

УДК 616.833:616.523-07-08

СОРОКИН Ю.Н.
Ростовский государственный медицинский университет, Россия

ГЕРПЕТИЧЕСКИЕ ПОРАЖЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ. ЛЕКЦИЯ (ВТОРОЕ СООБЩЕНИЕ). ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Резюме. Лабораторная диагностика герпетической инфекции включает вирусологические, микроскопические, молекулярно-генетические, иммунохимические и серологические методы. Наиболее быстрыми и надежными методами диагностики герпетических инфекций являются полимеразная цепная реакция, определение авидности IgG и специфических антител к различным вирусным антигенам. Диагноз герпетического ганглионеврита, вызванного вирусом опоясывающего герпеса, обычно устанавливается на основании клинических данных и проведения лабораторной диагностики не требует.

Ключевые слова: герпес, лабораторная диагностика.

В предыдущей публикации «Герпетические поражения периферической нервной системы: 1. Общее представление и клинические проявления» рассмотрены особенности клинической симптоматики герпетического ганглионеврита в зависимости от стадии развития патологического процесса, локализации и характера герпетических высыпаний.

Диагноз герпетического ганглионеврита, обусловленного вирусом опоясывающего герпеса, обычно устанавливается на основании клинических данных и проведения лабораторной диагностики не требует. В то же время начальные проявления или высыпания в шейной или крестцовой области иногда трудно отличить от вызванных вирусом простого герпеса, а у больных с иммунодефицитом высыпания могут быть нетипичными вследствие их широкой распространенности или хронизации патологического процесса [13, 14].

В общем цель этиологической диагностики герпетических инфекций заключается в следующем:

- выявление наличия вируса;
- определение генома вируса (молекулярно-генетическое исследование);

— идентификация антигенов вируса в различных материалах (иммунофлюоресцентный и иммуноферментный анализ);

— исследование специфических антител в крови и их динамики (серологическая диагностика, иммуноферментный анализ).

Основные методы лабораторной диагностики герпетической инфекции [9]:

1) вирусологические методы:

— выделение вирусов на чувствительных клеточных культурах или культивирование в организме лабораторных животных;

Адрес для переписки с автором:

Сорокин Юрий Николаевич
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29
Ростовский государственный медицинский университет,
кафедра неврологии и нейрохирургии с курсом мануальной
терапии и рефлексотерапии
E-mail: lynxet@ukr.net

© Сорокин Ю.Н., 2015

© «Международный неврологический журнал», 2015

© Заславский А.Ю., 2015

- 2) микроскопические методы:
 - цитологическая диагностика;
 - прямая и иммунная электронная микроскопия;
- 3) молекулярно-генетические (молекулярно-биологические) методы:
 - реакция молекулярной гибридизации;
 - полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- 4) иммунохимические методы (определение вирусных антигенов):
 - метод флюоресцирующих антител — реакция иммунофлюоресценции:
 - метод прямой иммунофлюоресценции;
 - метод непрямой иммунофлюоресценции;
 - прямой и непрямой варианты твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА);
 - прямой и непрямой варианты иммунопероксидазного метода;
- 5) серологические методы (определение антител к вирусам):
 - реакция нейтрализации;
 - реакция торможения гемагглютинации;
 - реакция пассивной гемагглютинации;
 - ИФА;
 - иммунный блоттинг;
 - реакция агглютинации латекса.

Вирусологические методы

Наиболее точными методами подтверждения диагноза герпетической инфекции являются выделение вируса герпеса в культуре клеток с последующим его типированием и выявление антигенов или ДНК вируса герпеса в соскобах с элементов сыпи. При использовании метода культуры клеток вирус выделяют чаще из везикул, чем из эрозий. При первичном поражении вирус обнаруживается в везикулах до 7 дней после первых проявлений, при вторичной активации — до 4 дней, при иммунодефицитных состояниях — до 21 дня.

В целом материалом для исследования является содержимое высыпаний, соскоб эпителиальных клеток, отделяемое носоглотки, кровь, моча, ликвор. Возможен положительный результат при исследовании одного вида материала, при отрицательном — другого.

Тампон с отделяемым везикул в течение 3 дней может быть отправлен в вирусологическую лабораторию для проведения световой или электронной микроскопии полученного материала или в иммунологическую лабораторию для экспресс-диагностики антигенов вируса при помощи метода иммунофлюоресцирующих антител или для обнаружения вирусной ДНК с помощью ПЦР. Метод иммунофлюоресцирующих антител является быстрым методом диагностики и обладает высокой чувствительностью в фазе везикул (90 %).

