. В.** Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза. — СПб.: Сотис, 1993. 287 с.
- Шварц Е. И., Кабоев О. К., Гольцов А. А. и др.** Праймерзависимая амплификация двух участков глобинового гена человека // Вивоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1577-1579.
- Шишов А. С., Уманский К. Г.** Опоясывающий герпес и его генерализованная форма // Клин. мед. 1988. Т. 59. № 9. С. 66 - 71.
- Эбралидзе Л. К., Хамаганова И. В.** Новые возможности лабораторной диагностики генитального герпеса // Вест, дерматол. и венерол. 1991. № 6. С. 23 - 26.

- Ablaahi D. V., Balachandran N., Josephs S.F. et al.** Genomic polymorphism, growth properties and immunologic variations in human herpesvires-6 isolates // Virology. 1991. Vol. 184. P. 545 - 53.
- Ablaahi D. V., Berneman Z. N., Kramarsky B. et al.** Human herpesvirus-7 (HHV-7). // In Vivo. 1994 Vol. 8 №4. P. 549 - 54.
- Amadori A., Zamarehi R, Ciminele V. et al.** HIV-1 specific B cell activation: A maior constituent of spontaneous B cell activation during HIV-1 infection // J. Immunol. 1989. Vol. 143. № 2. P. 2146 - 2152.
- Asano Y., Suga S., Yoshikawa T. et. al.** Clinical features and viral excretion in an infant with primary human Herpesvirus 7 infection // Pediatrics. 1995. Vol. 95. № 2. P. 187 - 90.
- Aurelius E., Johansson B., Skoldenberg B. et al.** Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid // Lancet. 1991. Vol. 337. № 8735. P. 189 - 192.
- Barclay A. N. et al.** The Leucocyte Antigen. Facts Book. 3rd ed. Acad. Press, 1995.
- Bernet C, Garret M., Barbeyrac B. et al.** Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol. 1989. Vol. 27. № 11. P. 2492-2496.
- Boehnke M., Arnheim N., Li H., Collins F. S.** Fine — structure genetic mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations // Am. J. Hum. Genit. 1989. Vol. 45. № 1. P. 21 - 32.
- Bovenzi P., Mirandola P., Secchiero P. et al.** Human herpesvirus 6 (varian A) in Kaposi's sarcoma // Lancet. 1993, Vol. 341. № 8846. P. 1288 - 1289.
- Brown F.** The classification and nomenclature of viruses: summare of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai, September 1984 // Intervirology. 1986. Vol. 25. P. 141 - 143.
- Buff one G. J., Hine E., Demmler G. J.** Detection of mRNK from the immediate early gene of human cytomegalovirus in infected cells by in vitro amplification // Mol. and Cell. Probes. 1990. Vol. 4. № 2. P. 143 - 151.
- Callard R., Gearing A.** The Cytokine Facts Book. Acad. Press, 1994.
- Canessa A.** Diagnosi delle infezioni da Herpes simplex virus // Gaslini. 1990. Vol. 22, № 1. P. 35 - 45.
- Carrigan D. R. Knox K. K., Tapper M.A.** Supression of human immunodeficiency virus type 1 replication by human herpesvirus-6 // J. Infect. Dis. 1990. Vol. 162. № 4. P. 844 - 851.
- Chou S.** Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical speciments // J. Infect. Dis. 1990. Vol. 162. № 3. P. 738 - 742.
- Chou S.** Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection // Rev. Infect. Dis. 1990. Vol. 12. Suppl. 7. P. 727 - 736.
- Clements J. B., Hay J.** RNA and protein synthesis in herpesvirus-infected cells // J. Gen. Virol. 1977. Vol. 35. № 1. P.1 - 12.
- Cocks B. G. et al.** A novel receptor involved in T-cell activation // Nature. 1995. Vol. 376. P. 260 - 263.
- Croen K. D., Ostrove J. M., Dragovic L. I. et al.** Patterns of gene expression and sites of latency in human nerve ganglia are different for varicella-zoster and herpes simplex virus // Proc. Nat. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. № 24. P. 9773 - 9777.
- Dubreuil-Lemaire M., Gray F., Levy Y.** Acute Varicella Zoster virus meningo-myelo-radculitis in HIV positive patients // 9 Intern. Conf. on AIDS in affiliation with the 4 STD World Congr.: Abstract book. Berlin, 1993. Vol. 1. P. 427.
- Dutilth B., Bebear C, Rodriguez P. et al.** Specific amplification of a DNA sequence common to all Chlamydia trachomatis serovars using the polymerase chain reaction // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 1989. Vol. 140. № 1. P. 7 - 16.
- Eisenach K. D., Cave M. D., Bates J. H., Crawford J. T.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis // J. Infect. Dis. 1990. VoU 161. № 5. P. 977 - 981.

