

11. Тема занятия: Лабораторная диагностика вирусных урогенитальных инфекций.

Цель занятия: Освоить методы лабораторной диагностики вирусных урогенитальных инфекций (генитальный герпес).

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать порядок подготовки оборудования, материала и реактивов для проведения исследования
- Освоить техническое выполнение метода
- Уметь интерпретировать результаты.

Генитальный или половой герпес относится к вирусным заболеваниям. Эта болезнь является одной из самых распространенных среди инфекций, которые передаются половым путем. Среди населения планеты 20% являются носителями данного типа герпеса, из них всего 5% населения имеет выраженные клинические признаки, у остальных 15% заболевание протекает без выраженных симптомов. Встречается генитальный герпес в равной мере как у женщин, так и у мужчин. Именно этот недуг оказывает изменения в репродуктивной системе человека: у женщин повышается риск самопроизвольных выкидышей, внутриутробной гибели плода, он вызывает различные заболевания у новорожденных. Существует мнение, что такие заболевания как рак шейки матки и предстательной железы в своей этиологии имеют вирус герпеса.

Этиология

В большинстве случаев к развитию генитального герпеса приводит заражение вирусом герпеса человека второго типа (ВГЧ-2). Описаны также случаи развития заболевания, вызванного Herpes labialis - ВГЧ-1. Заражение ВГЧ-2 происходит в основном при половых контактах. Вирус второго типа может передаваться при поцелуях, при пользовании общей посудой. Заражение возможно также при использовании общих предметов гигиены, полотенец и так далее.

Источником герпетической инфекции является человек на любой стадии заболевания - при бессимптомном носительстве и в фазе высыпаний.

Основные факторы риска:

- неразборчивость в выборе половых партнеров;
- низкий уровень жизни;
- вирус передается через поцелуи и совместное пользование личными вещами (зубная щетка, ложка);
- возможно заражение при орально-генитальных сексуальных контактах;
- возможно заражением вирусом герпеса в туалете.

Дети могут заразиться генитальным герпесом воздушно-капельным путем, контактно-бытовым (через предметы, загрязненные выделениями больного человека: слюной, мочой), внутриутробно (через кровь матери). Заражение ребенка может произойти при прохождении его через инфицированные родовые пути матери во время родов.

Генитальный герпес у мужчин в большинстве случаев поражает мочеполовую систему, когда у женщин это канал, прилегающий к шейке матки. Причем часто он имеет бессимптомное течение.

Чтобы установить точный и полный диагноз необходимо учитывать особенности клинического развития болезни и использовать комплекс адекватных методов

обследования. В каждом конкретном случае недопустимо устанавливать диагноз «генитальный герпес» только при визуальном осмотре и наличии везикул (мелких кожных пузырьков, содержащих жидкость). Подобные эрозивно-язвенные высыпания могут быть обусловлены и другими возбудителями (стрептококковой, стафилококковой, микотической, папилломавирусной инфекцией) а также наблюдаться при сифилисе, трихомониазе, аллергических реакциях и некоторых дерматозах. Более того, визуальная диагностика невозможна при глубоком поражении тканей и органов, при бессимптомном развитии заболевания.

Вирус простого герпеса (ВПГ) является одним из немногих вирусов, для выявления этиологической роли которого при инфекционных заболеваниях используются все лабораторные диагностические реакции – от цитологических исследований до молекулярно-биологических методов верификации. Одновременно необходимо проводить обследование на наличие сопутствующих возбудителей (хламидий, микоплазм, уреоплазм, простейших и других бактерий, вирусов).

Материал исследования - биологический материал из очага инфекции

Для постановки диагноза **генитального герпеса (ГГ)** необходимо исследовать материал, полученный непосредственно из полового тракта, а также биологические жидкости и секреты организма.

Для выделения вируса герпеса с целью диагностики герпетического заболевания используются:

содержимое герпетических пузырьков, кровь, слюна, спинномозговая жидкость, биоптаты шейки матки и других органов, цервикальный секрет, уретральные пробы, эякулят, секрет предстательной железы, соскобы и смывы с тканей и органов, моча, слизь, мазки-отпечатки с высыпаний и т.д

Что ищут в процессе исследования

Лабораторная диагностика заболеваний, вызванных ВПГ включает комплекс методологических подходов, цель которых состоит в обнаружении маркеров герпесвирусной инфекции, среди которых:

- геном вируса
- вирусные белки (антигены)
- инфекционные вирусные частицы
- цитопатогенное действие на клетки
- специфический иммунный ответ организма больного (его антитела)

Методы лабораторной диагностики

До недавнего времени лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций (ГВИ) производилась только в специализированных вирусологических центрах. Появление новых методов исследования 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.

