

Герпетические инфекции: диагностика (основные методы, интерпретация, ошибки).

Кирпичникова Галина Ивановна
С.-Петербург, СЗГМУ им. И.И.
Мечникова, кафедра
инфекционных болезней.

Герпесвирусы.

- *Herpes* - ползучий.
- На сегодняшний день открыто около 100 представителей данного семейства, из них 8 типов патогенны для человека.
- согласно данным ВОЗ ежегодно госпитализируется около 2,5 млн. человек.

Классификация герпесвирусов

Подсемейство

Альфагерпесвирусы

Вирус

ВПГ-1, ВПГ-2

ВЗВ (Нейроны)

Бетагерпесвирусы

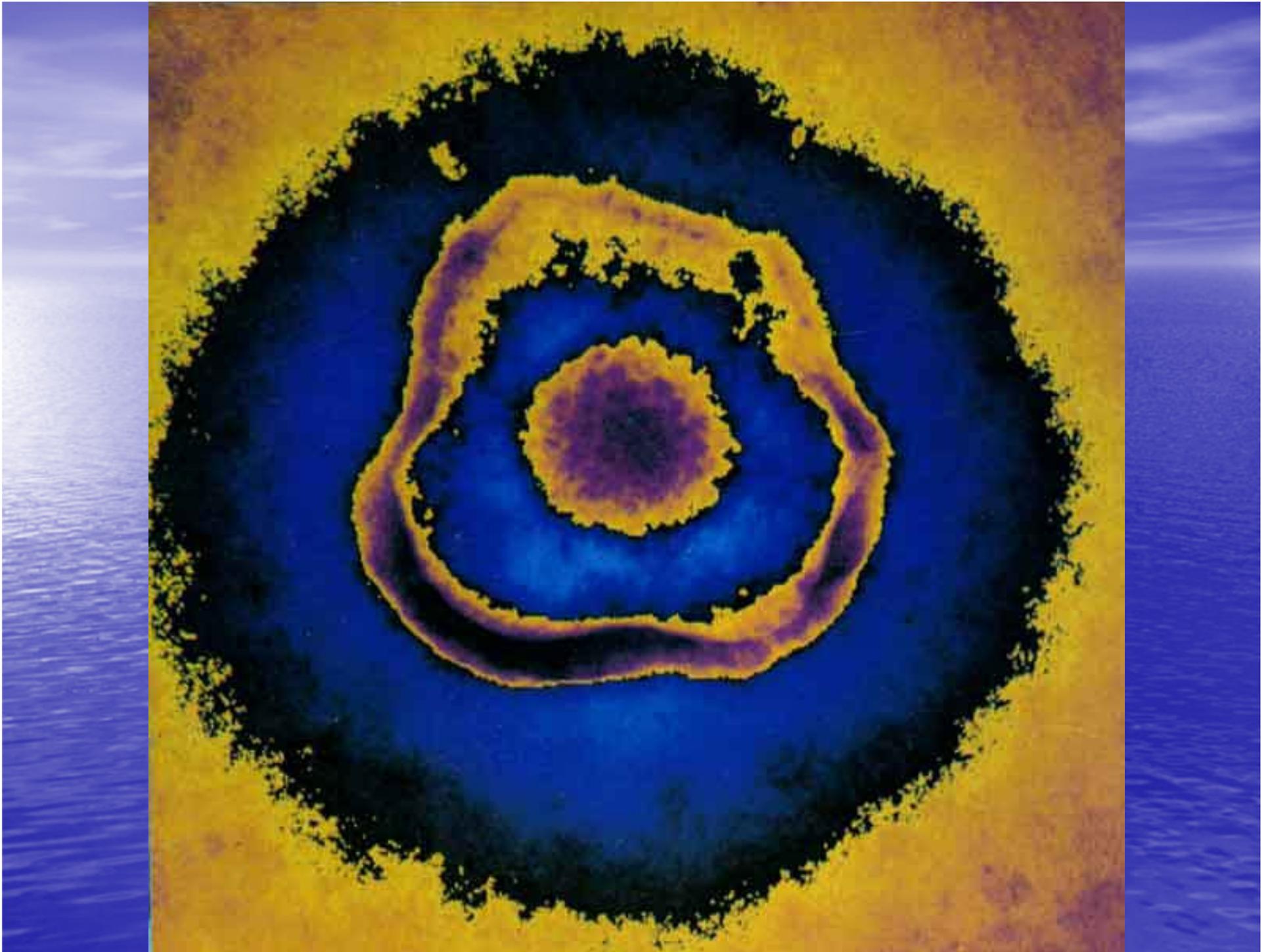
ЦМВ

ВГ-6, ВГ-7 (Т-лимф)

Гаммагерпесвирусы

ЭБВ

ВГ-8 (В-лимф.)



Патогенез ВПГ (1)

- ВПГ при первичном инфицировании проникает через кожу, слизистые и начинает реплицироваться в эпителиальных клетках, затем происходит контакт с окончаниями сенсорного нейрона. **Капсид вируса транспортируется к ядру нейрона, где и устанавливается латентная инфекция.**

Патогенез ВПГ (2)

- Реактивация латентного вируса может быть спровоцирована физическим или эмоциональным стрессом, приемом цитостатиков, гормонов, УФО, переохлаждением.

Свойства вируса (in vivo)

- Персистенция в нейронах (в виде ДИЧ)
- Активная репликация в эпителиальных клетках.
- Обнаружен в составе: ПЯЛ, эритроцитов, тромбоцитов, моноцитов, макрофагов.

