

Особенности диагностики герпетических инфекций

Л. С. Осипова

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика, г. Киев
Клиническая больница «Феофания» ДУС, г. Киев

В статье рассмотрены современные аспекты диагностики герпетических инфекций, вызванных вирусами простого герпеса. Рассмотрены основные принципы лечения герпетических инфекций

Ключевые слова: вирус простого герпеса, диагностика, лечение, Валавир®.

Главными причинами широкого распространения болезней, вызванных вирусами простого герпеса (ВПГ), многие исследователи считают уникальную способность вируса переходить в латентное состояние, интегрироваться в геном хозяина, принимая качественно новую форму. Клинические проявления инфекции многообразны – от латентных до генерализованных форм с поражением нервной системы и внутренних органов. В зависимости от пола, возраста и давности заболевания может изменяться как острота процесса, так проявление и форма заболевания.

Учитывая выраженный полиморфизм клинических проявлений герпетической инфекции (ГИ), особое значение имеет своевременная этиологическая диагностика заболеваний, что позволит осуществлять терапевтическое воздействие в максимально ранние сроки.

Значение лабораторной диагностики ГИ определяется трудностями клинической диагностики при полиморфизме симптомов и необходимостью своевременного назначения противовирусной терапии. В настоящее время наиболее часто используют следующие лабораторные методы [4, 5, 17]:

- а) вирусологические методы обнаружения и идентификации ВПГ;
- б) методы выявления антигенов ВПГ – иммунофлюоресцентный и иммуноферментный анализ (ИФА);
- в) полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- г) цитоморфологические методы;
- д) выявление антител с помощью ИФА;
- е) методы оценки иммунного статуса.

Вирусологический метод основан на изоляции вируса герпеса из клинического материала как культивированием *in vitro* (по развитию цитопатогенного действия в культуре инфицированных клеток), так и в организме лабораторных животных (*in vivo*) (по развитию типичной симптоматики ГИ у зараженных, чувствительных к инфекции животных). Биоматериалом для выделения вируса служат жидкость из везикул на коже и слизистых оболочках, кровь, спинномозговая жидкость, соскобы с рогавицы, жидкость из передней камеры глаза, слюна, моча, фекалии, биоптаты мозга, печени и других органов. В инфицированной ВПГ коже вирус содержится лишь в клетках базального слоя, что следует учитывать при заборе материала (соскабливание). Выделение вируса на культуре клеток и животных с последующим его типированием – абсолютное доказательство этиологической роли ВПГ в развитии заболевания. Однако трудоемкость вирусологической диагностики и длительность получения результата требуют поиска современных методов экспресс-диагностики ГИ [3, 4, 7].

Методы определения вирусных антигенов (иммуноморфологические методы) позволяют выявить специфические вирусные молекулы, входящие в состав капсида и мембраноподобной оболочки вирионов. Для их идентификации используют специфические моноклональные антитела, а результат определяют по изменению окраски субстрата в реакции (ИФА) или по феномену свечения при использовании метода флуоресцирующих антител (МФА). Специфичность таких методов составляет около 90%, однако чувствительность гораздо ниже, чем у ПЦР (55–75%) [7, 19]. Для диагностики ГИ можно использовать иммунофлюоресцентный метод. Мазки после специальной обработки флуоресцирующим препаратом просматривают под люминесцентным микроскопом. Положительным считается мазок, в котором содержится не менее 3 морфологически неизмененных клеток эпителия с интенсивной специфической флуоресценцией и типичной для ВПГ локализацией в ядре или ядре и цитоплазме одновременно [7, 19].

Наиболее чувствительным методом диагностики ГИ является ПЦР, представляющая собой процесс, состоящий из повторных циклов амплификации (копирования) специфической последовательности молекулы ДНК с целью получения достаточно большого количества копий, которые могут быть выявлены обычными методами детекции. С помощью данного метода даже из нескольких молекул ДНК можно получить необходимое количество копий ее специфического фрагмента. Одним из существенных преимуществ метода ПЦР является высокая чувствительность. Очень высокая чувствительность метода ПЦР требует от врачей новых подходов к оценке результатов, полученных в лаборатории. Диагностическая значимость результатов лабораторных исследований во многом зависит от выбора врачом-клиницистом соответствующего метода лабораторного исследования, правильного взятия биоматериала для анализа из очагов поражения, адекватной предварительной подготовки биоматериала и своевременного проведения исследования. Метод ПЦР позволяет обнаружить РНК/ДНК различных возбудителей в крови, спинномозговой жидкости, моче, слюне, мокроте, бронхоальвеолярном секрете и биоптатах; обладает наиболее высокой чувствительностью и специфичностью; и имеет высокое диагностическое значение [19].

