

9-10. Тема занятия: Лабораторная диагностика инфекций, вызванных вирусами герпеса

Цель занятия: Освоить методы лабораторной диагностики вирусных инфекций TORH-комплекса..

Перечень знаний и практических навыков:

- Усвоить теоретические основы серологических методов диагностики.
- Знать диагностику герпесвирусной инфекции.
- Освоить техническое выполнение метода
- Уметь интерпретировать результаты определения в сыворотке крови антител классов М и G к антигенам вируса Эпштейна-Барр.

Вирус герпеса

Герпесвирусы широко распространены в человеческой популяции, они пантропны, способны поражать практически все органы и системы организма хозяина, вызывая латентную, **острую** и хроническую формы инфекции. В настоящее время известно 8 антигенных серотипов вирусов герпеса: вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типа, ветряной оспы (опоясывающего герпеса), цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирусы герпеса человека 6, 7 и 8-го типов.

(1) *Вирус простого герпеса 1-го типа* (ВПГ-1) ассоциирован с лабиальным герпесом, герпесом кожи и слизистых оболочек, офтальмогерпесом, пневмонитами, генитальным герпесом, герпетическим энцефалитом.

(2) *Вирус простого герпеса 2-го типа* (ВПГ-2) ассоциирован с генитальным герпесом и неонатальным герпесом.

(3) *Вирус ветряной оспы* (опоясывающего герпеса, ВВО-ОГ) ассоциирован с ветряной оспой и опоясывающим герпесом.

(4) *Вирус Эпштейна-Барра* (ВЭБ) ассоциирован с назофарингиальной карциномой, инфекционным мононуклеозом, лимфомой Беркитта, волосатой лейкоплакией.

(5) *Цитомегаловирус* (ЦМВ) ассоциирован с врожденными поражениями ЦНС, ретинопатиями, пневмонитами, гепатитами, сиаладенитами.

(6) *Вирус герпеса человека 6-го и 7-го типов* (ВГЧ-6:ВГЧ-6А, ВГЧ-6Б; ВГЧ-7) - лимфотропные вирусы; предполагают этиологическую связь ВГЧ-6Б с внезапной экзантемой, а ВГЧ-7 с синдромом хронической усталости.

(7) *Вирус герпеса человека 8-го типа* (ВГЧ-8) ассоциирован с саркомой Капоши у ВИЧ-серонегативных людей, саркомой Капоши, ассоциированной с ВИЧ-инфекцией и СПИДом, а также лимфопролиферативными заболеваниями: многоочаговое заболевание Кастлемана, лимфомой первичного экссудата;

Диагностика герпесвирусной инфекции осуществляется с помощью классического вирусовыделения на чувствительных клеточных культурах, иммунофлюоресцентным и серологическим методами, проведением вольвокольпоцервикоскопии, использованием современных молекулярно-биологических методов (ПЦР, ЛЦР, дот-гибридизация), что позволяет диагностировать всю группу герпесвирусов, включая ВГЧ-6, ВГЧ-7 и ВГЧ-8 типы. Многие исследователи подчеркивают важную роль одновременного использования нескольких методов диагностики.

В качестве скринингового метода при диагностике герпесвирусной инфекции рекомендуется использовать метод ПЦР, иммуноферментный анализ (ИФА) и реакцию иммунофлюоресценции (РИФ), а в качестве подтверждающего - метод выделения герпесвирусов на чувствительных клеточных культурах.

Вирусологический метод является «золотым стандартом» в диагностике герпесвирусной инфекции. Отличительной особенностью данного метода является высокая степень достоверности полученных результатов, а также высокая чувствительность (85-100%) и специфичность (100%), возможность получения чистой культуры возбудителя для его дальнейшего изучения, в частности испытания чувствительности к противовирусным препаратам; недостатком - длительность проведения (от 2 до 5-14 дней). Кроме того, этот метод недоступен большинству медицинских учреждений, так как культивирование с использованием клеточных культур является процессом трудоемким, дорогостоящим, а также требующим высокой квалификации персонала. Чувствительность метода зависит от времени, прошедшего с момента забора материала до посева, от качества забора материала, условий транспортировки, от качества используемых сред и реагентов.

