

*Г.И. ГАРЮК, Л.А. ПАНЧЕНКО\*, Е.А. КУЛИКОВА, Н.Г. ПОПОВА\**

## **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА В ПРАКТИКЕ ОТОЛАРИНГОЛОГА**

*Харьков. мед. академия последиплом. образования (ректор – проф. А.Н. Хвистюк);*

*\*Ин-т микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАН Украины,*

*г. Харьков (дир. – проф. Ю.Л. Волянский)*

Во всем мире конец XX и начало XXI столетия отмечены значительным ростом заболеваемости герпесвирусными инфекциями (ГВИ) (Malkin, 2005).

Высокий показатель инфицированных лиц (до 90-100%) и пациентов с клинически манифестными, субклиническими и латентными формами заболевания позволяет считать, что ГВИ имеют эпидемическое распространение среди населения земного шара (Mindel, 1994; Malkin, 2005).

До настоящего времени статистических данных о заболеваемости ГВИ в Украине нет ввиду отсутствия их регистрации. Но многие отечественные исследователи также отмечают значительное число инфицированных лиц и пораженных той или иной формой ГВИ (И.И. Мавров, 1998; В.Ф. Марцевский и соавт., 1999). Такое большое количество больных герпесвирусной инфекцией в структуре общей инфекционной заболеваемости в мире и у нас в стране во многом можно объяснить увеличением среди населения популяции иммунокомпromетированных лиц. Несомненно, имеют значение и другие факторы, в том числе уровень социально-экономического развития страны, обычаи населения и др. (Sandström, Whitley, 1995).

Зарубежные и отечественные исследователи обосновывают необходимость повышения внимания к проблеме ГВИ, в том числе важность широкого использования методов своевременного их выявления (Kimberlin, 2004, 2004). От решения этих вопросов зависит повышение эффективности антигерпесвирусной терапии и снижение риска передачи ГВИ.

Семейство Herpesviridae, представленное ещё недавно 5-ю типами возбудителей ГВИ, в конце прошлого века пополнилось тремя новыми герпесвирусами человека 6-го, 7-го и 8-го типов (Н.Д. Львов, А.В. Мельниченко, 1991). Изоляция последних от лиц с лимфопролиферативными заболеваниями стала возможна благодаря разработке методов культивирования лимфоцитов *in vitro*. Таким образом, в настоящее время общее число герпесвирусов человека представлено 8 членами, которые вследствие различия по ряду биологических свойств, характеру репликации в клеточных культурах, клинической картине и патогенезу вызываемых заболеваний распределены в 3 подсемейства ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

В  $\alpha$ -Herpesvirinae вошли нейротропные вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2), а также герпесвирус зостер (ВГЧ-3); в  $\beta$ -Herpesvirinae – цитомегаловирус (ЦМВ), герпесвирус человека 6-го типа (ВГЧ-6) и 7-го типа (ВГЧ-7). Герпесвирус Эпштейна-Барра (ВЭБ) и герпесвирус человека 8-го типа (ВГЧ-8) составили  $\gamma$ -Herpesvirinae.

Из перечисленных подсемейств на сегодняшний день наиболее полно охарактеризованы  $\alpha$ -герпесвирусы (ВПГ-1, ВПГ-2), и в мировой практике накоплен достаточно большой опыт по их детекции в клиническом материале (Griffiths, Volpi, 1997). Поэтому в данной статье основное внимание уделено современным диагностическим возможностям выявления вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов. Но необходимо отметить, что и в отношении других герпесвирусов (ЦМВ, ВЭБ), а также сравнительно

недавно выделенных вирусов  $\beta$ - и  $\gamma$ -подсемейств имеются определённые успехи

в плане их диагностики (Sandström, Whitley, 1995).