- Emsbroek J. A., Overdiek P., Contiuh R. A.** Rapid amplified ELISA evaluated for detectingherpesimplexvims // Gen. Med. 1988. Vol. 64. № 2. P. 107 - 109.
- Enders ft, BiberM., MeyerG., Helftenbein E.** Prevalence of antibodies to human HHV-6 in different age groups, in children with exanthema subitum, other acte exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections with other herpesviruses and HIV // Infection. 1990. Vol. 18. № 1. P. 12 - 15.
- Epstein M. A., Achong B. G., Barr Y. M.** Virus particles in outlured lymphoMasts from Burkitt's lymphoma // Lancet. 1964. Vol. 1. № 7335. P. 702 - 703.
- Evans AS.** Viral infections of humans: epidemiology and control. — New-York, London, 1989.
- Fchuiz T. F. et al.** HHV — 8 // Nature. 1995. Vol. 373. P. 17 - 18
- Fluit A C., van Stijp J. AG., Miltenburg L. AN. et al.** The use of a hybridization assay for the study of host deferences against HSV // J. Virol. Meth. 1989. Vol. 26. № 3. P. 269 - 278.
- Foa-Tomasi L., Avitabile E., Ke L., Campade Ui-Fiume G.** Polyvalent and monoclonal antibodies identify major immunogenic proteins specific for human herpesvirus 7-infected cells and have weak cross-reactivity with human herpesvirus 6 // J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75 № 10. P. 2719 - 27.
- Forman M., Charache P., Arthur R.** The use of polymerase chair reaction for detection of cytomegalovirus in olinioal specimens // Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol. (NewOrlean). — 1989. D-238. P. 122.
- Fratazzi C. et al.** Regulation of human cytotoxic T-lymphocytes development by the synergistic effect of IL-7andsCD23// Clin. Immunol. Immunopathol. 1998. Vol. 86. № 1. P. 34 - 44.
- Frencel N., Schirmer T. C., Wyatt L. S. et al.** Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1990. 87. P. 748 - 752.
- Gallo R. C.** Mechanism of disease induction by HIV // J. AIDS. 1990. № 3. P. 380 - 389.
- Giebel L. B., Zoller L., Bautz E. K. F., Darai G.** Rapid defection of genomic variations in different strains of hantaviruses by polymerase chain reaction techniques and nucleotide sequence analysis // Virus Res. 1990. Vol. 16. № 2. P. 127 - 136.
- G Uden D. H., VafaiA, Shtram Y. et al.** Varicella-zostervirus DNA in human sensory ganglia // Nature. 1983. Vol. 306. P. 478 - 480.
- Gleaves E.A, Meyers J.D.** Determination of patient HSV immune status by latex agglutination // J. Clin. Microbiol. 1988. Vol. 26. № 7. P. 1402 - 1403.
- Gorenseh M. J., Stewart A W., Keys T. F. et al.** A multivariate analysis of the risk of cytomegalovirus infection in heart transplant recipients // J. Infect. Dis. 1988. Vol. 157. № 3. P. 515 - 522.
- Guiloffit J.** AIDS: neurological opportunist infections in central London // J. Roy. Soc. Med. 1989. Vol. 82. № 5. P. 278 - 280.
- Gyllensten U. B., EHich H.A** Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its amplication to direct sequencing of the HLA-DQA locus // Proc. Nat. Aoad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 7652 - 7656.
- Havvis S. Z., Frank I., Gee A et al.** Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus Type 1 prevents complement-mediated Cell lysis and virus neutralization // J. Infect. Dis. 1990. Vol. 162. № 2. P. 331 - 338.
- Herold B. C.** Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsoption of virus to cells and in infectivity // J. Virol. 1991. Vol. 65. № 3. P. 1090 - 1098.
- Hukkanen V., HeinoP., Sears A E. et al.** Detection of herpes simplex virus latenoy-associated RNA in mouse trigenimal ganglia by in situ hybridization using nonradioactive digoxigenin-labeled DNA and RNA probes // Meth. Mol. Cell. Biol. 199a Vol. 2. № 2. P. 70 - 81.
- Jacobson M. A, Berger T. G., Fikrig S. et al.** Acyclovir-resistant varicella zoster virus infection after chronic oral acyclovir therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) // Int. J. Gynecol. Obstet. 1990. Vol. 33. № 1. P. 82.

