

В.В.Акимова, Г.П.Погосян

*Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова (E-mail: gayane\_63@mail.ru)*

### **Характеристика методов определения инфекций вирусной природы**

В статье изложены основные методы определения вирусных агентов: вируса простого герпеса I и II типов, цитомегаловируса, вируса папилломы человека. Описаны цитологические, цитоморфологические методы, иммуноферментный анализ, метод прямой иммунофлюоресценции, иммунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента, серологические методы. Представлены преимущества и недостатки каждого из методов. Обозначена полимеразная цепная реакция, обладающая наибольшей чувствительностью и специфичностью. Указаны разновидности полимеразных цепных реакций (ПЦР), отмечены преимущества ПЦР в режиме реального времени.

*Ключевые слова:* вириды, цитологические исследования, световая микроскопия, специфические антитела, штаммы ВПГ, маркеры, пероксидаза хрена, ферритин, иммунофлюоресцентный метод, серологические методы, иммунизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР), генотипирование, ВПЧ-инфекции.

Инфекционные болезни вирусной природы на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями человеческого организма из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых людей в течение короткого периода времени, а также из-за недостаточной изученности молекулярно-генетических механизмов агентов, вызывающих заболевание.

Появляются новые виды инфекционных возбудителей (вириды), происходит изменение макроорганизма, претерпевают существенные изменения условия жизни под действием экологических и социальных факторов, что оказывает значительное влияние на течение и исходы инфекционных болезней, поэтому необходимо следить за современными достижениями медицины и биологии, обеспечивающими новые возможности определения и диагностики болезнетворных агентов.

В данной статье будут рассмотрены некоторые инфекционные агенты вирусной природы и основные методы их определения для выявления наиболее точного и достоверного метода, не требующего больших материальных и временных затрат.

Вирусные инфекции представляют собой одну из многочисленных групп инфекционных заболеваний разнообразных по клиническому течению и морфологии [1].

Вирус — субклеточный инфекционный агент, который может воспроизводиться только внутри живых клеток организма [2]. По природе вирусы являются автономными генетическими элементами, имеющими внеклеточную стадию в цикле развития и, за редким исключением, содержат только один тип геномной нуклеиновой кислоты [3]. Вне клетки вирусные частицы не проявляют признаков живого и ведут себя как частицы органических полимеров. От живых организмов — внутриклеточных паразитов отличаются полным отсутствием основного и энергетического обмена и отсутствием сложнейшего элемента живых систем — аппарата трансляции (синтеза белка), степень сложности которого превышает таковую самих вирусов [4].

#### *Определение вируса простого герпеса I и II типов (Herpes simplex virus I и II)*

*Herpes simplex virus I и II* (вирус простого герпеса — ВПГ 1 и 2) входят в состав семейства герпесвирусов, включающих более 90 герпесвирусов человека и животных [5]. Герпесвирусы представ-

лены структурно однородной группой вирусов, содержащих двухцепочечную линейную ДНК. Это крупные вирусы (средний диаметр 100 нм), отличающиеся сложной организацией вириона. Размножение вирусов от репликации до образования вирусных частиц происходит в ядре инфицированной клетки [6].

Уникальными биологическими свойствами всех герпесвирусов человека является способность к персистенции и латенции в организме инфицированного человека. Персистенция представляет собой способность герпесвирусов непрерывно или циклично размножаться (реплицироваться) в инфицированных клетках тропных тканей, что создает постоянную угрозу развития инфекционного процесса. Латенция ВПГ — это пожизненное сохранение вирусов в морфологически и иммунохимически видоизмененной форме в нервных клетках регионарных (по отношению к месту внедрения герпесвируса) ганглиев чувствительных нервов [5].

*Herpes simplex I* вызывает первичный герпетический гингивостоматит с характерными поражениями многослойного эпителия красной каймы губ. *Herpes simplex II* вызывает генитальный герпес — характерные поражения гениталий [7].

В большинстве случаев характерные поражения слизистых оболочек и кожи определяют правильный диагноз герпесной инфекции. Однако существуют скрытые формы заболевания, ведущие к осложнениям, а в латентной фазе вирус себя никак не проявляет. Лабораторная диагностика ВПГ до последнего времени оставалась актуальной задачей медицины [8].