Таблица 1

Герпесвирусы и вызываемые ими основные клинические формы заболеваний человека

Герпесвирусы человека	Латинское обозначение	Основные заболевания, обусловленные данным типом герпесвируса
Вирус простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1)	HSV-1	герпес кожи, слизистой оболочки (лабиальный, генитальный, офтальмогерпес); герпетический энцефалит; герпетическая пневмония
Вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2)	HSV-2	генитальный герпес; неонатальный герпес
Герпес зостер вирус, или вирус герпеса человека 3-го типа (ВГЧ-3)	HZV	ветряная оспа, опоясывающий лишай (герпес зостер)
Вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ), или вирус герпеса человека 4-го типа (ВГЧ-4)	EBV	инфекционный мононуклеоз; назофарингеальная карцинома; лимфома Беркитта; синдром хронической усталости
Цитомегаловирус (ЦМВ), или вирус герпеса человека 5-го типа (ВГЧ-5)	CMV	врожденные и приобретенные поражения ЦНС; ретинопатии; поражение желудочно-кишечного тракта; синдром хронической усталости
Вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6)	HHV-6	лимфотропный вирус (возбудитель внезапной экзантемы у детей); синдром хронической усталости
Вирус герпеса человека 7-го типа (ВГЧ-7)	HHV-7	лимфотропный вирус (возбудитель внезапной экзантемы у детей); синдром хронической усталости
Вирус герпеса человека 8-го типа (ВГЧ-8)	HHV-8 или KSHV-8	В-клеточная лимфома, саркома Капоши, болезнь Кацльмана

Важной особенностью ГВИ, в том числе и вызванной ВПГ, является формирование после первичной инфекции в раннем детском возрасте латентной персистирующей инфекции с сохранением герпесвирусов на протяжении всей жизни в ганглиях чувствительных нервов. Реактивация герпесвирусов в результате снижения иммунореактивности организма и других провоцирующих факторов ведет к возникновению рецидивов с клиническим, субклиническим или асимптоматическим течением заболевания. Чаще реактивация вируса происходит у беременных, пациентов после переливания крови или её компонентов, после трансплантации органов и при других состояниях, связанных с иммунной супрессией.

При отсутствии реактивации герпесвирусы в организме человека существуют в латентном состоянии, при котором вирусный геном находится в транскрипционно инертном виде и экспрессии вирусных протеинов не происходит. Тем не менее, как отмечают некоторые исследователи (Н.Д. Львов, А.В. Мельниченко, 1991; Н.Н. Хахалин, 2000), риск передачи латентной инфекции существует.

При типичном течении инфекции с характерными пузырьковыми высыпаниями на слизистой оболочке или коже больного клинический диагноз устанавливается без каких-либо трудностей. Но в большинстве случаев ВПГ-инфекция протекает асимптоматически или с незначительными симптомами, которые трудно распознаются. До-

вольно часто больные за помощью к врачу обращаются после исчезновения характерных высыпаний (И.И. Мавров, 1998; Н.Д. Львов и соавт., 2000; Mindel, 1994). В этих случаях значительно усложняется постановка правильного диагноза и необходимо применение лабораторных тестов для уточнения этиологии заболевания. Необходимость использования тестов лабораторной диагностики также важна для контроля за течением инфекционного процесса и эффективностью проводимой у пациентов антигерпетической терапии.

Кроме того, известно, что вызываемые герпесвирусами заболевания характеризуются чрезвычайным клиническим полиморфизмом из-за вовлечения в процесс различных органов и тканей, а также ГВИ может протекать как оппортунистическая инфекция, т.е. утяжелять течение основного патологического процесса вследствие поражения части лимфоцитов и формирования вторичного иммуносупрессивного состояния (Griffiths, Volpi, 1997).

В каких случаях ЛОР-патологии необходимо заподозрить герпесвирусную инфекцию? В отечественной литературе имеются единичные сообщения по этому вопросу. В частности, в материалах X съезда отоларингологов Украины (май, 2005 г.) представлены лишь 3 статьи этого направления: В.И. Попович и соавторы «Перебіг епіфарингіту у осіб з хронічною EBV-інфекцією»; Ю.А. Молочек и соавторы «Актуальные вопросы клинического течения Эпштейна-Барра вирусной инфекции в практике детских отоларингологов» и С.К. Боечко, В.И. Лозицкая «Патология ЛОР-органов при рецидивирующем простом герпесе».

Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет классификация групп больных, страдающих рецидивирующим герпесом с проявлениями в ЛОР-органах, представленная в последней статье. Авторы считают необходимым углубленное вирусологическое обследование на предмет подтверждения герпесвирусной инфекции у следующих пациентов:

1) с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей и выраженными геморрагиями на слизистой оболочке;

2) с частыми рецидивирующими острыми респираторными инфекциями, которые не были верифицированы вирусологически;

3) с невралгиями и ганглионитами, сопровождающимися нарушением функции ЛОР-органов;

4) с хронической формой нейроинфекции предположительно герпетической этиологии.

По нашему мнению, в группу лиц, нуждающихся в подтверждении либо исключении у них герпесвирусной этиологии патологического процесса, необходимо включать также пациентов, обследующихся у отоларинголога по поводу длительного субфебрилитета неустановленной этиологии, с синдромом полилимфаденопатии и синдромом хронической усталости. Часто эти синдромы не укладываются в клинику тонзиллогенной интоксикации. Особое внимание должно быть уделено больным с тяжело протекающим острым фаринголарингитом и частыми рецидивами хронического ларингита. В последней группе установленная персистенция герпесвирусной инфекции является, по-видимому, оппортунистической, т.к. в 65% случаев, по нашим данным и данным литературы (Г.Ф. Иванченко, Е.В. Демченко, 2005), были определены вирусно-бактериальные ассоциации на слизистой оболочке гортани.

Для лабораторной диагностики ВПГ-инфекции применяют различные методы:

- цитологическое исследование вирусиндуцированных изменений в клетках из очагов поражения;

- обнаружение вирионов ВПГ с помощью электронной микроскопии;

- выявление клинических изолятов ВПГ с помощью культуры клеток;

- определение вирусных антигенов в реакциях МФА и ИФА;

- детекция ДНК ВПГ с помощью ПЦР;

- исследование специфического иммунного ответа к ВПГ с помощью ИФА.

Основными требованиями, предъявляемыми к лабораторным методам диагностики, являются следующие: высокая чувствительность и специфичность, быстрота и простота постановки, хорошая воспроиз-

димось метода, невысокая стоимость проведения анализа.

Каждый из приведенных диагностических методов имеет как определенные достоинства, так и недостатки.

*Световая микроскопия.* Непосредственное исследование клеток из очагов поражения. При этом обнаруживается характерный их метаморфоз – появление гигантских многоядерных клеток с внутриядерными эозинофильными включениями. Метод в настоящее время не используется, т.к. имеет низкую чувствительность и специфичность. Результат определения в значительной степени зависит от количества клеток, полученных для цитологического анализа.

*Электронная микроскопия.* С помощью этого метода у больных ГВИ в клинических образцах обнаруживаются характерные по морфологии вирусные частицы. Преимуществом способа является его экспрессность (2-3 часа), недостатком – низкая специфичность, невозможность типового дифференцирования ВПГ. Однако последний недостаток может быть устранен при наличии типоспецифических сывороток для использования с помощью иммунной электронной микроскопии. Недостатком является также необходимость иметь дорогостоящее оборудование (электронный микроскоп) и специально подготовленный для работы на нем персонал.

*Культуральный метод* для обнаружения и идентификации вируса, по заключению многих исследователей, остается «золотым стандартом». Все  $\alpha$ -герпесвирусы хорошо реплицируются в различных первичных и перевиваемых линиях клеток человеческого и животного происхождения. Для выделения на них ВПГ может быть использован различный биоматериал от больных: везикулярная жидкость, цельная кровь, сыворотка или плазма крови, слюна, слезная и спинномозговая жидкости, материнское молоко, слизь из поражённых органов, а также биопсийный материал.

Цитопатические изменения в инфицированных ВПГ клетках характеризуются либо появлением гигантских многоядерных клеток, либо образованием клеточных конгломератов в виде «бляшек» без слияния цитоплазмы.