Диагностика ВПГ-1, ВПГ-2 (1)

- Методы, направленные на выявление антигена:
 - Вирусологический (любой биологический материал)
 - ПЦР (основной метод)
 - МФА: ПИФ, НИФ (выявляемость 40 - 60%)
 - ЭМ (секционный материал, мазки, соскобы), применяется в научных исс-ях

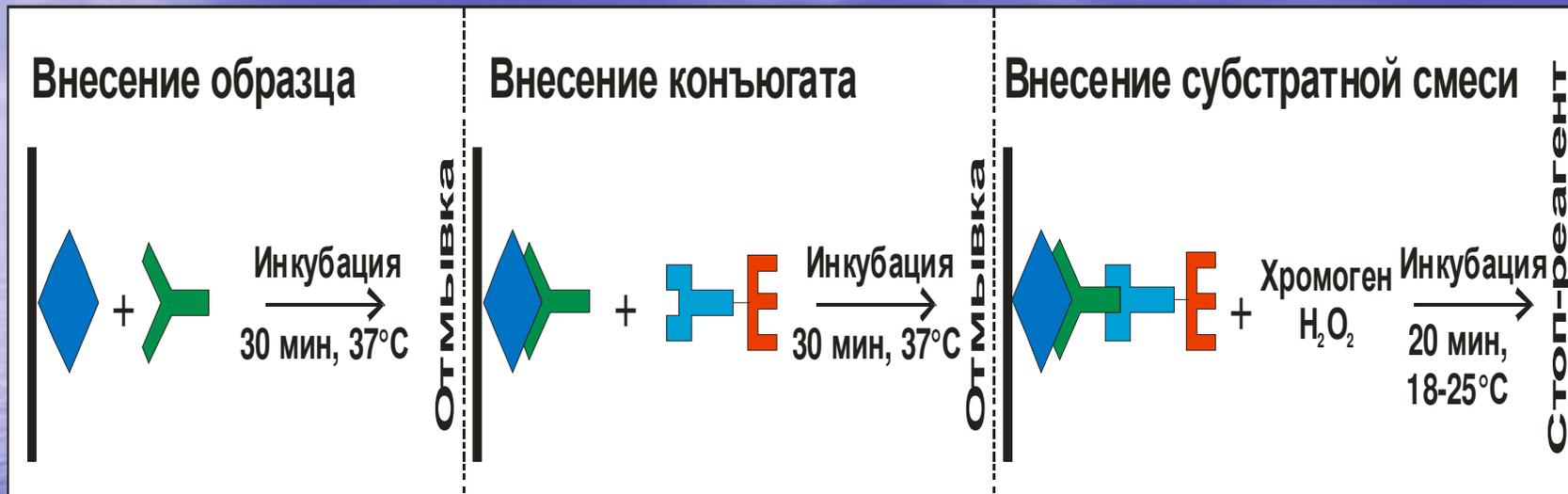
Диагностика ВПГ-1, ВПГ-2 (2)

- Методы, направленные на выявление антител:
- **Серологические тесты:** РТГА, РНГА, РН, РСК (имеют низкую степень чувствительности, специфичности, высокий процент ложных результатов) - не применяются.

Диагностика ВПГ-1, ВПГ-2 (3)

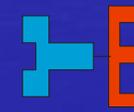
- Применение ИФА : высокочувствителен, стандартизован, специфичен, доступен.
- Определение **Ig M**: первичное инфицирование, врожденная инфекция.
- Определение **Ig G**: в динамике исследуются парные сыворотки. Антитела сохраняются пожизненно.

Принцип ИФА



 антигены ЦМВ,
сорбированные
в лунках стрипов

 специфические IgG
в исследуемом
образце

 конъюгат
антител к IgG человека
с пероксидазой хрена

Учет результатов в ИФА

- Для качественной диагностики важно установить наличие или отсутствие антител(антигена), при этом за положительное значение принимают сигнал, который в 2-3 раза превышает сигнал контрольного образца.

Лизатный антиген

- **Выращивание** возбудителя на клетках или субстрате.
- **Очистка возбудителя** и его белков от клеточного детрита и белков питательной среды.
- **Инактивация возбудителя**, его дезинтеграция на отдельные структурные белки.

Продолжение...

- **Иммобилизация** практически всех структурных белков возбудителя на твердую фазу.
- Лизатные тест-системы **высоко чувствительны** т.к. выявляют антитела ко всем структурным белкам, но менее специфичны, за счет примеси клеточных белков.

Рекомбинантные тест-системы.

- Определенные гены возбудителя (не более 2-3) встраиваются, например, в геном *E.coli* и продуцируются вместе с белками *E.coli*.
- Очистка белков возбудителя от белков *E.coli*.
- Иммуобилизация этих 2-3 структурных белков возбудителя на твердую фазу.

Продолжение ...

- Рекомбинантные тест-системы достаточно специфичны, выявляют антитела только к 2-3 структурным белкам возбудителя, остальные антитела «уходят» при промывке. Но чувствительность этих т/с уступает лизатным тестам. Стоимость их значительно ниже, чем лизатных т/с.

Продолжение...

- При некачественной очистке рекомбинантных белков от белков *E.coli*. на твердую фазу попадают белки *E.coli*., которые могут дать ложнопозитивный результат. Пример: IgM при рецидивизирующей герпетической инфекции.

Количественное определение антител в ИФА невозможно -

это связано с тем, что содержание антител в комплексе антиген-антитело зависит не только от концентрации антител в пробе (к 2-3 антигенам), но и от их авидности. Таким образом, вместо ***абсолютной концентрации антител мы учитываем их функциональную активность.*** Поэтому определение АТ в ИФА ***полуколичественное.***

Врачу –клиницисту необходимо знать, что

- одна и та же сыворотка исследованная в тест-системах от разных производителей, дает различную оптическую плотность. Это объясняется тем, что на твердой фазе производители «пришивают» разные структурные белки возбудителя и, следовательно, выявляется различный спектр антител.

Тест-системы (рекомбинантные).