В практической деятельности наиболее доступными методами диагностики являются:

- **молекулярно-биологические** – детекция вирусного генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- **иммуноморфологические** – выявление антигена ВПГ с помощью прямой и непрямой иммунофлюоресценции (ПИФ и НИФ);
- **серологические** – выявление специфических антител к ВПГ (IgA, IgM, IgG) и антигена методом иммуноферментного анализа (ИФА);
- **вирусологические** – выделение вируса в культуре ткани из клинического материала и его идентификация;
- **цитологические**.

Молекулярно-биологические методы диагностики

К **молекулярно-биологическим** методам относится один из самых перспективных современных методов лабораторной диагностики – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР, позволяет обнаружить единичные копии вирусной ДНК в клетках, биологических жидкостях (кровь, слюна, материал, взятый из уретры или цервикального канала) и биопсированных тканях.

Иммуноморфологические методы

Обнаружение вирусного антигена в клетках и жидкостях организма (клетках осадка мочи, слюны, лейкоцитах крови, мазков-отпечатков с герпетических высыпаний, шейки матки, биопсийного и аутопсийного материала) осуществляют с помощью метода иммунофлюоресценции, иммунопероксидазного и лантанидного методов.

В прямой монофлюоресценции используют антитела, меченные люминесцирующей сывороткой (изотиоционатом флюоресцеина), что позволяет выявить вирусный антиген по свечению клеток в люминесцентном микроскопе. Во втором случае применяют антитела, меченные пероксидазой. Вирусный антиген выявляют в обычном световом микроскопе по окрашиванию антигенсодержащих клеток хромогеном в темно-коричневый цвет. Разрабатываются также лантанидные методы, основанные на амплификации свечения.

Непосредственное выявление **антигена** в клиническом образце указывает на активную репликацию вируса и является методом, конкурирующим по надежности с методом выделения вируса в культуре тканей.

Серологические методы

Обнаружение в крови **антител** к ВПГ-2 не позволяет достоверно судить о наличии у больного ГГ, так как многие используемые коммерческие серологические наборы не способны точно различать антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2 из-за высокого (70%) антигенного сродства обоих типов вируса.

Чувствительность большинства известных ИФА тест-систем для выявления ВПГ-инфекции варьируется в пределах 48–98,7% и зависит от исследуемого материала. Наличие перекрестных антигенных связей между штаммами, принадлежащими к ВПГ-1 и ВПГ-2 и другими типами герпесвирусов, требует определенной осторожности при интерпретации результатов лабораторных исследований.

В этой группе существует еще один метод – так называемый Western blot analysis: тестирование с помощью твердофазного иммунологического анализа электрофоретически

разделенных белков или полипептидов. Метод высокоточен и позволяет дифференцировать антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2.

Окончательные тесты на определение антител к ВПГ-2 должны основываться на детекции ВПГ2-типоспецифического поверхностного антигена – гликопротеина gG1–gG2. Чувствительность и специфичность серологических тестов на его основе при исследовании крови составляют 95–99 и 100% соответственно. В настоящее время типоспецифическая серология используется преимущественно в научно-исследовательских целях и не применяется в широкой клинико-лабораторной практике.

Вирусологическое исследование

Для диагноза заболевания важное значение имеет выделение вируса из пораженных тканей. Выделение вирусов в клеточной культуре включает выявление (индикацию) вируса и последующее его серотипирование. При подозрении на герпетическую инфекцию необходимо проводить многократное вирусологическое исследование материала, отделяемого из мочеполовой системы у пациентов, т.к. отрицательный результат однократного вирусологического исследования не исключает наличие урогенитальной герпетической инфекции. Повторное 2–4-кратное исследование (1 раз в неделю) повышает шанс выделения вируса в 2–3 раза.

Цитологическое исследование

Наиболее доступным, быстрым и дешевым методом исследования является **цитологическое** исследование инфицированного материала на ВПГ. Материалом для цитологического исследования может служить содержимое везикул, соскоб со дна эрозии, слизистой уретры, стенок влагалища, канала шейки матки.

Специальным образом подготовленные образцы исследуют с помощью световой микроскопии. При цитологическом исследовании обнаруживаются многоядерные гигантские клетки с внутриядерными включениями.

Недостатками метода являются низкая чувствительность, сложность дифференциальной диагностики с другими вирусными инфекциями и зависимость от квалификации специалиста, проводящего исследование. Однако этот метод может быть применен как вспомогательное диагностическое средство. Электронная микроскопия в диагностике герпетической инфекции также рекомендована для экспресс-диагностики ВПГ-инфекции.