Метод культуры клеток имеет меньшую чувствительность (60–75 %) вследствие лабильности вирусов и выполняется в течение 1–6 недель в высокоспециализированных центрах. Выделение вирусов герпетической

группы с оценкой их цитопатического действия проводится путем заражения культуры клеток куриного эмбриона или лабораторных животных материалом, полученным от больных (кровь, ликвор, ткань мозга).

Вирус герпеса можно идентифицировать быстрее, чем через 48–96 часов после внесения исследуемого материала в культуру клеток, — за счет применения молекулярно-генетических, иммунохимических или серологических методов. При центрифугировании однослойной культуры клеток с исследуемым материалом значительно ускоряется процесс заражения, что дает возможность обнаружения вирусных антигенов уже через 24 часа [7].

Вирусологические методы диагностики трудоемки, длительны и требуют обязательного подтверждения другими методами. При этом их диагностическая значимость на стадии образования корочек снижается до 27 % [12].

Микроскопические методы

Методы цитологической диагностики являются неспецифическими, чувствительность их составляет около 50 %: при проведении цитологического исследования невозможно дифференцировать вирусы простого герпеса, цитомегаловирус и вирус ветряной оспы в силу их одинаковой морфологии. Такой же недостаток имеет и электронная микроскопия [5].

Молекулярно-генетические методы

Наиболее быстрым и надежным методом диагностики герпетических инфекций является ПЦР, которая более чувствительна, чем выделение вируса герпеса в культуре клеток, особенно при герпетическом поражении центральной нервной системы или в случае получения материала из заживающих эрозий. Определение генома вируса при помощи ПЦР позволяет выявить возбудителя даже тогда, когда его количество невелико, например, при латентной инфекции нервных ганглиев. Активную репликацию вируса отражает наличие генов ранней и поздней транскрипции. С началом лечения ациклическими аналогами нуклеозидов ПЦР становится отрицательной на 5-й день.

В то же время при инфекциях с внутриклеточной локализацией возбудителя с помощью ПЦР затруднительно отличить здоровое носительство с минимальным количеством вируса от проявлений инфекционного процесса с активным размножением вируса. С целью преодоления данной особенности применения метода необходимо проводить исследование с различным заранее заданным уровнем чувствительности пробы.

Иммунохимические методы

Успешное применение методов иммунофлюоресценции для прямого выявления вируса в клиническом материале возможно лишь в случае содержания в нем достаточно большого числа инфицированных клеток. ИФА дает возможность количественного определения вирусных антигенов. При применении этих методов не всегда есть возможность типоспецифической дифференциации вирусов простого герпеса [3].

Серологические методы

По своей информативности серологическая диагностика может уступать другим методам, поскольку антитела к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов выявляются у 90–97 % обследованных лиц (в том числе и в высоких титрах), не имеющих клинической симптоматики герпетической инфекции. И напротив, у части пациентов с выраженной симптоматикой титры антител могут оставаться низкими. Выявление титров IgG выше средних показателей служит показанием к дополнительному обследованию с целью подтверждения или исключения диагноза.

Специфические антитела IgM и IgG к вирусам герпетической группы обнаруживаются в крови и ликворе при помощи иммуноферментного анализа. Выявление IgM отражает активный процесс, реинфицирование или обострение латентной инфекции (то есть болезнь в острой фазе), наличие IgG может являться свидетельством перенесенного в прошлом инфекционного процесса, и только более чем четырехкратное нарастание титров IgG на 35–40-й день болезни указывает на острую фазу инфицирования (метод парных сывороток).

Однако нарастание титров антител происходит уже в поздние сроки после заражения или реактивации вируса (через несколько недель), при этом и оно может не наблюдаться у иммунодефицитных больных. При первичном герпесе исследование парных сывороток (взятых на острой стадии заболевания и в период выздоровления) выявляет сероконверсию — появление IgG в динамике наблюдения при их первоначальном отсутствии. При рецидивах же повышение титра антител в 4 раза и более наблюдается лишь у 5 % больных. Серологические методы, особенно определение типоспецифических антител класса IgG против вирусов герпеса, применяют для выявления носительства вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов [5].