- *ВектоВПГ-IgG*
- *ВектоВПГ-IgM*
- *ВектоВПГ-1,2-IgG-авидность.*
- *ВектоВПГ-2-IgG*
- *ВектоВПГ-2-IgM*

α-Герпесвирусы (ВОГ)

- VZV (вирус опоясывающего герпеса) вызывает при первичном инфицировании ветрянную оспу и опоясывающий герпес у лиц с иммунодепрессией.
 - Инфицирование происходит через слизистую оболочку верхних дыхательных путей.
 - Латенция вируса – в клетках спутниках нейронов.

ВОГ

- Обладает высокой видовой специфичностью, отсутствуют адекватные лабораторные модели.
- Главную роль в иммунном ответе играют ЦТЛ и интерферон.
- Поверхностные гликопротеиды весьма сходны с гликопротеидами ВПГ.

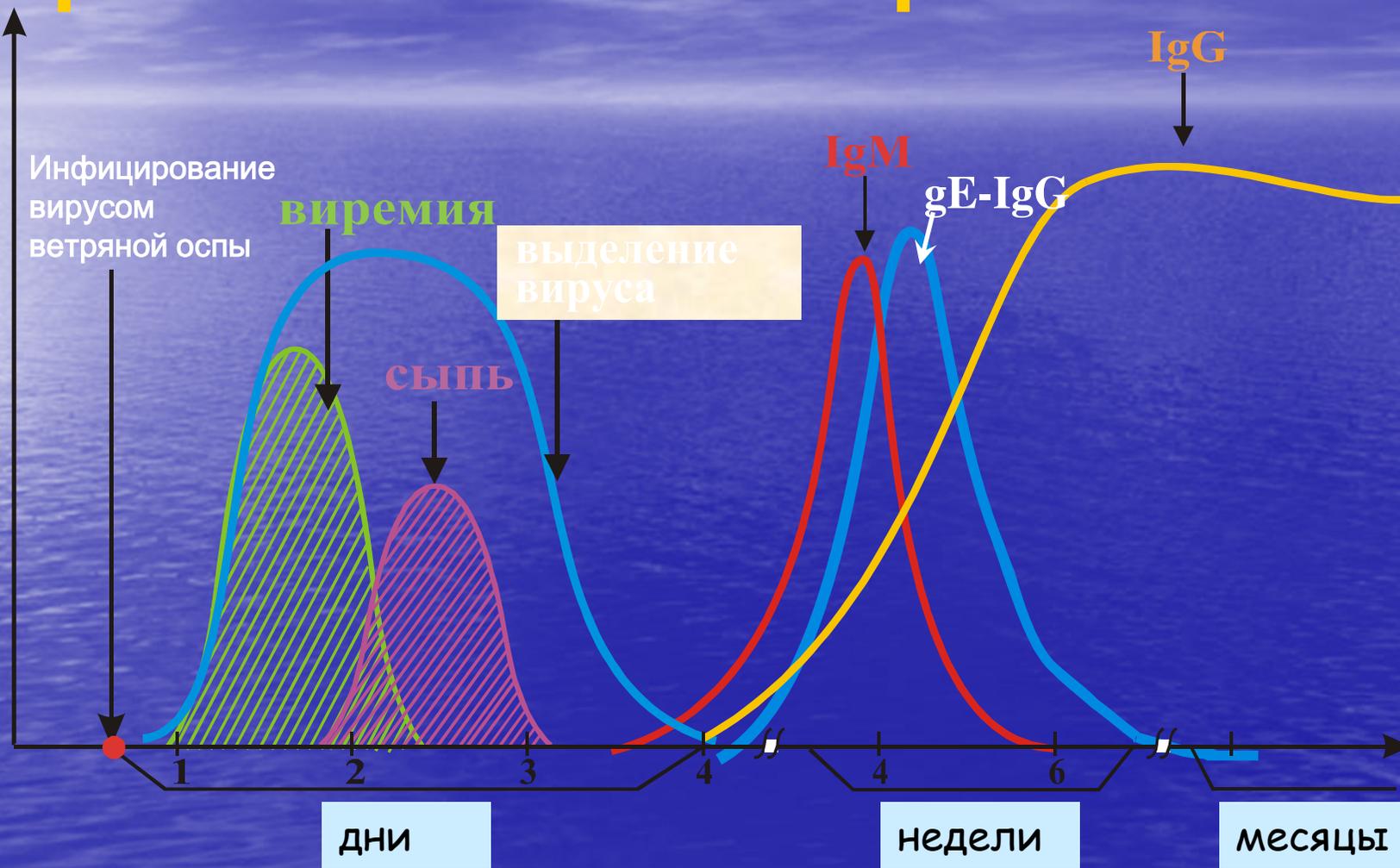
Иммунитет

- Пожизненный, однако со временем происходит постепенное *снижение уровней специфических антител* и если вирус будет спровоцирован к интенсивной *репликации*, то это будет сопровождаться выраженным воспалением и невралгией, поражением кожи в виде локализованных высыпаний.

Диагностика (ВОГ)

- Для выявления вирусных антигенов используют жидкость из везикул, соскобы, смывы, биоптаты.
- Методы диагностики:
 - ПЦР, ЭМ, иммунопероксидазный тест.
 - Метод иммунофлюоресценции (МФА) с моноклональными антителами.

Схематическая диаграмма первичного течения ветряной оспы





Диагностика Varicella Zoster

	Назначение	Хромоген	№ по каталогу	Количество анализов (включая контроли)
«ВектоVZV-IgM»	Выявление IgM к вирусу Varicella Zoster	ТМБ	D-2188	12 × 8
«ВектоVZV-gE-IgG»	Выявление IgG к гликопротеину gE вируса Varicella Zoster	ТМБ	D-2186	12 × 8
«ВектоVZV-IgG»	Выявление IgG к вирусу Varicella Zoster	ТМБ	D-2192	12 × 8

Интерпретация результатов определения маркеров инфекции VZV

Стадия заболевания	Маркеры острой стадии		Пастинфекция
	IgM	gE-IgG(остр.)	IgG(циркул.)
Инкубационный период или отсутствие инфекции	—	—	—
Очень ранняя первичная инфекция	+	—	—
Ранняя первичная инфекция	+	+	+
Поздняя первичная инфекция	—	+	+
Реактивация	+	+	↑ +
	—	+	↑ +
Паст-инфекция	—	—	+

ЦМВ (1)

- Пути распространения вируса:
- Воздушно-капельный, половой, при трансфузии цельной крови или ее компонентов, при трансплантации органов и тканей.
- Вирус мало контагиозен.