*Культуральный метод* – высокоспецифичный (практически 100%) и высокочувствительный (более 90%), позволяет осуществлять типовую дифференциацию изолятов в реакции нейтрализации на культуре клеток, определять их инфекционную активность и антивирусную чувствительность. Однако его недостатками являются: зависимость от сроков взятия материала (в ранние сроки от начала заболевания), необходимость проведения 2-3 пассажей для закрепления инфекционной активности изолята с целью его последующей идентификации с помощью типоспецифических сывороток к ВПГ. Таким образом, метод трудоемкий, не является экспрессным, при этом необходимо помнить, что отрицательный результат вирусовыделения не исключает наличия инфекции (Griffiths, Volpi, 1997).

Метод выделения ВПГ на куриных эмбрионах и в организмах лабораторных животных чаще применяется в экспериментальных исследованиях.

Широкое распространение в последние годы приобрели методы детекции герпесвирусных антигенов с помощью флуоресцирующих антител (МФА) и иммуноферментного анализа (ИФА), основанные на реакции специфического связывания антиген-антитело. В МФА используются флуоресцирующие иммуноглобулины, а в ИФА – моноклональные антитела к ВПГ. Некоторые свойства, характеризующие эти методы, приведены в табл. 2.

В практической работе широко применяются серологические методы иммуноферментного определения специфических антител классов Ig M и Ig G к ВПГ. В коммерческих тест-системах последних лет обычно используются рекомбинантные белки ВПГ или синтетические пептиды. Выявление в крови у больных IgM расценивается как показатель острого течения ВПГ-инфекции, а IgG – перенесенное в прошлом заболевание (Ashley et al., 1998).

В Украине для диагностики ВПГ-инфекции применяются иммуноферментные тест-системы НПК «Диапроф-Мед» «DIA-HSV 1/2 Ig M» и «DIA-HSV 1/2 Ig G» для определения антител классов IgM и IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2-го типов. С

помощью этой тест-системы может быть осуществлён не только качественный, но и полуколичественный анализ в единицах

DIA Units (DU) по приведенной в инструкции по использованию тест-системы формуле.

Таблица 2

Лабораторные тесты для обнаружения антигена вируса простого герпеса\*)

Чувствительность	Обнаружение антигена ВПГ с помощью	
	МФА	ИФА
	> 80%	не менее 90%
Специфичность	высокая	высокая
Длительность выполнения	1-2 ч	3-3,5 ч
Преимущества	относительно недорогие; простота выполнения; возможность автоматизации и количественного учёта результатов исследования; доступность оборудования;	
	люминесцентный микроскоп	иммуноферментный анализатор
Недостатки	недостаточная чувствительность (не 100%)	
	зависимость результатов теста от наличия в мазке вирус-инфицированных клеток;  отсутствие возможности типоспецифической дифференциации ВПГ-1 и ВПГ-2	требуется, по данным электронной микроскопии, содержание в образце инфекционного материала не менее $10^6$ вирусных частиц;  не все современные тест-системы позволяют дифференцировать типы ВПГ

Примечание \*): показатели таблицы составлены на основании данных Р.Д. Гриффитса (1997), Н.Д. Львова и соавторов (2000).

Наиболее чувствительным методом, позволяющим выявлять ДНК вируса простого герпеса, является полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на идентификации генома вируса. С её помощью можно определить 0,01нг ДНК, что по сравнению с изоляцией вируса на культуре клеток превышает чувствительность последней в среднем не менее чем в 100 раз (Walf, 2005).

В настоящее время ПЦР широко применяется в клинической практике, особенно с целью выявления персистирующих, латентных и рецидивирующих форм заболевания, а также для уточнения сомнительных результатов серологических исследований (Malkin, 2005; Walf, 2005).

С помощью ПЦР возможна детекция ВПГ в различных биологических жидкостях и в биопсийном материале, в том числе в фиксированных формалином тканях. Важным свойством ПЦР является получение результатов анализа в течение одного рабочего дня.

Наряду с высокой чувствительностью и специфичностью метода, недостатком его является низкая прогностическая ценность. Это связано с тем, что в случае выявления латентного вируса он не всегда может привести к развитию заболевания, и только отрицательный результат ПЦР имеет 100% диагностическое значение. В связи с этим очевидна важность развития и более широкого использования количественных методов ПЦР.