При этом определение IgM считается низкоспецифичным, поскольку они способны вырабатываться в достаточном для диагностики количестве только у 30 % людей; возможны случаи перекрестного реагирования или выявление IgM через много месяцев или даже лет после наступления сероконверсии (так называемые хронические

IgM). Эти факты отражают нетипичность динамики анти-телообразования при герпетических инфекциях. Кроме того, помимо острой и, особенно, первичной инфекции, IgM к вирусам простого герпеса могут образовываться и при реинфекции, и при реактивации вируса.

Наиболее специфичным маркером первичной герпес-вирусной инфекции (для вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов и цитомегаловируса) является определение низкоавидных IgG (IgG к предранним, неструктурным белкам), которые никогда не вырабатываются при повторном заражении или при рецидиве. Низкая авидность IgG (индекс авидности (ИА) ниже 15–50 %) отражает незначительную степень сродства антител к антигенам, что указывает на первичность данного эпизода герпетического поражения и подтверждает факт острой инфекции от 10 до 100 дней назад. ИА в интервале 31–49 % при условии выявления антител в высокой концентрации может свидетельствовать о поздней стадии первичной инфекции или недавно перенесенной инфекции.

Высокоавидные IgG (ИА \geq 50 %) являются маркером перенесенной в прошлом или персистирующей инфекции. При этом значения ИА в пределах 51–69 % определяются как переходные IgG и подтверждают факт острой инфекции от 101 до 160 дней назад, а значения более 70 % и являются собственно высокоавидными, указывая на срок более 161 дня после острой инфекции или контакта.

IgM начинают определяться на 4–7-й день при первичном заражении (достигая максимального значения на 15–20-е сутки), а низкоавидные IgG — через 10–14 дней, затем авидность IgG постепенно возрастает и они становятся высокоавидными (табл. 1). IgM исчезают через 1–2 месяца (как и IgA), низкоавидные IgG — через 1–3 месяца, а высокоавидные поздние IgG циркулируют в крови носителя пожизненно (серопозитивность).

Если в крови при наличии IgM выявляются IgG с низкой авидностью, то это свидетельствует о первичной (недавней) инфекции (механизм первичного иммунного ответа). Обнаружение высокоавидных IgG при наличии IgM указывает на развитие вторичного иммунного ответа при попадании возбудителя в организм или при обострении (реактивации).

Таблица 1. Серологический профиль у пациентов при инфекциях, вызванных вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов и цитомегаловируса

Интерпретация	IgM (с 4–7-го дня по 1–2-й мес.)	Низкоавидные IgG (с 10–14-го дня по 1–3-й мес.)	Предранные IgG (с 5–7-го дня по 1–2-й мес.)	Высокоавидные IgG (поздние)	
				Первично	Через 2 нед.
Первичное заражение	+	+	+	–	+
Реинфицирование	+	–	+	+	++
Рецидив	+	–	+	+	++
Носительство (латентная фаза)	–	–	–	+	+
Отсутствие инфицирования	–	–	–	–	–

Примечания: «++» — уровень антител повышен; «+» — серопозитивный; «–» — серонегативный.

Таблица 2. Серологический профиль у пациентов при инфекции, вызванной вирусом Эпштейна – Барр [11]

Интерпретация	Капсидный антиген (VCA)		Ранний антиген (EA) IgG	Ядерный антиген (EBNA) IgG
	IgM	IgG		
Здоровые и большая часть инкубационного периода	–	–	–	–
Очень ранняя первичная инфекция	+	–	–	–
Ранняя первичная инфекция	+	+	+	–
Поздняя первичная инфекция	+/-	+	-/+	+
Недавняя инфекция (< 6 месяцев)	+	++	+/-	+
Латентная инфекция	+	+	+/-	–
Период ранней реконвалесценции (ранняя пост-инфекция)	–	+	+/-	–
Хроническое носительство (поздняя пост-инфекция)	–	+	–	+
Реактивация	+/-	++	++	+/-

Примечания: «++» — уровень антител повышен; «+» — серопозитивный; «–» — серонегативный.

При острой инфекции, вызванной вирусом Эпштейна – Барр, в крови образуются разные классы антител к вирусным антигенам: происходит смена ранних антител на поздние (табл. 2). Специфические IgM к капсидному антигену (VCA) выявляются в острой фазе или в фазе обострения и через 4–6 недель обычно исчезают. Маркерами активной репликации вируса являются IgG к раннему антигену (EA), которые определяются в острой фазе, при выздоровлении их уровень снижается в течение 3–6 месяцев. Поздние IgG к ядерному антигену (EBNA) выявляются через 2–6 месяцев после острой фазы и вырабатываются в течение всей жизни.