ЦМВ (2)

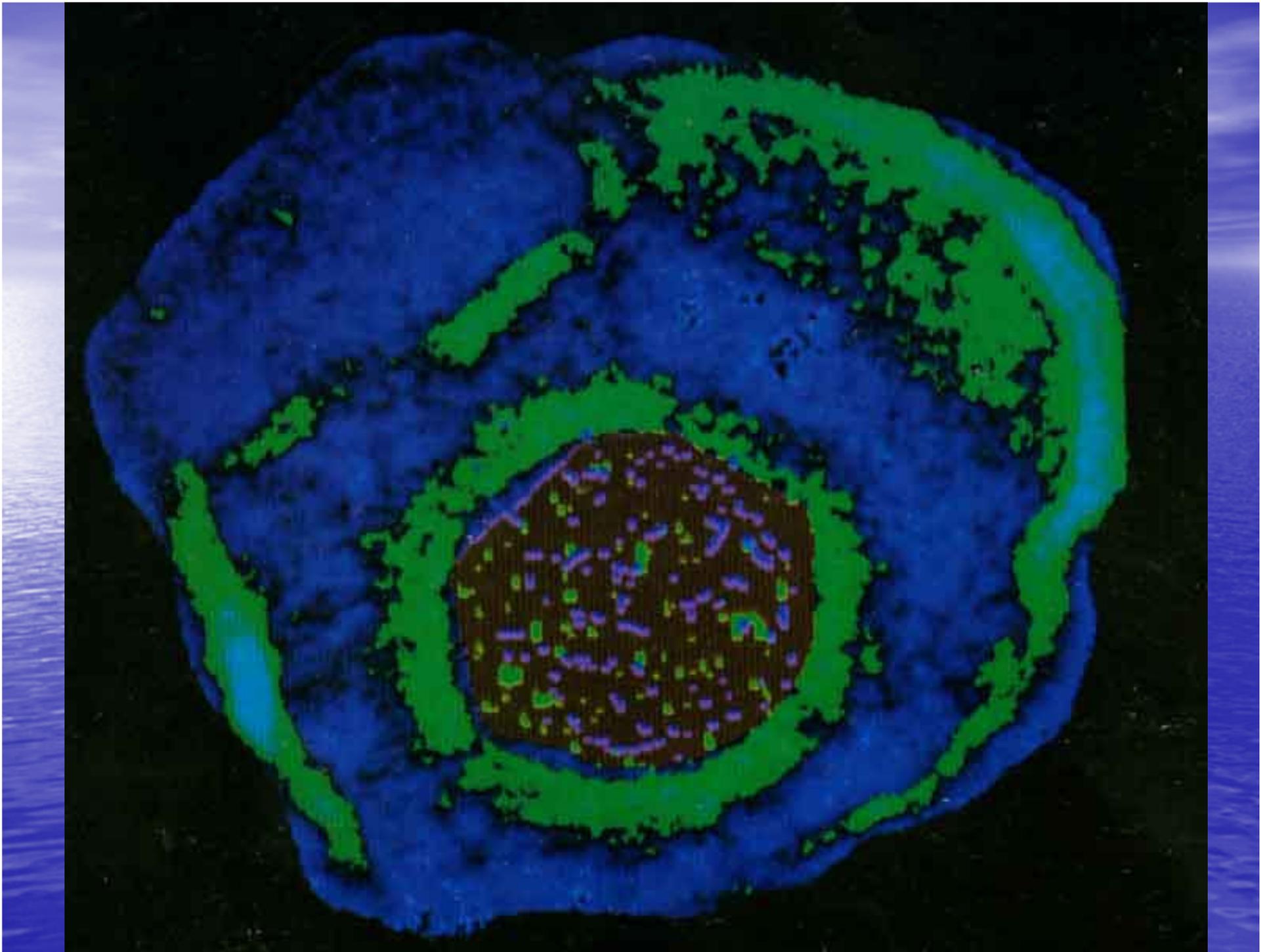
- Антитела к вирусу ЦМВ обнаружены у 80% людей старше 30 лет.
- ЦМВ удастся выделить из шейки матки почти у 10% здоровых женщин.
- Группой наибольшего риска для активации ЦМВ -инфекции являются лица с нарушением иммунитета.

Свойства вируса.

Свойства вируса (in vivo)

- Латенция
- Реактивация при иммунодефицитных состояниях
- Хромосомные абберации,
- Тератогенные свойства.

При первичной и рецидивирующей инфекциях вирус выделяется со слюной, мочой, фекалиями, кровью, СМЖ, цервикальными выделениями, грудным молоком (длительное время – месяцы, годы).



Распространенность ЦМВ

Обследование доноров в Санкт-Петербурге методом ИФА:

- **Антитела к ЦМВ** обнаружены в 96,1% случаев, из них 5,1% - первичная инфекция;
- **Вирусологическое обследование здоровых беременных женщин выявило носительство:**
США - 3,5%, Япония – 20%, Китай – 15%, Африка – 15%;

Инфицирование детей:

- 1 - 2% внутриутробно
- 6 - 60% в родах и в первые дни через грудное молоко

Антитела к ЦМВ при трансплантации органов и тканей

- АТ к ЦМВ у реципиентов способствуют снижению тяжести заболевания и смертности.
- Целесообразно реципиентов подразделять на две группы: **серонегативные и серопозитивные** с последующим введением по схеме специфических иммуноглобулинов.