Цитоморфологические методы диагностики ГИ заключаются в проведении световой микроскопии биологического материала после его окрашивания на предметном стекле определенным методом (по Папаниколау, по Селлеру–Павловскому и др.). При ГИ обнаруживаются характерные гигантские клетки и внутриядерные включения. Цитоморфологические методы являются быстрыми и дешевыми, но не позволяют дифференцировать изменения, вызванные ВПГ и другими герпесвирусами, а также их чувствительность, по сравнению с культуральным методом, составляет всего 60% [3, 6, 9].

Для диагностики ГИ необходимо исследовать такие показатели: проведение общего анализа крови, оценку количества CD3+ (Т-лимфоциты), CD3+CD4+ (Т-хелперы), CD3+CD8+

(цитотоксические Т-лимфоциты), CD3+CD4+CD25+ (регуляторные Т-клетки), CD3-CD16+CD56+ (естественные киллеры), CD3-CD19+ (В-лимфоциты) клеток методом проточной цитофлуориметрии, а также, желательнее, определение их функциональной активности в реакции бласттрансформации или по уровню продукции ряда цитокинов [3, 8].

Именно дефицит цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) и естественных киллеров (CD16+CD56+) сегодня рассматривается как основное иммунное нарушение, опосредующее развитие реактивированных герпесвирусных инфекций [4, 5, 16, 20].

Также важно определять активность спонтанной и индуцированной продукции γ -ИФН лимфоцитами и концентрацию этого цитокина в сыворотке крови, поскольку именно этот медиатор активирует цитотоксические Т-лимфоциты и способствует их созреванию [8–10].

При острых и хронических герпесвирусных инфекциях существенно меняется интерфероновый статус организма. Так, в случае острого процесса имеет место значительное повышение концентрации интерферонов в сыворотке крови на фоне снижающейся способности лейкоцитов к продукции разных типов интерферона, что отражает нормальную реакцию организма на активную вирусную инфекцию. Напротив, при хронической инфекции концентрация интерферонов в сыворотке крови снижается, но отмечается повышение способности лейкоцитов к продукции данных цитокинов, что можно выявить в соответствующих лабораторных тестах [4, 5, 17].

Учитывая полиморфизм клинической картины и разную иммунологическую реактивность организма, в настоящее время выделяется несколько вариантов иммунного ответа при ГИ. Так, Н.И. Лисяный с соавторами (2006) выделяет 4 иммунологических варианта при герпесвирусной инфекции:

1. Иммуноактивный (высокая концентрация противовирусных антител).

2. Иммунонеактивный (нормальная концентрация противовирусных антител при высокой вирусной нагрузке).

3. Иммунодефицитный (отмечается дефицит или дефекты противовирусных компонентов иммунитета – цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллеров, интерферонов и т.д.).

4. В-клеточно стимулированный (характерно для вируса Эпштейна–Барр, тропного к CD21⁺-лимфоцитам) [8].

Это обосновывает дифференцированный подход к иммунотерапии герпесвирусных инфекций в зависимости от особенностей иммунного статуса пациента.

В большинстве случаев характерные поражения слизистых оболочек и кожи определяют правильный диагноз. Однако существуют скрытые и стертые формы заболевания, ведущие к осложнениям, а в латентной фазе вирус себя никак не проявляет. Лабораторная диагностика ВПГ до последнего времени оставалась актуальной задачей медицины. Оптимальным является применение двух методов – ИФА и ПЦР-диагностика, т.е. выявление антител в сыворотке крови и ДНК вирусов в соскобе с мест поражения. Наличие ДНК ВПГ 1, 2 в пробе соскоба с эпителия свидетельствует об активации инфекции. Необходимо отметить, что при первичной герпесной инфекции вирус обнаруживается в пузырьках (или в трещинах при атипичном герпесе) максимум в течение 7 дней после первых проявлений. При вторичной активации – как правило, до 4 дней, при иммунодефицитных состояниях – до 21 дня. Срок активности вирусов в эпителиальных клетках (частота и длительность рецидивов) зависит от иммунной системы организма. Во время латентной фазы (ремиссии) ВПГ 1, 2 персистируют в нервных ганглиях и, как правило, отсутствуют в эпителиальных клетках. Клинических проявлений инфекции при этом нет или наблюдаются остаточные проявления. Отсутствие гер-