- Janeway C. A., Trauers P.** Immunobiology. The Immune system in Health and Disease. 2nd ed. Current Biology Ltd. /Garland Publishing Inc. 1996.
- Jang I. K. et al.** Human 4 - IBB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kkB// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 242. P. 613 - 620.
- Jennings R, Erturk M.** Comparative studies of HSV-1 antigens solubilised from infected cells by using non-ionic or zwitterionic detergents // J. Med. Virol. 1990. Vol. 31. № 2. P. 98 - 108.
- Jiwa M., Renske D. M., Zwaan F. E.** Three sensitive methods for the detection of cytomegalovirus in lung tissue of patients with interstitial pneumonitis //Am. J. Clin. Pathol. 1990. Vol. 93. № 4. P. 491 - 494.
- Kishimoto T. et al.** CD antigens 1996: The Sixth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens// Immunologist. 1997. Vol. 5 № 2. P. 57 - 70.
- Kishimoto Tet al.** (Eds). Leukocyte typing VI. New York: Garland, 1997.
- Koichi Yamanishi.** Human Herpesvirus 6 and 7 Infection // IHMF Herpes. 1995. Vol.2.№3. P. 69 - 75.
- Lardelli P., Manzano D., Steinberg S. M. et. al.** Correlative detection of human immunodeficiency virus (HIV) antigen p24 and Epstein-Barrvirus DNA in vitro: clinical influence on HIV infection // Microbiol. Imm. 1992. Vol. 36. №8. P. 905 - 9.
- Laurence J.** Molecular interactions among herpes viruses and human immunodeficiency viruses //J. Infec. Dis. 1990. Vol. 162. P. 338 - 346.
- Lee C. C., Wu X., Gibbs RA. et al.** Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase // Science. 1988. Vol. 239. № 4845. P. 1288-1291.
- Levy J., Ferro F., Greenspan E>., et al.** Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population // Lancet. 1990. № 8697. P. 1047-1050.
- Levy J., Ferro F., Lennette E. T. et al.** Characterization of a new strain of HHV-6 recovered from the saliva of an HIV-infected individual // Virology. 1990. Vol. 178. № 1. P. 113-121.
- Li H., Gyllensten U. B., Cui X. et al.** Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells // Nature. 1988. Vol. 335. P.414 - 417.
- Li J. M., Morgan M.A, Rascon D. et al.** Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus //Abstr. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol. (New Orleans). — 1989. S. 10. P. 372.
- Luginbuhl L. M., Orav E. J., McIntosh K., Lipshultz S. E.** Cardiac morbidity and related mortality in children with HIV infection // JAMA. 1993. Vol. 269. № 22. P. 2869 - 75.
- Luppi M., Barozzi P., Marasca R** Characterization of human herpesvirus 6 genomes from cases of latent infection in human lymphomas and immunedisorders // J. Infect. Dis. 1993. Vol. 168. № 4.1074 - 1075.
- Lueeo P., Ensoli B., Markham P., et al.** Productive dual infection of human CD4 T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6 // Nature. 1989. Vol. 337. № 6205. P. 370-373.
- lueeo P., Gallo R G.** Human herpes 6 in AIDS //Lancet. 1994. Vol. 343. № 8897. P. 555.
- Mackem S.,Roizman B.** Structure features of the herpes simplex virus gene, 4,0,27 promoter regulatory sequences with coufer a-regulation on chimeric thymidine kinase gene // Virology. 1982. Vol. 44. P. 939 - 949.
- MacLean G., Weseely S.** Professional and popular views of chronic fatigue syndrome // Brit. Med. J. 1994. Vol. 308. № 6931. P. 776.
- Mariotti M., Lefrere J. -J., Rouger Ph.** Latechnique de «Polymerase chain reaction* (PCR) // Spectrabiol. 1989. Vol. 7. № 3. P. 45 - 47.
- Martina G. V., Grimaldi L. M. E., Moidla L. et al.** Antibody against EBV in CSF from HIV-1 and HTLV-1 infected patients// Acta neurol. 1990. Vol. 12. № 1. P. 68 - 70.