Клетки-мишени вируса

- Моноциты/макрофаги
- Эпителиальные, эндотелиальные клетки
- Фибробласты
- Гранулоциты
- Клетки гладких мышц

ЦМВ (патогенез)

- *Репликация ЦМВ* в клетках мишенях сопровождается изменением морфологии клеток: увеличением клеток, децентрализацией ядра, появлением внутриядерных и цитоплазматических включений и перинуклеарной зоной просветления вокруг ядра – клетки «совиный глаз».

ЦМВ (патогенез)

- Вирус проникает через плаценту и вызывает внутриутробную патологию плода. При этом наблюдаются тяжелые поражения внутренних органов, головного и спинного мозга.

ЦМВ (патогенез)

- Цитомегаловирусная инфекция-индикатор клеточной иммунологической недостаточности.
- Высокому риску подвержены люди с иммуносупрессией, новорожденные, пациенты после трансплантации, ВИЧ-инфицированные.

Лабораторная диагностика ЦМВИ (1)

- Вирусологические методы
- МФА (ПИФ, НИФ)
- ПЦР
- Определение антител:
 - ИФА для определения IgM
 - ИФА для определения IgG
- Цитологические методы

Цитологические методы

- Это классические исследования окрашенных препаратов мочи, слюны, ликвора или секционного материала для выявления в них специфически измененных ("гигантских клеток"). Окраску препаратов производят азур-эозином, гематоксилин-эозином или по Папенгейму. Пораженные ЦМВ клетки имеют диаметр 25-40 мкм, т.е. резко увеличены по сравнению с обычными клетками; они имеют увеличенные ядра, в них наблюдаются цитоплазматические и ядерные включения.

Вирусологические методы.

- Метод основан на заражении исследуемым материалом монослойных культур фибробластов эмбриона человека и диплоидных культур клеток легких человека с последующим микроскопическим определением цитопатогенного действия (ЦПД) вируса на клетки. Для заражения культуры клеток используют кровь, мочу, слюну, бронхиальный аспират, сыворотку крови, секционный материал.

« Shell vial » или быстрый культуральный метод,

- который состоит в сокультивировании клинических образцов и культуры клеток(ФЭЧ) с последующим выявлением вирусных белков с помощью моноклональных антител (МКА). Метод высоко специфичен (100%), является «золотым стандартом». Сроки получения результата -24-72 час.

ПЦР - диагностика

- Следует отметить, что существующие методы диагностики могут иметь разную ценность в зависимости от целей исследования.
Определение ДНК ПЦР является наиболее чувствительным методом диагностики, но с ее помощью не всегда удается дифференцировать форму ЦМВИ, так как в реакции определяется и ДНК вируса, находящегося в латентном состоянии.

Значимость ПЦР

- Например, обнаружение ДНК ЦМВ методом ПЦР в амниотической жидкости, где ее вообще не должно быть, означает инфицирование плода.
- В то время как выделение ДНК ЦМВ из секрета шейки матки не позволяет оценить активность инфекции.
- Отрицательная ПЦР также имеет диагностическое значение

ЦМВ + ВИЧ.

- Определение **ДНК ЦМВ** в крови очень важно для беременных ВИЧ-инфицированных женщин, которым не рекомендуется проведение амниоцентеза и кордоцентеза (АТ) по причине высокого риска инфицирования ВИЧ, рекомендуется проводить исследование крови и мочи в каждом триместре беременности.
- Пример: почти 60% женщин с наличием ДНК ЦМВ в крови родили инфицированных ЦМВ детей

Определение *IgM* и *IgG*.

- Диагностическое значение имеет наличие и динамика в сыворотке (плазме) крови **специфических антител**, что может быть определено при исследовании так называемых "парных" сывороток.
- Выявление специфических *IgM* и *IgG* имеет смысл проводить при диагностике первичного инфицирования или врожденной инфекции.

Продолжение...

- Наиболее частым маркером, выявляемым при обследовании женщин, являются специфические иммуноглобулины класса IgG. Если они выявляются в качестве единственного маркера, то это свидетельствует об инфицированности цитомегаловирусом. IgG анти-ЦМВ в этой ситуации становятся индикатором латентной инфекции. С другой стороны, присутствие IgG анти-ЦМВ указывает на наличие гуморального иммунитета к этой инфекции

Диагностика ЦМВИ у беременных (ИФА).

- У серонегативных женщин с симптомами первичной инфекции проводятся повторные исследования через 3-4 недели для подтверждения сероконверсии. При выявлении IgM-антител у серопозитивных женщин, и особенно при возрастании титра антител в повторном исследовании, может быть заподозрено инфицирование на ранних сроках беременности или же до беременности (IgM персистируют до 16 недель).

Исследование плода:

- нет надежного метода диагностики плода после того, как диагностирована первичная инфекция у матери. Вирус может выделен из амниона, IgM – из крови плода.
- Антенатальное исследование: **IgM** указывают на недавнюю или текущую инфекцию.

Аntenатальное исследование:

- **IgG** плод получает от матери и их концентрация падает к 5-6 месяцу жизни. затем появляются собственные антитела, пик которых приходится к 8-10 годам.

Таким образом,

следует отметить, что комплексное обследование пациента различными методами дает возможность врачу получить более полную информацию как о наличии инфекционного агента, так и об иммунном статусе пациента. Это позволяет более точно ставить диагноз и назначать соответствующее этиотропное лечение с последующим его контролем.

β -герпесвирусы (ВГ-6, ВГ-7)

- ВГ-6 был выделен в 1986 г. от ВИЧ-инфицированных.
- 60-96% населения имеют к нему антитела, инфицирование происходит в 1-ый год жизни.
- ВГ-6 связывают с синдромом экзантемы, кратковременной лихорадкой и сыпью.
- Два подтипа :ВГ-6А и ВГ-6В

ВГ-6

- Сохраняется в организме в латентном состоянии, экспрессия его ограничена, способен реактивироваться при иммунодефицитах, играет важную роль в возникновении СХУ.
- Является Т-лимфотропным герпесвирусом, активно размножается в Т-лимфоцитах.