песвирусов в пробе, взятой со слизистой оболочки, означает завершение острой фазы инфекции, наступление ремиссии. ПЦР – высокочувствительный прямой метод определения ВПГ 1, 2 применим для выявления активации герпесвирусной инфекции [4, 5, 13, 17, 18].

Биологический материал для исследования в лаборатории методом ПЦР на предмет наличия в пробе ВПГ 1, 2 берут с мест поражения соскобом в который должны попасть клетки эпителия. Исследовать методом ПЦР кровь на наличие ВПГ 1, 2 целесообразно только при вiremии, лихорадочном состоянии больного, при выраженном иммунодефиците.

Исследование сыворотки крови методом ИФА на наличие антител к герпесвирусам поможет установить, есть ли носительство и фазу заболевания (первичный острый процесс, латенция или вторичное обострение, рецидив).

При первичном заражении на 5–7-й день вырабатываются IgM и циркулируют 1–3 мес, через 10–14 дней – низкоавидные IgG, затем постепенно авидность IgG возрастает и они становятся высокоавидными. Низкоавидные IgG исчезают через 1–3 мес, а IgG (поздние, высокоавидные) циркулируют в крови носителя пожизненно. Поскольку IgM вырабатываются, как правило, 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, например) и давать ложноположительные результаты. Наличие противогерпетических IgM свидетельствует об определенной остроте процесса (первичная инфекция, реинфекция, реактивация) [1, 10, 11, 12]. Однако около 5% людей не продуцируют IgM при первичной инфекции, а у некоторых лиц IgM могут сохраняться на протяжении длительного времени после заражения, что дает ложную информацию об остроте процесса.

Специфические IgG являются антителами вторичного иммунного ответа и выявляются во второй половине инфекционного процесса при первичном заражении, а также в случае латентных инфекций (иммунная память) [6], при персистенции и реактивации патогена. Поэтому определение таких иммуноглобулинов не позволяет точно оценить клиническое значение имеющейся инфекции и не может быть достаточно надежным критерием для установления диагноза и назначения противовирусного лечения [1, 5].

Классический постулат о 4-кратном повышении титров специфических антител за двухнедельный срок (метод парных сывороток) как о диагностическом серологическом критерии инфекции применим лишь для случаев первичного заражения или «свежей» реактивации [1]. При хронических реактивированных формах ГИ наблюдается чрезвычайно высокий титр специфических IgG (в 5–10 раз и более выше верхней границы допустимых значений). В дальнейших исследованиях этот титр обычно существенно не повышается, так как ресурсы антителогенеза человеческого организма не являются безграничными. Резкие изменения титра специфических IgG возможны при переходе вируса из одной формы в другую. Например, существенное увеличение сывороточной концентрации противогерпетических антител возможно при реактивации инфекции после длительного периода латентности. И, наоборот, некоторое снижение титра специфических IgG наблюдается при формировании скрытой инфекции после определенного периода реактивированного состояния. Но зафиксировать эти изменения в клинической практике иногда бывает сложно, что обусловлено сравнительно коротким периодом их существования. Однако проведение серологических исследований необходимо для оценки иммунного статуса зараженного организма. Диссоциация между результатами ПЦР, демонстрирующими высокую репродуктивную активность виру-

са, и серологическими данными, показывающими низкие титры специфических антител, может быть диагностическим критерием недостаточности противогерпетического гуморального иммунного ответа и показанием к назначению иммунотерапии с использованием средств, повышающих антителообразование [6, 8, 9].

Своевременная диагностика герпеса позволяет вовремя начать адекватную терапию.