Учитывая то, что значительная часть клинически здоровых лиц имеют антитела к ВПГ, их обнаружение не может рассматриваться как единственный критерий для постановки диагноза. К тому же, существенным недостатком иммуноферментного анализа является не только указанная в табл. 2 невозможность дифференциации между 1-м и 2-м типом ВПГ, но и между первичной и рецидивирующей инфекцией. Выявляемые в сыворотке специфические антитела к герпесвирусам не обеспечивают санацию организма от вирусов и не предупреждают рецидива заболевания.

В дифференциации острой инфекции от реактивации хронической важным тестом служит определение вирусных антигенов (ИФА, МФА) и ДНК вирусов (ПЦР). Наиболее перспективны разработка и использование в практике количественного определения вирусной ДНК.

В связи со сложностью дифференциальной диагностики состояния «инфицированности» и состояния «болезни» следует проводить диагностический поиск по следующему алгоритму:

1 – определение специфических антител классов М и G методом ИФА и антиге-

нов к ВПГ методом ИФА или исследование ДНК методом ПЦР (кровь, ликвор, секреты слизистой оболочки);

2 – изучение вышеуказанных антител в динамике через 2-3 недели (появление во второй сыворотке IgM или увеличение титров IgG в 4 раза и более является показателем острой герпесвирусной инфекции);

3 – исследование ДНК методом ПЦР для установления прогноза болезни и эффективности лечения (уровень специфических антител не отражает степень виремии).

В заключение следует отметить, что применяемые в настоящее время различные диагностические методы для установления этиологического диагноза варьируют по основным критериям – специфичности и чувствительности, они имеют как свои достоинства, так и недостатки. В каждом конкретном случае выбор диагностических методов во многом зависит от форм и тяжести течения ГВИ, а также профессиональной осведомленности врача в отношении современных методов диагностики. Тактика ведения больных ГВИ во многом зависит от правильной интерпретации результатов анализа.

1. Боечко С.К., Лозицкая В.И. Патология ЛОР-органов при рецидивирующем простом герпесе // Материалы X съезда оториноларингологов Украины (Судак, 21-23 мая 2005 г.). – К., 2005. – С. 446-447.
2. Иванченко Г.Ф., Демченко Е.В. Современное направление в исследовании и лечении больных хроническим гиперпластическим ларингитом // Материалы X съезда оториноларингологов Украины (Судак, 21-23 мая 2005 г.). – К., 2005. – С. 178-179.
3. Львов Н.Д., Мельниченко А.В. Вирусы герпеса человека 6, 7 и 8-го типов – новые патогены семейства Herpesviridae // Вопр. вирусологии. – 1991. – №3. – С. 105-111.
4. Львов Н.Д., Мельниченко А.В., Львов Д.Н., Никитина А.А. Лабораторная диагностика герпесвирусной инфекции человека // Вопр. вирусологии. – 2000. – №4. – С. 7-13.
5. Мавров И.И. Герпесвирусная инфекция, клинические формы, патогенез, лечение: Руководство для врачей. – Харьков: Факт, 1998. – 80 с.
6. Марцевский В.Ф., Руденко А.О., Щербинська А.М. Інфекційні хвороби в Україні на рубежі двох століть // Сучасні інфекції. – 1999. – №2. – С. 18-23.
7. Молочек Ю.А., Яковлева Н.Ю., Мостовенко Р.В. Актуальные вопросы клинического течения Эпштейн-Барр вирусной инфекции в практике детских отоларингологов // Материалы X съезда оториноларингологов Украины (Судак, 21-23 мая 2005 г.). – К., 2005. – С. 45-46.
8. Попович В.І., Дикий О.Б., Матейко Г.Б. Перебіг епіфарингіту у осіб з хронічною EBV-інфекцією // Материалы X съезда оториноларингологов Украины (Судак, 21-23 мая 2005 г.). – К., 2005. – С. 473-474.
9. Хахалин Н.Н. Герпесвирусные инфекции в амбулаторной практике // Инфекции и антимикробная терапия. – 2000. – Т. 2, №2. – С. 1-9.
10. Ashley R.L., Wu L., Piscering J.W. et al. Premarket evaluation of a commercial glycoprotein G – based enzyme immunoassay for Herpes simplex