ПЦР-диагностика ВПГ-1,2. (1) В острой фазе вирусы простого герпеса паразитируют в эпителиальных клетках слизистых оболочек и кожи, вызывают типичные (и атипичные) клинические проявления. Среди атипичных возможны бессимптомные формы. При первичной инфекции ВПГ 1, 2 обнаруживается методом ПЦР в пузырьках (или в трещинах при атипичном течении) максимум в течение 7 дней после первых проявлений. У носителей во время рецидивов – до 4-х дней. При сниженном иммунитете – до 21 дня.

ПЦР-диагностика ЦМВ. Биологическим материалом для ПЦР-исследований могут быть: кровь, ликвор, моча, слюна, мокрота, грудное молоко, соскобы (урогенитальные, из зева), сперма, лаваж, биоптаты, в зависимости от формы заболевания. Для беременных адекватной пробой для ПЦР-исследования является соскоб из цервикального канала (при положительном результате – угроза плоду).

ИФА-диагностика ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ. Необходимо помнить: исследование сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антител к герпесвирусам поможет установить, есть ли носительство и фазу заболевания (первичный острый процесс, латенция или вторичное обострение, - рецидив).

Первичное заражение. При первичном заражении на 5-7 день вырабатываются IgM, через 10-14 дней – низкоавидные IgG, затем постепенно авидность IgG возрастает и они становятся высокоавидными (термин «авидность» означает степень сродства антител к антигенам и, соответственно, силу связывания антител с антигенами). IgM исчезают через 1 месяц, низкоавидные IgG – через 1-3 месяца, а IgG (поздние, высокоавидные) циркулируют в крови носителя пожизненно. Так как IgM вырабатываются обычно только при первичной инфекции, то и в лабораторной диагностике они являются маркерами первичной герпесвирусной инфекции. Из-за низкой специфичности IgM они могут перекрестно реагировать (с ревматоидным фактором и др.) и вызывать появление ложноположительных результатов. Для исключения ошибки необходимо проверить наличие низкоавидных IgG или повторить исследование IgM через 2 недели (при развитии первичного процесса должны вновь выявиться IgM и появиться низкоавидные IgG). Если низкоавидные IgG не появились, а IgM выявились снова, то этот положительный результат надо считать ложным. Наиболее специфичными маркерами первичной

герпесвирусной инфекции являются низкоавидные IgG. Они никогда не вырабатываются при повторном заражении или рецидиве. Тест на авидность IgG дает информацию о том, выявились ли IgG и какие выявились IgG – низкоавидные или высокоавидные. Низкоавидные IgG более специфичные антитела, чем IgM, поэтому при использовании теста на авидность IgG не возникает проблем с ложноположительными результатами.

Рецидив и реинфекция. Активация герпесвирусной инфекции у носителей (рецидивы) и реинфекция сопровождаются: (1) появлением и нарастанием титров IgG к предранним белкам вирусов (всегда), (2) нарастанием в 2-4 раза титра имеющихся поздних, высокоавидных IgG (не всегда). IgG к предранним белкам вирусов вырабатываются в ответ на самое начало развития вирусного цикла в организме человека, на неструктурные предранные белки. Они появляются на 5-7 день активации вирусной инфекции и циркулируют в крови 1-2 месяца после наступления ремиссии. Это очень специфичные антитела, поэтому при их выявлении не возникает ложноположительных результатов. IgG к предранним белкам вирусов являются однозначными маркерами активности вирусной инфекции. Они вырабатываются как при первичной острой инфекции, так и во время рецидива и реинфекции. Количество поздних IgG у носителей может варьировать в зависимости от стадии заболевания, от состояния иммунной системы пациента вообще и на момент обследования в частности. Например, при наличии иммуносупрессии, которую может вызывать длительное течение хронической вирусной инфекции, во время рецидива количество поздних IgG совсем не увеличивается, или увеличивается, но не в 4 раза, как при классическом иммунном ответе на рецидив. Поэтому количественный показатель IgG далеко не всегда обладает диагностической ценностью, даже в динамике.