ВГ-7

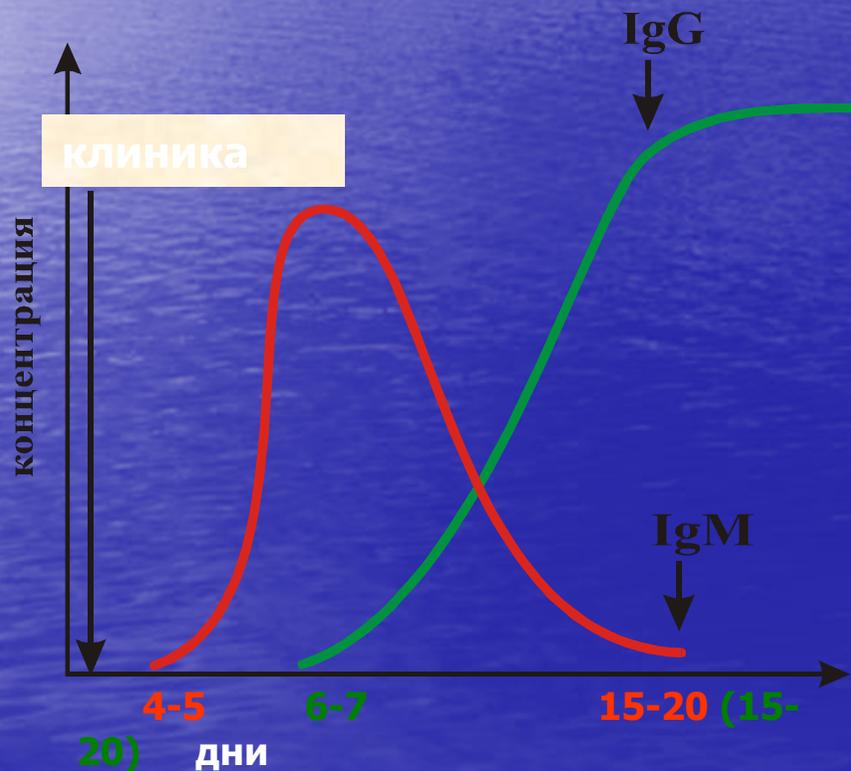
- Выделен из культуры активированных лимфоидных клеток донорской крови
- Инфицирует Т-лимфоциты
- **Геном гомологичен на 61% ВГ-6 и 28% -ЦМВ.**
- Стабильно присутствует в периферической крови в низком титре: 3 копии на 10⁴ клетки.
- При реактивации количество вируса возрастает в 20-75 раз.
- Является ко-фактором прогрессии ВГ-6, ЦМВ.

Диагностика ВГ-6, ВГ-7

- Культивирование (дорогостоящий и длительный метод)
- МФА с использованием моноклональных антител.
- ПЦР (определение антигена)
- Определение антител в ИФА.

Динамика образования антител

❖ Антитела к ННУ-6 обнаруживаются у 40-100% населения в зависимости от возраста, места проживания, социально-экологических условий





Диагностика герпес-вируса 6 типа

	Назначение	Хромоген	№ по каталогу	Количество анализов (включая контроли)
«ВектоННВ-6-IgG»	Выявление IgG к герпес-вирусу 6 типа	ТМБ	D-2166	12 × 8

Gammapherpesvirinae

- Вирус Эпштейн-Барр (ЭБВ)
выделен в 1964 г.
- Вирус герпеса 8 типа (ВГ-8)
выделен в 1994 г.

Патогенез

- Вирус Эпштейн - Барр (ВЭБ) был выделен и идентифицирован при исследовании клеток лимфомы Беркитта в Центральной Африке.
- ВЭБ связывают с рядом онкологических, онкогематологических заболеваний: карциномой носоглотки, лимфогрануломатозом, некоторыми В- и Т-клеточными лимфомами.

Вирус Эпштейна-Барр

**Инфекционный
мононуклеоз**

**Лимфома
Беркитта**

**Назофарингеальная
карцинома**

**Лейкоплакия слизистых
оболочек языка, полости рта**

ВЭБ

- Распространен широко и практически все переносят эту инфекцию в раннем возрасте, причем первичное инфицирование протекает субклинически, а в более старшем возрасте развивается инфекционный мононуклеоз.

Патогенез ВЭБ (1)

- Вирус попадает в организм через слизистую рото- и носоглотки, далее проникает в регионарные лимфатические узлы, размножается и диссеминирует гематогенным путем.
- ВЭБ тропен к эпителиальным клеткам носоглотки, слюнных желез, Т- и В-лимфоцитам.

Патогенез ВЭБ (2)

- ВЭБ при взаимодействии с лимфоцитами вызывает их трансформацию т.е. способность к неограниченному размножению.
- Вирус в состоянии инфицировать Т - и В-лимфоциты, **но активная репликация происходит только в В-лимфоцитах.**
- **Вирус мало контагиозен.**

Иммунитет

- Активация нормальных киллеров
- Увеличение количества ЦТЛ (супрес.)
- Увеличение количества вируснейтрализующих антител, а также антител к АГ вирусного капсида и ядерному антигену.
- Всего ДНК вируса кодирует более 80 белков.

Иммунитет

- Усиливается апоптоз клеток.
- Изменяется цитокиновый спектр и как следствие подавляется функция созревания моноцитов.
- Появление мононуклеаров с характерной базофильной цитоплазмой (иногда до 90%) .
- Возникает иммуносупрессия.

Диагностика (1)

- Реакция Пауля –Буннеля (определение гетерофильных антител)
- Реакция Ловрика, р-я Хоффа –Бауэра.
- Реакции неспецифичны, до 30% ложнопозитивны и нечувствительны (до 25% ложноотрицательны) - не применяются.
-

Диагностика (2)

- Реакция непрямой иммунофлюоресценции (***РНИФ***)
- В качестве антигена используется культуральный вирус.
- Учет результатов – визуальный.