В качестве биологического материала для проведения исследования можно использовать содержимое везикул, смывы с тканей и органов, мазки-отпечатки, соскобы, биологические жидкости и секреты организма (кровь, слизь, моча, слезная жидкость, СМЖ) [9].

Для диагностики герпетической инфекции используются следующие методы:

**1. Цитоморфологические методы** — позволяют выявить индуцированные вирусом морфологические изменения в клетках и тканях пораженных органов. Эти методы делятся на две группы: в одних используется световая, в других электронная микроскопия [6].

Материалом для цитологического исследования может служить содержимое везикул, соскоб со дна эрозии, слизистой уретры, стенок влагалища, канала шейки матки.

После нанесения материала на предметное стекло препарат высушивают, фиксируют и окрашивают. Существует несколько методов окраски для цитологического исследования мазков на ВПГ. Наиболее часто применяют окрашивание по Романовскому-Гимзе [10].

При использовании световой микроскопии в зонах поражения отмечается типичный для герпеса метаморфоз клеток и их ядер. Размер клеток увеличен. Они имеют крупные, гиперхромные ядра, содержащие базофильные включения, окруженные зоной просветления. Определяются внутриядерные ДНК-содержащие включения, многоядерные клетки [9]. В местах поражения тканей отмечается некроз, лимфоплазмочитарная реакция различной степени выраженности, разрыхления пласта эпителия, утолщение кариолеммы (очаговые редупликации), маргинация хроматина, скопление хроматина в глыбки, полный лизис ядерных веществ, цитоплазма вакуолизируется и даже может исчезнуть (остаются «голые» ядра) [6].

Электронно-микроскопическое исследование позволяет обнаружить в биопробах характерные по морфологии частицы ВПГ при негативном контрастировании. Этот метод требует достаточно высокой концентрации возбудителя в пораженной ткани ( $10^{10}$  частиц в 1 мл суспензии). Дифференциация ВПГ от других морфологически неотличимых представителей семейства герпесвирусов может быть выполнена при комбинации электронной микроскопии с использованием специфических антител против соответствующих штаммов ВПГ, меченных электронно-плотными маркерами — пероксидазой хрена или ферритином [11].

Цитоморфологические методы диагностики являются наиболее доступными и технически простыми. Диагностическая ценность метода может достигать до 2/3 от эффективности выделения вируса в культуре тканей. К достоинствам следует отнести высокую диагностическую значимость при бессимптомном течении инфекции (цервициты, уретриты) [7]. К недостаткам цитоморфологических методов с использованием световой микроскопии следует отнести их неспецифичность (наличие многоядерных клеток и внутриядерных включений характерно и для других вирусов, например, вируса ветряной оспы — герпес зостер), невозможность дифференцирования первичной инфекции ВПГ от рецидивирующей, типа ВПГ [10].

**2. Иммунофлюоресцентный метод** — основан на непосредственном связывании антигенов вируса простого герпеса с мечеными флюорохромом антителами и последующей микроскопии исследу-

дуемого материала с полученными комплексами антиген-антитело в ультрафиолете. Под воздействием ультрафиолетового излучения флюорохром дает свечение, что позволяет быстро выявить наличие возбудителя в исследуемом материале [9]. Для оценки интенсивности специфического свечения используют четырехкрестовую систему:

++++ — яркие сверкающие изумрудно-зеленые клетки, люминесцирующие по периферии, четко контрастирующие с темным телом клетки;

+++ — умеренная изумрудно-зеленая люминесценция периферии клетки;

++ — зеленое свечение всей клетки;

+ — едва заметная зеленая люминесценция всей клетки [11].

Для идентификации ВПГ используют следующие методы флюоресцентного окрашивания:

– **метод прямой иммунофлюоресценции** используется при исследовании соскобов слизистых. Метод позволяет выявить вирус простого герпеса (HSV1, 2) в клетках эпителия [6].

На исследуемые препараты наносят 0,02–0,05 мл флюоресцирующей специфической сыворотки (поликлональной или моноклональной), содержащей БСА (бычий сывороточный альбумин), меченой родамином или синькой Эванса. Их используют как контрастирующие вещества, на контрольные препараты наносят конъюгированную отрицательную или гетерогенную сыворотку, желателно проводить контрольное исследование и с предметными стеклами, на которые нанесен препарат, содержащий ВПГ [11].