Выявление противовирусных антител классов М и G

Для подтверждения инфицирования вирусом герпеса определяют уровни специфических иммуноглобулинов Ig, относящихся к различным классам G и M (IgM, IgG), циркулирующих в биологических жидкостях и секретах организма больного (сыворотке крови, ликворе, слюне, слезной жидкости). Выявление специфических противогерпетических антител (IgM, IgG,) чаще всего осуществляют методом иммуноферментного анализа (ИФА). Редко используют классические методы: реакцию нейтрализации, реакцию связывания комплемента вируса герпеса (РСК). Из новых методов следует отметить иммуноблот (western blot) и иммунодот.

Детекция типоспецифических антител позволяет определить наличие и тип герпетической инфекции по наличию М-антител, нарастанию G-антител к одному или двум вирусам. Достоверные результаты получают при исследовании парных сывороток крови

больного, взятых в начале заболевания (3-7 день) и через 10-12 дней. В этом случае удается наблюдать динамику нарастания антител. При вирусных инфекциях лишь четырехкратное и большее повышение титра антител во второй сыворотке имеет диагностическое значение.

IgM детектируются через неделю после заражения. Специфические IgG антитела обычно появляются через 2-3 недели после первичного инфицирования.

Выявление специфических иммуноглобулинов IgM в отсутствии IgG или при 4-кратном увеличении титров специфических IgG в парных сыворотках крови, полученных от больного с интервалом 10-12 дней, свидетельствует о первичном заражении.

Выявление специфических иммуноглобулинов IgM на фоне IgG при отсутствии достоверного роста титров IgG в парных сыворотках говорит об обострении хронической герпетической инфекции.

Выявление титров IgG выше средних является показанием к дополнительному обследованию пациента и выявлению выделения вируса герпеса в средах.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Генитальный герпес. Этиология
2. Патогенез генитального герпеса.
3. Лабораторные методы диагностики генитального герпеса.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

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

Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

1. Специфические методы диагностики герпесвирусной инфекции.
 - а) гемокультура
 - б) ИФА
 - в) ПЦР
 - г) РНГА
 - д) копроуринокультура
2. Основной элемент сыпи при герпетической инфекции.
 - а) папула
 - б) пустула
 - в) везикула
 - г) розеола
 - д) петехиями
3. Клинические формы герпетической инфекции.
 - а) панариций
 - б) колит
 - в) миокардит
 - г) Экзема
 - д) Проктит
4. В каких клетках размножается EBV?
 - а) эпителиоциты
 - б) эритроцитов
 - в) В лимфоциты
 - г) ретикулоцитов
 - д) железистый эпителий
5. Герпетическая инфекция у больных СПИДом:
 - а) протекает только в виде Herpes labialis
 - б) имеет благоприятное течение
 - в) Протекает генерализовано
 - г) заканчивается выздоровлением
 - д) протекает только в виде серозного менингита
6. Механизм передачи герпетической инфекции
 - а) парентерально
 - б) вертикальный
 - в) половой
 - г) трансплантационный
 - д) воздушно-капельный
7. Клинические формы герпетической инфекции.
 - а) менингит
 - б) Herpes labialis.
 - в) Herpes genitalis
 - г) острый ларингит
 - д) язва желудка
8. Характерно для Herpes labialis

- а) вызывается CMV
 - б) всегда сопровождается ринитом
 - в) основной элемент — везикула
 - г) характерно зуд
 - д) остаются рубцы
9. ВПГ2 может протекать в виде:
- а) генитального герпеса
 - б) рака шейки матки
 - в) асептического менингита
 - г) ветряной оспы
 - д) оперузивального лишая
10. Метод ПЦР позволяет выявить:
- а) атипичные моноклеары в крови
 - б) вирус в крови
 - в) антитела к антигенам вируса в крови
 - г) ДНК вируса в крови
 - д) ядерные антигены вируса

Ситуационная задача

Пациентка 27 лет, замужем, обратилась с жалобами на постоянные выделения из половых путей, периодически возникающий зуд и отек наружных половых органов (до 4 – 5 раз в год), невозможность нормальной половой жизни (болезненность), часто возникающие дизурические расстройства. Неоднократно обращалась к урологу и гинекологу, получала антибактериальную и противовоспалительную терапию, местное лечение, но без эффекта. При объективном осмотре выраженной отек и гиперемия наружных половых органов, слизистой влагалища и шейки матки, обильные жидкие выделения без запаха. Матка и придатки не увеличены, безболезненные, своды свободные.

Вопросы:

1. Чем могут быть обусловлены жалобы и выявленные патологические изменения гениталий?
2. Какое обследование следует провести для уточнения диагноза?