Терапия герпесвирусных заболеваний показана при:

- вероятности активации присутствующих в организме человека латентных герпесвирусов (например, ВПГ в организме беременных или у больных с ятрогенным иммунодефицитом при подготовке реципиентов к трансплантации органов и тканей, у больных СПИД и т.д.);

- вероятности инфицирования герпесвирусом (например, плода – материнским ВПГ), при тяжелом, опасном для жизни остром или рецидивирующем герпесвирусном заболевании (например, герпетический энцефалит у детей младшего возраста);

- тяжелом течении острого или рецидивирующего герпесвирусного заболевания (например, диссеминированный герпес кожи или рецидивирующий генитальный герпес);

- неблагоприятном фоне, на котором возникла острая либо рецидивирующая ГИ (например, сахарный диабет, псориаз или атопический дерматит) [3, 8, 9].

Выбор лечебной тактики определяется клинической формой и стадией заболевания, а также наличием сопутствующих болезней, предшествующей терапией и ее эффективностью. Лечение проводится с учетом двух фаз в течении рецидивирующего герпеса – рецидива (острая фаза инфекции) и ремиссии (межрецидивный период).

Во время рецидива проводится комбинированный курс лечения с использованием противовирусной химиотерапии и, чаще, на стадии реконвалесценции, иммунотерапии, а в период ремиссии – иммуностимулирующей терапии [4, 11, 16].

В настоящее время существует очень четкое понимание, что в острый период заболевания (или при реинфекции) главную роль играет этиотропная терапия. Применение иммуномодулирующих препаратов, индукторов интерферона либо заместительной терапии интерфероном без противовирусных считается нецелесообразным и может ухудшить клиническое течение герпесвирусной инфекции, а наиболее перспективным методом лечения признается использование вирус-специфических химиопрепаратов.

Лечение первичной ГИ специфическими этиотропными химиопрепаратами сокращает продолжительность выделения ВПГ, снижает интенсивность боли и зуда, уменьшает длительность заболевания [4, 11].

Во-вторых, специфическую терапию необходимо начать как можно раньше от момента начала заболевания. В случае развития тяжелых форм ГИ (гепатит, энцефалит, генерализованный герпес)

специфический химиопрепарат следует вводить внутривенно; при поражении кожи и слизистых оболочек (кожный и генитальный герпес, гингивостоматит) можно сочетать введение химиопрепарата с местной терапией (мази, кремы, инстилляции).

В-третьих, антигерпетическая терапия при любых формах герпеса должна быть этиопатогенетической и базироваться на использовании противовирусных (аномальных нуклеозидов) и иммунобиологических (иммуноглобулин, интерферон) препаратов.

При химиотерапии из противовирусных средств в настоящее время широко применяют валацикловир. Валавир® (валацикловир) – препарат производства украинской фармацевтической компании Фармак – L-валиловый эфир ацикловира (Ац), который предназначен для пероральной терапии ГИ. По препарату Валавир® было проведено открытое сравнительное рандомизированное исследование по оценке биоэквивалентности с оригинальным препаратом. Проводили исследование на базе фармакокинетической лаборатории государственного предприятия «Государственный экспертный центр Министерства здравоохранения Украины» в г. Харькове. Продолжительность исследования – 3 мес. Доказана полная биоэквивалентность с оригинальным препаратом [2, 11].

Активным противогерпетическим компонентом Валавира® является Ац, безопасность которого была подтверждена более чем у 50 млн больных. Эфирная «надстройка» валацикловира обеспечивает высокий уровень всасываемости перорально введенного препарата, повышая его биодоступность в 3,3–5,5 раза по сравнению с Ац [5, 12, 17]. Благодаря высокой биодоступности Валавир® является лидером по комплаентности среди аналогов нуклеозидов [2, 11, 13]. Механизмы действия Валавира® и Ац отличаются только на первом этапе: в кишечнике и печени Валавир® гидролизуется под действием фермента валацикловир-гидралазы и освобождается от эфирной «надстройки», полностью (около 99%) превращаясь в Ац, который далее включается в синтез дефектных вирусных ДНК. Попадая в клетку, Ац селективно активируется вирусной тимидинкиназой и оказывает специфическое ингибирующее действие на репликацию вируса герпеса. Валацикловир обладает более высокой биодоступностью, которая в 3–5 раз превосходит биодоступность Ац при приеме внутрь в высоких дозах. Уровни Ац в плазме после приема внутрь Валавира® приближаются к таковым при внутривенном введении Ац [2, 11, 13].