Диагностика (3)

- *ИФА – используют рекомбинантные белки.*
- Особенностью гуморального иммунитета является дифференцированная во времени выработка иммуноглобулинов М, G на различные вирусные антигены. Это позволяет диагностировать различные стадии инфекционного процесса.

Маркеры инфекции ВЭБ

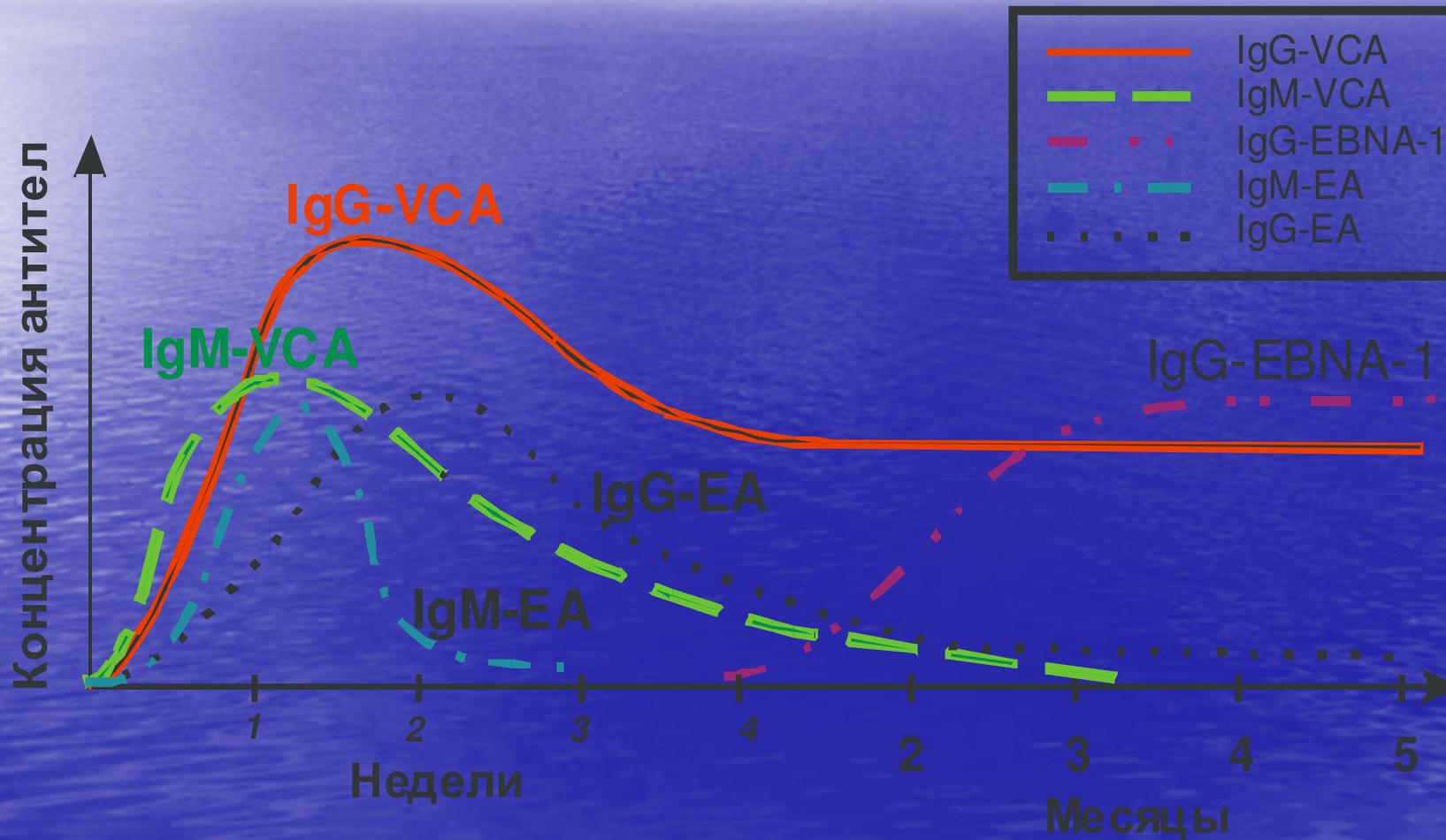
*Маркеры
острой стадии:*

- **IgM к VCA**
- **IgG к EA**
- **IgG к VCA**

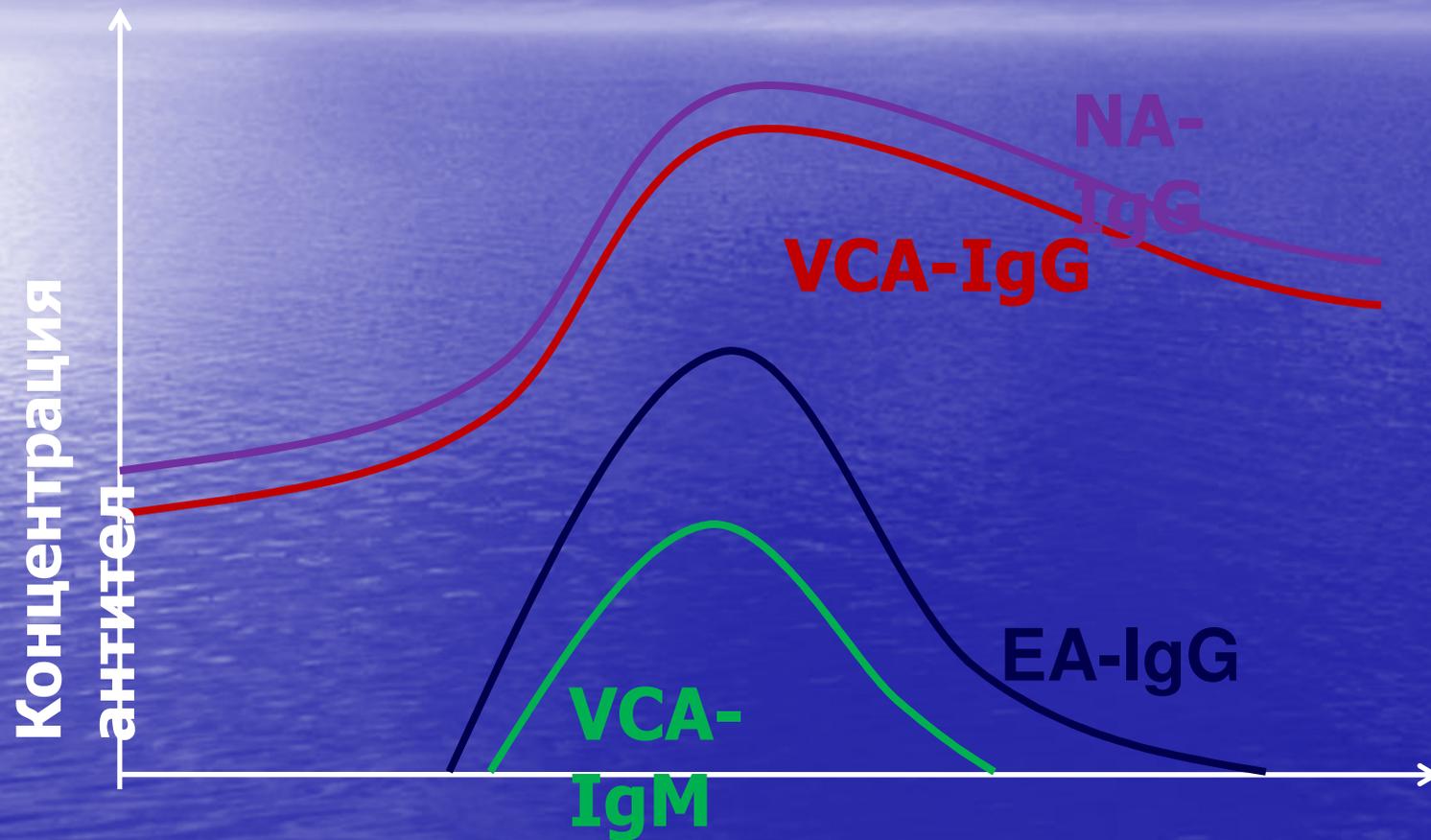
*Маркеры
паст-инфекции:*

- **IgG к EBNA**
- **IgG к VCA**

Динамика продукции антител к ВЭБ



Реактивация ВЭБ



Маркеры ВЭБ

	РАК	РАК	АВК	АВК	ЯА
Стадия инфекции	IgM	IgG	IgG	IgM	IgG
Первичная инф-я	+	+	+	+	-
Хроническая ин-я	+/-	+	+/-	+	-
Латенция	-	-	-	+	+
Реактивация	+/-	+	+	+	+



Диагностика вируса Эпштейна-Барр

	Назначение	Хромоген	№ по каталогу	Количество анализов (включая контроли)
<p>«ВектоВЭБ-VCA-IgM» № ФСР 2008/03377 От 10 октября 2008 г.</p>	<p>Выявление IgM к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр</p>	ТМБ	D-2176	12 × 8
<p>«ВектоВЭБ-ЕА-IgG» № ФСР 2008/03378 От 10 октября 2008 г.</p>	<p>Определение IgG к раннему антигену ЕА вируса Эпштейна-Барр</p>	ТМБ	D-2172	12 × 8
<p>«ВектоВЭБ-НА-IgG» № ФСР 2008/03379 От 10 октября 2008 г.</p>	<p>Определение IgG к ядерному антигену (ЕВНА) вируса Эпштейна-Барр</p>	ТМБ	D-2170	12 × 8
<p>«ВектоВЭБ-VCA-IgG»</p>	<p>Определение IgG к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр</p>	ТМБ	D-2184	12 × 8