Мазки просматриваются под люминесцентным микроскопом, используя масляную имерсию [5]. При оценке результатов обращают внимание на характер и количество антигенсодержащих клеток, локализацию специфического свечения и его интенсивность. ДНК-содержащие ядра окрашиваются в зеленый цвет. Цитоплазма обычно также окрашивается в зеленый цвет. При усиленном метаболизме клеток РНК цитоплазмы и ядра имеет красноватый оттенок. Вирусные включения в цитоплазме и ядре могут иметь различную окраску — от красных незрелых (РНК-содержащих), до желто-зеленых зрелых (ДНК-содержащих) включений различной формы и размеров [9].

Положительным считается мазок, в котором содержится не менее 3 морфологически не измененных клеток эпителия, с интенсивной специфической флюоресценцией типичной локализацией не менее чем на ++. Для ВПГ характерна локализация в ядре, ядре и цитоплазме одновременно [11]:

– **иммунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента**. Его преимуществом является применение только одного типа флюоресцирующего конъюгата — сыворотки иммунной к глобулину морской свинки. Конъюгированная сыворотка фиксируется в тех местах препарата, где антиген адсорбирует специфические антитела [8].

Имунофлюоресцентный метод со связыванием комплемента в настоящее время применяют крайне редко, так как комплемент быстро теряет свою активность и может использоваться не для всех реакций между антигеном и антителом [7].

Анализ материала осуществляется при помощи люминесцентного микроскопа с синевфиолетовой части спектра, используют объектив и иммерсионную систему [9].

В эпителиальных клетках, пораженных ВПГ, выявляются яркие свечения гранул в ядрах, нередко обнаруживаются включения в цитоплазме или гранулы на кариолемме и поверхности эукариотических клеток, диффузное свечение цитоплазмы [8].

Таким образом, при использовании метода иммунофлюоресценции частота подтверждения герпесвирусной этиологии достигает, в зависимости от стадии заболевания, 15–45 %. Длительность постановки реакции составляет 1–1,5 часа. Однако описанный метод не обладает достаточной специфичностью и чувствительностью, но может быть применен как вспомогательное диагностическое средство [9].

**3. Серологические методы.** Обнаружение антигенов ВПГ в биологических жидкостях организма или в клетках является прямым доказательством активной репликации вируса и, следовательно, однозначно подтверждает этиологию заболевания [12]. Для выявления антигенов ВПГ в биологическом материале, полученном от больных, используются серологические методы: реакция связывания комплемента (РСК); реакция нейтрализации (РН); реакция пассивной гемагглюцинации (РПГА); радиоиммунный анализ (РИА); иммуноферментный анализ (ИФА).

Принцип этих методов основан на выявлении антигенов ВПГ с помощью специфических антител, либо поликлональных, полученных при иммунизации животных антигенами ВПГ, либо моноклональных, полученных с помощью гибридомной технологии. В основе всех этих методов лежит реакция специфического связывания антиген-антитело. Различия методов заключаются в способах

регистрации и учета этой реакции. В настоящее время классические серологические реакции типа РСК, РН, РПГА, в силу их низкой чувствительности, высокой трудоемкости, малой пригодности к автоматизации, отступили на второй план [9].

Все большее распространение получают методы ИФА, в которых, как правило, применяются моноклональные антитела, отличающиеся высокой специфичностью [7].

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) [5].

Так как IgM вырабатываются, как правило, только при первичной инфекции, 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.

Для исключения ошибки необходимо проверить наличие низкоавидных IgG или повторить исследование IgM через 2 недели (метод парных сывороток): 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 [13].

Наиболее специфичными маркерами первичной герпесвирусной инфекции являются *низкоавидные IgG*. Они никогда не вырабатываются при повторном заражении или рецидиве. При необходимости проводят определение титра антител в динамике [11].

Количество поздних IgG у носителей может варьировать в зависимости от стадии заболевания, от состояния иммунной системы пациента вообще и на момент обследования в частности. Поэтому количественный показатель IgG далеко не всегда обладает диагностической ценностью [8].

Итак, 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.

Выявление поздних, высокоавидных IgG при отсутствии IgG к предранним белкам вирусов свидетельствует о спокойном носительстве, латентной фазе.