- virus type – specific antibodies // J. Clin. Microbiol. 1998; 36:294-295.
11. Griffiths P.D., Volpi A. Progress with diagnostic tests and vaccines for alpha-herpesviruses // Recommendations from the IHMF Management Strategies Workshop and 5<sup>th</sup> Annual Meeting. – 1997. – P. 1-68.
  12. Kimberlin D.W. Neonatal HSV infections: the Global Picture // Herpes. - 2004. - 11:2. - P. 31-32.
  13. Kimberlin D.W. Herpes Simplex Virus Meningitis and Encephalitis in Neonates // Herpes. – 2004. – N11, Suppl. 2. – P. 65A-76A.
  14. Malkin J-E. The continuing spread of HSV infection. Worldwide epidemiology // Herpes. – 2005. – 12:3. – P. 77.
  15. Mindel A. Genital herpes-the “forgotten epidemic” // Herpes. – 1994. – V.1, N2. – P. 39-48.
  16. Sandström E., Whitley R.J. The increasing importance of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and the human Herpesviruses types 6, 7 and 8 // Recommendations from the IHMF Management Strategies Workshop and 3<sup>rd</sup> Annual meeting. – 1995. – P. 1-29.
  17. Sandström E., Whitley R. J. Genital and orofacial Herpes simplex virus infections – clinical implications of latency // Recommendations from the IHMF Management Strategies Workshop and 6<sup>th</sup> Annual meeting. – 1998. – P. 1-36.
  18. Walf A. Frequency of HSV shedding as measured by PCR // Herpes. – 2005. – 12:3. – P. 77.

Поступила в редакцію 23.03.07.

© Г.И. Гарюк, Л.А. Панченко, Е.А. Куликова, Н.Г. Попова, 2007

#### ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГЕРПЕС ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ЛЮДИНИ В ПРАКТИЦІ ОТОЛАРИНГОЛОГА

*Гарюк Г.І., Панченко Л.А., Куликова Є.А.,  
Попова Н.Г. (Харків)*

##### *Резюме*

Розглядаються методи діагностики персистоючої герпес вірусної інфекції, які застосовуються в теперішній час, в тому числі у ЛОР-органах. Більш детально описані експресні методи діагностики вірусів простого герпеса (ВПГ) 1-2-го типів і вірусу Епштейна-Барра (ВЕБ), що частіше діагностується у ЛОР-хворих. До цих методів відноситься детекція герпес вірусних антигенів методом флуоресціюючих антитіл (МФА) та імуноферментним аналізом (ІФА) і визначення специфічних антитіл класів IgM та IgG до ВПГ і ВЕБ також імуноферментним методом (ІФА). Найбільш чутливим в даний час вважається молекулярно біологічний метод детекції фрагментів ДНК герпес вірусів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Зазначено переваги та недоліки цих методів, а також визначено групи ЛОР-хворих, яким показано обстеження на персистенцію герпес вірусної інфекції.

#### THE HERPES LAB DIAGNOSTICS IN HUMAN IN THE ENT-PRACTICE

*Garyk G.I., Panchenko L.A., Kylikova E.A.,  
Popova N.G. (Kharkov)*

##### *Summary*

Considering the methods of long-lasting herpes diagnostics which are used nowadays also in the ENT – organs. More detailed described the expressive diagnostics methods of simple herpes virus of 1-2 type and Epstein-Barr virus which are often diagnosed in the ENT-patients. These methods are: herpes virus antigens detection with the method of fluorescent antibodies and immune-enzyme analysis. The most sensible is the method of molecular and biological fragments DNA herpes virus detection with the help of polymerization chain reaction. It was said about pro and contras of these methods, and also determined the ENT-patient groups who are to do the herpes persistence.