Сравнение иммунного статуса больных ветряной оспой и с герпетическими ганглионевритами указывает на более выраженное угнетение иммунной системы во втором случае, особенно в отношении клеточного звена иммунитета. У больных ветряной оспой концентрация специфического IgM в сыворотке крови является наиболее высокой в конце первой недели заболевания, в течение 2-й недели начинает снижаться практически до нулевых значений в конце месяца. При герпетическом ганглионеврите содержание IgM также повышено, но в меньшей мере, и остается таким в течение 3 недель, затем до конца месяца постепенно снижается, сохраняясь на достаточно высоком уровне [1].

Специфический IgG у больных ветряной оспой появляется в конце первой недели, в течение 2-й недели его содержание снижается и остается на низком уровне до конца месяца. У больных с герпетическим ганглионевритом концентрация специфического IgG значительно выше, нарастает в динамике, с максимумом на 2-й неделе, до конца месяца медленно снижается, оставаясь на более высоком уровне, чем при ветряной оспе.

Различие динамики содержания специфических иммуноглобулинов при разных формах заболевания, вызванного вирусом Varicella Zoster, связывают с тем, что

для ветряной оспы характерен первичный иммунный ответ, а для герпетических ганглионевритов — вторичный, вовлекающий механизмы иммунологической памяти, чем и обусловлены более высокие и длительные уровни IgG при герпетических ганглионевритах [1].

Особое внимание в лабораторной диагностике герпетических инфекций необходимо уделять пациентам с иммунодефицитным состоянием, под которым подразумевается измененный иммунный ответ у некоторых категорий больных (пожилые люди, онкологические больные, ВИЧ-инфицированные и больные СПИДом, наркоманы с большим стажем и реципиенты трансплантации органов и тканей). Поражение вирусами герпетической группы у больных ВИЧ-инфекцией развивается наиболее часто и характеризуется склонностью к тяжелому течению и рецидивированию в половине случаев (от 7 до 12 раз в год) с атипичностью клинических проявлений [2, 4, 8].

При этом в случае поражения вирусами простого герпеса высыпания могут локализоваться в нетрадиционных участках кожи и слизистой оболочки (14,1 % случаев — область ягодиц, бедра, пальца, перианальная зона), с формированием эрозивно-язвенных дефектов, с охватом сразу нескольких анатомических зон (в 20–26,2 % случаев) и сменой зон поражения при последующих рецидивах.

При поражении вирусом опоясывающего герпеса высыпания чаще, чем у иммунокомпетентных больных, отмечаются в области конечностей (23,2 %), характеризуются мультифокальностью с вовлечением в 29,3 % случаев сразу нескольких анатомических зон со склонностью к рецидивирующему течению и сменой зон поражения в половине случаев при рецидивах. Характерна трансформация везикулезных высыпаний в буллезные (в 64,6 % случаев), особенно у больных с низким количеством CD4-лимфоцитов (менее $0,500 \times 10^9/\text{л}$) [8].

При лабораторному обстеженні больних з імуннодефіцитом найбільшу діагностичну цінність має визначення ДНК вірусів в матеріалі з герпетических висипань, незначительну — пошук ДНК вірусів в крові. При цьому серологічні методи не виявляють образів IgM у больних з ВІЧ-інфекцією, що зв'язують з вираженим імуннодефіцитним станом [4, 6, 10].

Заклучение

Таким образом, лабораторная диагностика герпетической инфекции включает вирусологические, микроскопические, молекулярно-генетические, иммунохимические и серологические методы. Наиболее быстрыми и надежными методами диагностики герпетических инфекций являются полимеразная цепная реакция, определение avidности IgG и специфических антител к различным вирусным антигенам. Диагноз герпетического ганглионеврита, вызванного вирусом опоясывающего герпеса, обычно устанавливается на основании клинических данных и проведения лабораторной диагностики не требует.