Выявление IgM, низкоавидных IgG и предранних IgG при отсутствии поздних IgG — свидетельствует о первичном инфекционном процессе.

Отсутствие поздних IgG, IgM и IgG к предранним белкам герпесвирусов, т.е. серонегативность в отношении данных вирусов, означает отсутствие ВПГ 1,2 в организме [13].

При оценке диагностической ценности серологических методов следует учитывать, что специфичность выявления антигенов ВПГ весьма высока, но не абсолютна. Существуют широкие перекрестные антигенные связи ВПГ человека 1-го и 2-го типов с другими герпесвирусами человека (вирусом Эпштейна-Барр, цитомегаловирусом, вирусом ветряной оспы), а также герпесвирусами животных и птиц. Так, нарастание титра антител в крови может быть связано с обострением хронической герпетической инфекции, а с другой стороны — развитие герпетического энцефалита, например, может протекать на фоне стабильного нарастания уровня антител, который был достигнут в результате предшествовавшей инфекции [9]. Чувствительность ИФА достаточно высокая, частота подтверждения герпесвирусной этиологии заболевания составляет в остром периоде до 50–75 %, при хроническом рецидивирующем течении — до 35–45 % [13].

**4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — наиболее широко используемый в настоящее время метод диагностики герпетических инфекций человека, который предложил Мюллис в 1983 г. В основе метода лежит катализируемое ферментом ДНК-полимеразой многократное образование копий (*амплификация*) определённого участка ДНК, представляющего диагностический интерес. При этом для амплификации, т.е. синтеза ДНК-матрицы, отбирают наиболее консервативную часть вирусного генома, обычно какой-нибудь уникальный ген, который наиболее чётко отличает его от прочих патогенов [14]. Для ВПГ 1 и ВПГ 2 это фрагмент гена, кодирующего один из гликопротеинов капсида. У всех других герпесвирусов этот фрагмент представлен другой последовательностью ДНК. Чувствительность метода позволяет определить одну молекулу искомой ДНК в образцах, содержащих 10 клеток [15].

Различают **качественный, полуколичественный и количественный** варианты метода. При проведении качественной ПЦР можно определить лишь факт присутствия ВПГ, однако невозможно оценить его репродуктивную активность, что неприемлемо при диагностике герпетических инфек-

ций, при которых необходимо проводить дифференциальный диагноз между латентными, персистирующими и реактивированными формами инфекции. Полуколичественная ПЦР даёт определённую информацию о содержании копий вирусных ДНК, которая выражается в виде условных обозначений (+, ++, +++, ++++), однако наиболее целесообразно проводить именно количественный вариант метода, при котором можно получить точные числовые значения [12].

Необходимо отметить, что полученный количественный результат не соответствует истинному содержанию ДНК возбудителя в исследуемой пробе ввиду феномена амплификации, который имеет место при проведении ПЦР. Однако всё же имеется определённая пропорциональность между исходным количеством генетического материала и конечным результатом исследования, которая соблюдается лишь в случае проведения диагностики в стандартных условиях, с использованием одних и тех же реактивов. Поэтому такие данные можно применять в клинической диагностике, если проводить обследование пациента в динамике в одной и той же лаборатории. Если же необходимо установить абсолютное количество вирусной ДНК в пробе, то проводят **нормализацию** полученных результатов (сравнение с количеством продуктов некоторых стабильных генов, экспрессия которых одинакова при различных условиях) [15].

Чувствительность ПЦР в определении ВПГ 1 и 2 составляет 98 %, а специфичность — 94 % [8]. Ложноотрицательные результаты возможны при несоблюдении технологических процедур проведения исследования, а также при использовании некачественных реактивов. Ложноположительные данные можно получить при подсчёте результатов методом электрофореза, что связано с контаминацией воздушной среды рабочего пространства ампликонами, полученными в ходе предварительных постановок. Поэтому использование так называемых открытых методик подсчёта результатов требует проведения интенсивной вентиляции помещений. Гораздо лучше использовать закрытые методики подсчёта, например, иммунофлуоресцентные детекторы, при которых нет прямого контакта между продуктами реакции и воздушной средой, а результаты исследования являются более корректными [15].