- Matsuoka Y., Ray R, Compans R W.** Sequence of the hemagglutinin-neuraminidase gene of human parainfluenza virus type 1 // *Virus Research*. 1990 Vol. 16. № 1. P. 107-114.
- Maxam A, Gilbert W.** Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages // *Methods Enzymol.* 1980. Vol. 65. P. 499 - 580.*>.,
- McCarrey J. R, Kaufman J. C, Churchill M. A, Zaia J.** A Differential detection of viral DNA and RNA in situ in cells infected with human cytomegalovirus // *J. Virol. Meth.* 1989. Vol. 25. № 3. P. 301 - 314.
- McGeoch D. J.** The genome of herpes simplex virus: structure, function and evolution // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1986. Vol. 367. P. 477.
- McGuire T.** Chronic active Epstein — Barr virus infection, an AIDS-Co-Factor or predominant infection? // *Med Hypotheses.* 1993. Vol. 40. № 1. P. 8 - 14.
- Melbye M., Grossman R J., Goedert J. J. et. al.** Risk of AIDS after herpes zoster // *Lancet.* 1987. № 8535. P. 728 - 731.
- Moseson M. W.** The role plasma fibronectin in monocyte macrophage-function // 1982. *Venh. Dtsh. Cels in nerl. Med.* 88 Kongr. № 36.
- Mosmanu T. R et al.** Functions of CD8+ T-cell secreting differant cytokine potterns // *Seminars in Immunology.* 1997. Vol. 9. P. 87 - 92.
- Muggeridge M. I., Wilcox W. C, Cohen G. H. et al.** Identification of a site on herpes simplex type 1 glycoprotein D that is essetial for infectivity // *J. Virol.* 1990. Vol. 64. № 8. P. 3617 - 3626.
- Musiani M., Zerbini M., Gentilomi G. et al.** An amplified dot immunoassay for the direct quantitation of adapted and wild strains of human cytomegalovirus // *J. Virol. Meth.* 1989. Vol. 24. № 3. P. 327 - 334.
- Nago R, Hagashi K., Ochiai H.etal.** Detection of herpes simplex virus type 1 in herpetic diseases by DNA-DNA hebridization using a biotینگlatten DNA probe // *J. Med. Virol.* 1988. Vol. 25. № 3. P. 259 - 270.
- Naidu AS.** Site specific inversion sequence of the herpes virus genome: domaine and structural features// *Acta mictobiol. hung* 1991. Vol. 38. № 3-4. P. 245.
- Nebel-Schickel H, Hinderer W., Horn J. et al.** EBV antibody pattern in HIV infected patients of different clinical stages // 9 Intern. Conf. on AIDS in affiliation with the 4 STD World Congr.: Abstract book. Berlin, 1993. Vol. 1. P. 352.
- Nicholson L.** Epstein—Barr virus persistence in epithel lial cells // *Lancet.* 1994. Vol. 343. № 8900. P. 789.
- Norrild B.** Immunochemistry of herpes virus glicoproteins // *Curr. Top. Micro-biol. Immunol.* 1980. Vol. 90. P. 67.
- Okano M., Nakanishi M., Taguchi Y. et. al.** Primary immunodeficiency diseases and Epstein—Barr virus-induced lymphoproliferative disorders // *Acta Paediatr. Jpn.* 1992. Vol. 34. № 4. P. 385 - 92.
- Okke J. B., Weismann K., Mathiesen L., Klem T. H.** Atypical varicella-zoster infection in AIDS // *Acta Derm. Venereol. (Stockh).* 1993 Vol. 73. № 2. P. 123 - 5. P. 143 - 151.
- Paulus W., Jellinger K., Halias C. et al.** Human herpesvirus-6 and Epstein—Barr virus genome in primary cerebral lymphomas // *Neurology.* 1993. Vol. 43. № 8. P. 1591 - 3
- Peng X. et al.** Cytokine. 1997. Vol. 9. № 7. P. 499 - 500.
- Plettenberg A, Stoehr A, Meigei W.** Skin and mucosal infections caused by viruses of the herpesvirus group in HIV infections // *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1993. Vol. 118. № 1-2. P. 30 - 7.108.
- Portolani M., Cermelli C, Mirandola P., Di Luca D.** TT. Isolation of human herpesvirus 7 from an infant with febrile syndrome. // *J. Med. Virol.* 1995. Vol. 45. № 3. P. 282 - 3.
- Pruksananonda P., Breese Hall C, Insel R. A et al.** Primary human herpesvirus 6 infection in young children // *N. Engl. J. Med.* 1992. Vol. 326. P. 145 - 50.
- Puck J. M., Sneller M. C.** ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis// *Sem. Immunol.* 1997. Vol. 9. P. 77 - 84.
- Resnick L., Herbst J. H. S., Ablashi D. V. et ah** Regression of oral hairy leukoplakia after orally aaministered acyclovirtherapy // *JAMA.* 1988. Vol. 259. P. 384 - 388.