Список литературы

1. Андрейчин М.А. Особливості формування імунітету у хворих на VZV-інфекцію / М.А. Андрейчин, Н.Г. Завіднюк, Н.А. Васильєва // Інфекційні хвороби. — 2005. — № 4. — С. 28-31.
2. Веприк Т.В. Герпетическая инфекция у ВИЧ-инфицированных пациентов [Электронный журнал] / Т.В. Веприк, Г.Б. Матейко // Совер. пробл. науки и образования. — 2013. — № 5. — Режим доступа к журн.: www.science-education.ru/111-10680 (дата обращения: 20.11.2014).
3. Гарюк Г.И. Лабораторная диагностика герпесвирусной инфекции у человека в практике отоларинголога / Г.И. Гарюк, Л.А. Панченко, Е.А. Куликова, Н.Г. Попова // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. — 2007. — № 3. — С. 14-20.
4. Иоанниди Е.А. Клинико-лабораторная характеристика герпетической инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов / Е.А. Иоанниди, И.В. Макарова // Бюлл. Волгоградского научн. центра РАМН и администрации Волгоградской области. — 2010. — № 1. — С. 34-36.

5. Марданлы С.Г. Герпетическая инфекция (простой герпес). Этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, лечение / С.Г. Марданлы, Г.И. Кирпичникова, В.А. Неверов. — Электрогорск: ЭКОлаб, 2011. — 48 с.
6. Маричев И.Л. Герпетическая инфекция у ВИЧ-инфицированных / И.Л. Маричев // Инфекционные болезни. — 2006. — № 2. — С. 15-17.
7. Носик Н.Н. Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н.Н. Носик, В.М. Стаханова // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 2. — С. 70-78.
8. Потеекаев Н.Н. Особенности клинического течения простого и опоясывающего герпеса у ВИЧ-инфицированных лиц / Н.Н. Потеекаев, Ф.Н. Хашиева, А.В. Кравченко // Рос. журн. кожных и венерич. болезней. Приложение «Герпес». — 2006. — № 1. — С. 40-43.
9. Современная терапия герпесвирусных инфекций: [Руководство для врачей] / В.А. Исаков, С.А. Сельков, Л.К. Мошетьова, Г.М. Чернакова. — СПб. — М.: Тактик-Студио, 2004. — 168 с.
10. Шахгильдян В.И. Цитомегаловирусная инфекция / В.И. Шахгильдян // Инфекционные болезни. Национальное руководство [под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова]. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — С. 784-796.
11. Шестакова И.В. Эпштейна — Барр-вирусная инфекция у взрослых: вопросы патогенеза, клиники и диагностики / И.В. Шестакова, Н.Д. Ющук // Лечащий врач. — 2010. — № 10. — С. 40-44.
12. Этиопатогенез, лабораторная диагностика и терапия герпесвирусных инфекций / [Рахманова А.Г., Кирпичникова Г.И., Неверов В.А., Ремезов А.П.]. — СПб.: Путер, 2003. — 47 с.
13. Boivin G. Management and prevention of herpes zoster: A Canadian perspective / G. Boivin, R. Jovey, C.T. Elliott, D.M. Patrick // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. — 2010. — V. 21, № 1. — P. 45-52.
14. Wareham D.W. Herpes zoster / D.W. Wareham, J. Breuer // BMJ. — 2007. — V. 9, № 334. — P. 1211-1215.

Получено 22.12.14 ■

Сорокін Ю.М.

Ростовський державний медичний університет, Росія

ГЕРПЕТИЧНІ УРАЖЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ. ЛЕКЦІЯ (ДРУГЕ ПОВІДОМЛЕННЯ). ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Резюме. Лабораторна діагностика герпетичної інфекції включає вірусологічні, мікроскопічні, молекулярно-генетичні, імунохімічні та серологічні методи. Найбільш швидкими і надійними методами діагностики герпетичних інфекцій є полімеразна ланцюгова реакція, визначення avidності IgG і специфічних антитіл до різних вірусних антигенів. Діагноз герпетичного гангліоневриту, зумовленого вірусом опоясуючого герпесу, звичайно встановлюється на підставі клінічних даних і проведення лабораторної діагностики не потребує.

Ключові слова: герпес, лабораторна діагностика.

Sorokin Yu.N.

Rostov State Medical University, Russia

HERPETIC LESIONS OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM. LECTURE (REPORT 2). LABORATORY DIAGNOSTICS OF HERPETIC INFECTIONS

Summary. Laboratory diagnostics of the herpetic infections includes virologic, microscopical, molecular-genetic, immunochemical and serologic methods. The most rapid and reliable methods of herpetic infections diagnostics are polymerase chain reaction, assessment of IgG avidity and specific antibodies to various virus antigens. The diagnosis of the herpetic ganglioneuritis, caused by a herpes-zoster virus, is usually established on the basis of clinical data and does not require laboratory investigation.

Key words: herpes, laboratory diagnostics.