Наиболее точной является методика так называемой *real-time* ПЦР, т.е. ПЦР в реальном времени. Её отличительным свойством является подсчёт количества амплифицированных ДНК по мере их накопления после каждого амплификационного цикла, а не в конце постановки.

Однако даже количественная ПЦР не всегда позволяет адекватно разграничить латентные и реактивированные формы герпесвирусной инфекции, так как в обоих случаях имеет место наличие вирусной ДНК [7].

Таким образом, следует отметить, что ни один из методов лабораторной диагностики *Herpes simplex* I и II не обладает 100 %-ной чувствительностью и специфичностью. Повышение достоверности лабораторной диагностики за счет исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов может быть достигнуто путем одновременного применения нескольких методов тестирования, базирующихся на разных принципах (например, выявление ДНК вируса методом ПЦР и определение герпетического антигена, противовирусных М-антител или низкоавидных G-антител методом ИФА).

#### *Определение цитомегаловируса (Cytomegalovirus, CMV)*

Цитомегаловирус (ЦМВ) принадлежит к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae* и имеет видовое название *Human herpes virus 5* (HHV5) (официальное название) или *Cytomegalovirus* (обычное название) [4].

Жизненный цикл ЦМВ является сложным многоступенчатым процессом. ДНК вируса становится транскрипционно активной только при проникновении в ядро клетки. В первую очередь происходит транскрипция предранних генов (IE) и синтез соответствующих им белков, обладающих регуляторными функциями дальнейшей экспрессии вирусного генома. Далее синтезируются белки ранних (E) генов, которые, как полагают, играют важную роль в репликации вирусной ДНК. Наконец, поздние (L) белки, большая часть которых представлена структурными полипептидами, образуются при наличии вновь синтезируемого вирусного генома и ранних белков [16].

Цитомегаловирус вызывает цитомегаловирусную инфекцию — широко распространенную вирусную инфекцию, характеризующуюся многообразными проявлениями — от бессимптомного течения до тяжелых форм с поражением внутренних органов и центральной нервной системы.

В настоящее время известно 3 штамма ЦМВ. Вирус развивается в культуре человеческих фибробластов [17].

Определение цитомегаловируса может осуществляться следующими методами:

**1. Цитологический метод.** В окрашенных препаратах мочи, слюны, ликвора, слизистой цервикального канала, грудного молока выявляют специфически изменённые «цитомегалические гигантские клетки». Исследование проводят многократно, не менее 3 в день, в течение 3–5 дней. Цитологический метод является простым и доступным, но обладает невысокой чувствительностью (около 50 %) [9].

**2. Серологический анализ.** Для тестирования сывороток применяют в основном иммуноферментный анализ (ИФА). В качестве антигена обычно используют экстракты лизированных, инфицированных вирусом клеток или очищенные вирусные частицы [18].

В контексте диагностики ЦМВ выделяются *IgG* и *IgM*:

– Определение *IgG* свидетельствует о перенесенном в прошлом инфицировании и контакте иммунной системы с вирусом, позволяет выявить латентную ЦМВИ. Однако диагностической ценности данный анализ не имеет. Большую диагностическую ценность имеет количественный анализ *IgG* — повышение титра антител в 4 раза от исходного является признаком активности инфекции или первичного поражения.

– Определение *IgM*. Наличие *IgM* в сыворотке крови может расцениваться как показатель текущей инфекции — первичной или рецидивирующей. Данный класс антител первым синтезируется иммунными клетками в ответ на контакт с инфекционным агентом. Это происходит спустя несколько дней после первичного контакта [19].

Однако количественный анализ на *IgG* позволяет выявить активный процесс или первичное инфицирование лишь при проведении серии анализов в течение длительного времени (оценка динамики титра антител). Также ограничения метода связаны с низким уровнем *IgM* в тестируемой сыворотке или их возможным отсутствием в случаях рецидивирующей инфекции и у лиц с иммуносупрессией. Возможны ложноположительные результаты, обусловленные наличием ревматоидного фактора класса М [18].

В ряде случаев в процессе диагностики возникает необходимость исследования некоторых функциональных особенностей антител, таких как *аффинность* и *авидность* [18].

*Аффинность* — степень сродства антитела антигену (компонент вируса).

*Авидность* — прочность соединения в комплексе антитело–антиген [20].