- Roizman B., Batterson W.** Herpesviruses and their replication // Virology /Eds. by B.N.Fields et al. New York, 1985. P. 497 - 526.
- Roizman B.** An injury in the mechanisms of recurrent herpes infection of man // Perspectives in virology /Ed. M. Pjollard. N-Y. Herper. Row. 1965. Vol. 4.283 p.
- Rojo J., Boni faz R, Koch B., Krueger G. R** Initial studies of the prevalence of human Herpesvirus 7 (HHV-7) in Mexican blood donors) //Pathologe. 1995. Vol. 16. №3. P. 204 - 7.
- Ruger R, Bornkamm G.W., Fleckenstein B.** Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome // J. Gen. Virol. 1984. Vol. 65. Part 8. P. 1351-1364.
- Ruther U.,NunnensickC, Muller H. A G. et al.** Epstein — Barr virus DNA in human germ cell tumors // Tumor Diagn. und Ther. 1989. Vol. 10. № 6. P. 268 - 269.
- Saiki R K., Gelfand D. H. Stoffel S. et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. Vol. 239. №4839. P. 487 - 491.
- Saiki R K., Scharf S., Faloona F. et al** Enzymatic amplification of -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985. Vol. 230. №4732. P. 1350- 1354.
- Salahuddin S. Z., Markham P. D., Popovic M. et al.** Isolation of infectious human T-cell leukemia/lymphotropic — virus type in (HTLV-III) from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related complex (ARS) and from healthy carriers: a study of risk groups and tissue sources // PNAS. 1985. Vol. 82. P. 5530-5534.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A R** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage ϕ X 174) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. № 12. P. 5463 - 5467.
- Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H.** A Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences // Science. 1986. Vol. 233. №4768. P. 1076-1078.
- Schochetman G., Ou Chi-Yih, Jones Wands K.** Polymerase chain reaction // J. Infect. Diseases. 1988. Vol. 158. № 6. P. 1154 - 1157.
- Secchiero P., Berneman Z. N., Gallo R C., Lusso P.** AD Biological and molecular characteristics of human herpesvirus 7: in vitro growth optimization and development of a syncytia inhibition test // Virology. 1994. Vol. 202. № 1. P. 506 - 12.
- Shibata D., Klatt E. C.** Analysis of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infection by polymerase chain reaction in the acquired immunodeficiency syndrome // Arch. Pathol. Lab. Med. 1989. Vol. 113. № 11. P. 1239 - 1244.
- Shore S., Nahmias A.** Immunology of herpes simplex virus: Immunology of human infection // Ed. Nahinias A. I. O'Reilly R. N. Y. 1992. P. 21 - 72.
- Skar A. G., Middeldorf J., Gendersen T. et al.** Rapid diagnosis of genital herpes simplex infection by an indirect ELISA method // NIPH Am. 1988. Vol. 11. P. 259 - 66.
- Spann W., Pachmann K., Zabnienska H. et al.** In situ amplification of single copy gene segments in individual cells by the polymerase chain reaction // Infection. 1991. Vol. 19. № 4. P. 242 - 244.
- Stasey E., Glenda L., Brown C. M.** Identification of homologues to the CMV US22 gene family in HHV6 // J. Gen. Virol. 1992. Vol. 73. № 7. P. 1661 - 1671.
- Steeper T., Horwitz C. Ablashi D., et al.** The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human HHV-6 in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein—Barr virus of cytomegalovirus // Amer. J. Clin. Pathol. 1990. Vol. 93. № 6. P. 776 - 783.
- Stoflet E. S., Koeberl D. D., Sarkaz G, Sommer S. S.** Genomic amplification with transcript sequencing // Science. 1988. Vol. 239. № 4839. P. 491 - 494.
- Straub P., Domke L, Kierchner H.** Cell-mediated immune response in recurrent herpesvirus infection // Lab.-Med. 1986. Vol. 9. № 4. P. 214 - 216.
- Straus Stephen E.** Epstein—Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis and Management // Annals of Internal Medicine. 1998. Vol. 118. P. 45 - 58.