Выводы. Для вирусоносителей единственный надежный тест для определения активности герпесвирусов это выявление IgG к предранним белкам вирусов (полуколичественно). Появление их в любом титре свидетельствует об активности вирусной инфекции. Увеличение титра через 1-3 недели свидетельствует о развитии рецидива, а уменьшение – о наступлении ремиссии. Выявление поздних IgG при отсутствии IgG к предранним белкам вирусов свидетельствует о спокойном носительстве, латентной фазе. Выявление IgM и низкоавидных IgG, предранних IgG при отсутствии поздних IgG, - свидетельствует о первичном инфекционном процессе. Отсутствие поздних IgG, IgM и IgG к предранним белкам герпесвирусов, то есть серонегативность в отношении данных вирусов, означает отсутствие как носительства, так и развития инфекции.

Лабораторная диагностика и интерпретация результатов определения в сыворотке крови антител классов М и G к антигенам вируса Эпштейна-Барр (EBV/ВЭБ). ВЭБ относится к наиболее распространенным герпесвирусам, носительство в различных регионах достигает 100%. Однако актуальной является лабораторная диагностика данного вируса при дифференциальной диагностике инфекционного мононуклеоза, а также в поисках этиологии некоторых кардиологических, онкологических и др. патологий. Острая фаза мононуклеоза характеризуется выявлением вируса Эпштейна-Барр методом ПЦР из мазка из зева. Однако наиболее точно выяснить стадию заболевания или носительство можно с помощью метода ИФА. В настоящее время различают 3 диагностически значимых антигена EBV – ранний (EA), капсидный (VCA) и ядерный (EBNA). Определяя антитела к данным антигенам, а именно, - (1) IgM, IgG к VCA, (2) IgG к EA и (3) IgG к EBNA, можно диагностировать стадию инфекции EBV:

первичную, прошедшую (паст-инфекцию) и реактивацию. Отсутствие инфицирования - VCA: IgM (-) IgG (-); EA IgG (-); EBNA IgG (-); очень ранняя первичная инфекция - VCA: IgM (+) IgG (-); EA IgG (-); EBNA IgG (-); ранняя первичная инфекция - VCA: IgM (+) IgG (+); EA IgG (+); EBNA IgG (-); поздняя первичная инфекция - VCA: IgM (+/-) IgG (+); EA IgG (-/+); EBNA IgG (+); паст-инфекция - VCA: IgM (-) IgG (+); EA IgG (-); EBNA IgG (+); реактивация - VCA: IgM (+/-) IgG (+); EA IgG (+); EBNA IgG (+). Наиболее адекватно эти маркеры выявляются с помощью тест-систем ВСМ производства США (высокая чувствительность и воспроизводимость результатов).

Рекомендуется определение всех упомянутых серологических маркеров в комплексе, так как это повышает вероятность постановки точного диагноза и дает возможность выбора адекватной терапии. Особую трудность представляет диагностика ВЭБ-инфекции у иммунокомпрометированных пациентов; в этом случае серологический профиль может быть сильно искажен и непоказателен. Для диагностики ВЭБ-инфекции параллельно с определением серологических маркеров целесообразно выявление ДНК возбудителя методом ПЦР в крови или другом биоматериале (мазки из зева при инфекционном мононуклеозе). Для постановки клинического диагноза необходимо сопоставлять результаты серологического тестирования с результатами других анализов, симптоматикой и анамнезом пациента.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Вирус герпеса
2. Лабораторная диагностика инфекций, вызванных вирусами герпеса.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных методов диагностики вирусных инфекций.
2. Записать интерпретацию результатов диагностики инфекций, вызванных вирусами герпеса.

Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

1. Вирусы представляют собой совершенно особые формы жизни. Принципиальным отличием вирусов от других возбудителей (бактерий, хламидий) является:

- а) Очень малые размеры
- б) Неспособность культивироваться на искусственных питательных средах
- в) Отсутствие молекул с макроэргическими связями (собственных источников энергии)
- г) Облигатный внутриклеточный паразитизм
- д) Паразитизм на генетическом уровне

2. В настоящее время в качестве экспресс-методов диагностики вирусных инфекций все шире используются методы, позволяющие обнаружить в исследуемом материале следовые количества нуклеиновых кислот. К таким методам относится:

- а) ИФА
- б) РИА
- в) ИЭМ
- г) ПЦР
- д) РИФ

3. Лаборатория диагностического центра получила современную тест-систему для выявления TORCH-инфекции, которая дает возможность диагностировать : 1) токсоплазмоз, 2) рубиинфекцию, 3) цитомегаловирусную инфекцию, 4) герпес-инфекцию . Какие из названных заболеваний вызываются вирусами?

- а) Рубиинфекция, цитомегаловирусная инфекция, герпес-инфекция
- б) Рубиинфекция, герпес-инфекция, токсоплазмоз
- в) Цитомегаловирусная инфекция, герпес-инфекция, токсоплазмоз
- г) Токсоплазмоз
- д) Все перечисленные в условии.

1. При серологическом методе диагностики вирусных заболеваний исследуемую сыворотку двукратно разводят в лунках планшета. Вносят вирусный диагностикум и взвесь эритроцитов. Как называется такая реакция?

- а) Реакция гемагглютинации
- б) Реакция пассивной гемагглютинации
- в) Реакция обратной пассивной гемагглютинации
- г) Реакция торможения гемагглютинации
- д) Реакция связывания комплемента

2. Для обнаружения вирусного антигена в исследуемом материале применяют реакцию с использованием антительного эритроцитарного диагностикума. Как называется эта реакция?

- а) РПГА
- б) РТГА
- в) РОПГА
- г) РГА
- д) РГ

3. При вирусологическом методе диагностики инфекционных заболеваний возбудитель выделяют путем культивирования его *in vitro* в культуре клеток с питательной средой. Укажите эту питательную среду.

- а) Среды для контроля стерильности (СКС)
- б) Среда 199
- в) Раствор Версена
- г) Среда Вильсон-Блера
- д) Среда Мюллера

4. При микроскопии монослой клеток, зараженного предположительно вирусом, содержащим материал и обработанного специфической сывороткой, меченной флюорохромом, обнаружили изумрудно-зеленое свечение в околоядерной зоне клеток. Какой это вид микроскопии?

- а) Темнопольная

- б) Фазовоконтрастная
- в) Иммерсионная
- г) Люминесцентная
- д) Аноптральная

5. Исследуемый материал обработали специфической сывороткой, выдержали 1 час, отцентрифугировали, из осадка приготовили препарат и промикроскопировали с целью обнаружения вирусов. Какой это вид микроскопии?

- а) Электронная
- б) Иммерсионная
- в) Фазовоконтрастная
- г) Иммуноэлектронная
- д) Аноптральная

6. Вирусный антиген и специфическое антитело, помещенные на определенном расстоянии друг от друга в агаровом геле, диффундируют и образуют при встрече друг с другом белые полосы. В случае несоответствия антигена и антитела полосы не появляются. Назовите эту реакцию.

- а) Реакция агглютинации на стекле
- б) Реакция агглютинации Грубера
- в) Реакция преципитации
- г) Реакция иммуносорбентного анализа на твердой фазе
- д) Реакция нейтрализации

7. Вирусологический метод включает: индикацию и идентификацию вируса в исследуемом материале. Как можно подтвердить наличие вируса в исследуемом материале?

- а) Диффузным ростом вирусов в питательной среде
- б) Пристеночным ростом вирусов в питательной среде
- в) Отсутствием роста вируса в питательной среде
- г) Изменением цвета питательной среды (ЦП)

д) Гибелью клеток (ЦПД), нарушением метаболизма клеток и отсутствием изменений в питательной

Ситуационная задача

У студента, госпитализированного в инфекционную больницу на вторые сутки заболевания, врач заподозрил инфекционный мононуклеоз. Результат какого лабораторного исследования подтвердит у пациента диагноз в день его госпитализации?