Валавир® назначают по 500 мг или 1000 мг 2 раза в сутки в течение 7–10 дней, при опоясывающем герпесе по 1000 мг 3 раза в сутки 14–21 день. В случаях рецидива Валавир® принимают по 500 мг или 1000 мг 2 раза в сутки 3–7 дней (в зависимости от распространенности и тяжести процесса).

Особливості діагностики герпетичних інфекцій Л.С. Осипова

У статті розглянуті сучасні аспекти діагностики герпетичних інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу. Розглянуті основні принципи лікування герпетичних інфекцій.

Ключові слова: вірус простого герпесу, діагностика, лікування, Валавир.

Features of diagnostics of herpetic infections L.S. Osypova

The modern aspects of diagnostics of the herpetic infections caused by the viruses of simple herpes are considered in the article. Basic principles of treatment of herpetic infections are considered

Keywords: virus of simple herpes, diagnostician, treatment, Valavir.

Сведения об авторе

Осипова Людмила Станиславовна – кафедра клинической, лабораторной иммунологии и аллергологии Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л.Шупика, лаборатория клинической иммунологии клинической больницы «Феофания», 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 21; тел.: (044) 259-67-47

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров А.Б., Шостакович-Корецкая Л.Р. HHV-6 инфекция у детей // Здоровье ребенка.
2. Гнатко О.П. Эффективность застосування препарату Валавір® у жінок репродуктивного віку за наявності генітального герпесу/ Здоровье женщины. 2009. – № 10. – С. 1–3.
3. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. – СПб.: СпецЛит., 2006. – 304 с.
4. Казмирчук В.Є., Ковальчук Л.В. Клінічна імунологія та алергологія. – Вінниця: Нова книга, 2006. – 526 с.
5. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. – К.: Феникс. – 2009. – 248 с.
6. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Рузаева Л.А., Шмидт А.Р. Особенности метаболизма иммунокомпетентных клеток у детей с рецидивирующей герпетической инфекцией // Вопросы вирусологии – 2002. – Т. 47, № 3. – С. 45–48.
7. Лебедев К.А., Поныкина И.Д. Имунная недостаточность (выявление и лечение). – М.: Изд-во НГМА, 2003. – 442 с.
8. Лисяный Н.И., Руденко А.А., Унич П.П., Муравская Л.В. К вопросу о диагностике герпес-инфекций // Епідеміологія, імунопатогенез, діагностика, лікування хламідіозу та ТОРСН-інфекцій // Імунологія та алергологія. – 2006. – № 4. – С. 103–194.
9. Марков И.С. Диагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза (Сб. ст.) – К.: АртЭк, 2002. – 192 с.
10. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройт А. Иммунология. – М.: Логосфера, 2007. – 556 с.
11. Рекомендации по лечению герпеса половых органов (адаптировано из Guidelines for the Management of Genital Herpes in New Zealand. 7th Ed.-2004) // Здоровье женщины. – 2006. – № 3 (27). – С. 167–172.
12. Семейство герпесвирусов на современном этапе / Т.К. Кускова, Е.Г. Белова, МГМСУ. – М., Лечащий Врач, № 05, 2004.
13. Finnen R.L., Mizokami K.R., Banfield B.W. et al. Postentry events are responsible for restriction of productive varicella-zoster virus infection in Chinese hamster ovary cells. J. Virol. 2006; 80: 10325–34.
14. Jones J.F. et al. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N. Engl. J. Med. 1988; 318: 733–41.
15. Stefan A., Menotti L., Campadelly Fiume G. Biology and natural history of HHV 6 and 7. Herpes. 1999; 6 (3): 12–21.
16. Steiner I., Kennedy Peter G.E., Pachner A.R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella zoster. Lancet Neurol. 2007; 6: 1015–1028.
17. Udvardi M.K., Czechowski T., Scheible W.R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. Plant. Cell. 2008; 20: 1736–1737.
18. Van Guilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques. 2008; 44: 619–626.
19. Von Glahn W.C., Pappenheimer A.M. Intranuclear inclusions in visceral disease. Am. J. Pathol. 1925; 1: 445–465.
20. Wyatt J.P., Saxton J., Lee R.S., Pinkerton H. Generalized cytomegalic inclusion disease. J. Pediatr. 1950; 36: 271–294.

Статья поступила в редакцию 17.10.2014