- ***ПЦР –диагностика при ВЭБ-инфекции:***

- применение эффективно для обнаружения ВЭБ инфекции у новорожденных, когда определение серологических маркеров малоэффективно, а также в сложных, сомнительных случаях у взрослых.

HHV-8

```
graph TD; A[HHV-8] --> B[Саркома Капоши]; A --> C[Неходжкинская лимфома]; A --> D[Многоочаговая болезнь Кастлемана];
```

**Саркома
Капоши**

**Неходжкинская
лимфома**

**Многоочаговая
болезнь
Кастлемана**

ВГ-8

- Обнаружен в клетках саркомы Капоши, у ВИЧ-инфицированных в материале из полостных лимфом, при аутоиммунных нарушениях, при лимфопролиферативных заболеваниях.
- Не обнаружен у здоровых доноров

ВГ-8

(распространенность)

- В популяции – 0,1 - 2%
- Среди гомосексуалистов – 12 -30 %
- Больные мочепол. инфекциями – 6%
- Среди доноров крови:
 - в Париже – 1,5%
 - беременные - 4,9%
 - наркоманы – 2,4%
 - реципиенты почек -15,2%
 - больные СПИДом -60%
 - реципиенты крови -12%

Диагностика ВГ-8

- **ПЦР** - основной метод диагностики, позволяющий определить вирусный антиген.
- **ИФА** – определение антител



Диагностика ВГ 8 типа

	Назначение	Хромоген	№ по каталогу	Количество анализов (включая контроли)
«ВектоННВ-8-IgG»	Выявление IgG к герпес-вирусу 8 типа	ТМБ	D-2160	12 × 8

Возможные причины одновременной продукции IgM к различным герпес-вирусам

- ❖ *перекрестная реактивность антител;*
- *реактивация;*
- *реинфекция;*
- *микст-инфекция;*
- *Качество тест-систем.*