- Tanaka K., Kondo T., Torigoe S. et al.** Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum) // *J. Pediatr.* 1994. Vol. 125. № 1. P. 1 - 5.
- Taylor D. L., Taylor-Robinson D., Jeffries D. J., Turns A. S.** Characterization of cytomegalovirus isolates from patients with AIDS by DNA restriction analysis // *Epidemiol. and Infec.* 1988. Vol. 101. № 3. P. 483 - 494.
- The dictionary of modern medicine** / Ed. by J. C. Segen. Basel: Editiones Roches, 1992.
- Torigoe S., Kumamoto T., Koide W. et al.** Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. // *Arch. Dis. Child.* 1995. Vol. 72. № 6. P. 518 - 9.
- Tozzi V., Britton S., Ehrnst A et al.** Persistent productive HIV infection in EBV-transformed B lymphocytes. // *J. Med. Virol.* 1989. Vol. 27. № 1. P. 19 - 24.
- Vaughan P. J., Purifoy D. J., Powell K. L.** DNA-binding protein associated with herpes virus DNA polymerase // *J. Virol.* 1985. Vol. 53. P. 501 - 508.
- Verano E., Michalski F. J.** Herpes simplex virus antigen direct detection in standard virus transport medium by Du Pont Herpcheck enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Clin. Microbiol.* 1990. Vol. 28. № 11. P. 2555 - 2558.
- Warford A Li Chung J. W., Drill A E., Steinberg E.** Amplification techniques for detection of herpes simplex virus in neonatal and maternal genital specimens obtained at delivery // *J. Clin. Microbiol.* 1989. Vol. 27. № 6. P. 1324 - 1328.
- Weijer W. S., Drijfhout I. W.** Antibodies against synthetic peptides of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D and their capability to neutralize viral infectivity in vitro // *J. Virol.* 1988. Vol. 62. P. 501.
- Whitley R J.** Varicellazoter virus infections: chronic disease in the immunocompromised host: evidence for persistent excretion of virus // *Pediat. Inf. Dis. J.*, 1989. № 9. P. 584 - 585.
- Wildy P.** Portraits of viruses. Herpes virus // *Intervirology.* 1986. Vol. 25. P. 117 - 140.
- Winnacker E.-L.** From genes to clones (introduction to gene technology). — Weinheim, 1987.
- Zevin S., Hahn T.** Antiviral agents and viral diseases of man // *Clin. Exp. Immunol.* 1985. Vol. 60. P. 267 - 273.

Валерий Александрович ИСАКОВ
Вера Витальевна БОРИСОВА
Дмитрий Валерьевич ИСАКОВ
ГЕРПЕС: ПАТОГЕНЕЗ
И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
РУКОВОДСТВО ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Генеральный директор **А.Л. Кноп**
Директор издательства **О. В. Смирнова**
Главный редактор **Ю. А. Сандулов**
Медицинский редактор **И. Д. Шабанов**
Художественный редактор **С. Л. Шапиро**
Верстальщик **К. Н. Белькова**

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат
78.10.07.952.Т.11667.01.99 от 19.01.99
выдан ЦГСЭН в СПб.

Издательство «ЛАНЬ».
Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, 277.

Сдано в набор 20.11.98. Подписано в печать 10.02.99.

Бумага офсетная. Формат 84X108'Д.,.

Гарнитура Тайме. Печать высокая.

Печ. л. 12. Тираж 3000 экз. Заказ К 081.

Отпечатано с готовых диапозитивов

в ППП «Печатный Двор»

Государственного комитета РФ по печати.
197110, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 15.