Между данными понятиями имеется прямая взаимосвязь — чем лучше антитела соответствуют антигену, тем прочнее их связь при взаимодействии. К примеру, индекс авидности до 30 % свидетельствует о наличии низкоавидных антител и соответственно о первичной инфекции, 30–40 % — о поздней стадии первичной инфекции или недавней перенесенной инфекции, индекс свыше 40 % — о давней перенесенной инфекции [18].

Таким образом, имеющаяся иногда несогласованность между параметрами иммунного ответа и клиническими проявлениями накладывает дополнительные ограничения на серологический анализ в диагностике ЦМВИ. Это обусловлено особенностями иммунного ответа при данном заболевании, часто возникающем на фоне иммунодефицитного состояния пациента. Поэтому важную роль в постановке диагноза ЦМВИ играет определение вирусных антигенов и вирусной ДНК.

**3. Вирусологический метод** — один из традиционных методов лабораторной диагностики ЦМВИ. Он заключается в культивировании клеток фибробластов, инфицированных биологической жидкостью пациента. Возникшие морфологические изменения клеток указывают на наличие вируса в исследуемом образце. Длительность процесса (3–4 недели), цитотоксичность некоторых образцов (моча, слюна), слабая выраженность морфологических изменений при сопутствующих инфекциях существенно ограничивают использование данного метода [21].

**4. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)** позволяет выявлять ДНК с высокой чувствительностью — 10–100 геномов ДНК ЦМВ на исследуемую пробу [19].

Метод ПЦР благодаря своей высокой чувствительности выявляет даже отрезок ДНК ЦМВ и считается весьма прогрессивным. Наиболее важное его преимущество — возможность диагностики ранних стадий процесса, латентной и персистирующей инфекции, однако он имеет существенные недостатки: во-первых, низкая прогностическая ценность, связанная с тем, что ПЦР выявляет ДНК вируса даже в латентном состоянии, во-вторых, этот метод недостаточно специфичен [22].

Таким образом, в связи со сложностью развития цитомегаловирусной инфекции, часто протекающей на фоне иммунодепрессивного состояния, с наличием первичной, латентной и рецидивирующей инфекций, имеющимися фактами несогласованности между параметрами иммунного ответа

и клиническими проявлениями наиболее часто применяемыми являются серологические методы и полимеразная цепная реакция, однако для получения более точного результата рекомендуется использовать комбинированную диагностику.

#### *Определение вируса папилломы человека*

Вирус папилломы человека (ВПЧ, HPV — *Human Papillomavirus*) относится к подгруппе А семейства паповирусов (*Papoviridae*) [3]. Репродукция ВПЧ происходит в ядрах клеток, где вирусная ДНК присутствует в виде эписомы. Это первая особенность, отличающая ВПЧ от других онкогенных ДНК-содержащих вирусов (вирус гепатита В — семейство паднавирусов и вирус Эпштейна-Барра — семейство герпесвирусов), которые могут встраивать свой геном в ДНК трансформированной клетки. Вторая особенность заключается в том, что состояние клетки хозяина регулирует экспрессию вирусного генома [23].

Как происходят репликация вируса, сборка вирусных частиц и их высвобождение из клетки считать полностью установленными еще нельзя. [24]

В зараженной клетке вирус существует в двух формах — эписомальной (вне хромосом клетки), которая считается доброкачественной формой, и интросомальной и интегрированной (встраиваясь в геном клетки), которую определяют как злокачественную форму паразитирования вируса [23].

ВПЧ не размножаются в культуре клеток, поэтому сведения о биологии вирусов получены с помощью молекулярно-генетических технологий и эпидемиологических исследований. Показано существование 100 типов, отличающихся по строению ДНК, 75 из них молекулярно клонированы и полностью секвенированы. Типирование ВПЧ основано не на антигенных различиях, а на ДНК-гомологии [24].

Благодаря молекулярно-гибридизационным методам стало известно, что 30 из всех типов папилломавирусов инфицируют половые органы и область заднего прохода. Различают высокоонкогенные, низкоонкогенные типы ВПЧ, а также группу промежуточного риска, выделяемую некоторыми авторами. К высокоонкогенным относятся 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 и 82 типы ВПЧ, к низкоонкогенным — 6, 11, 30, 42, 43, 44 типы, наличие промежуточного онкориска предполагается у 26, 53 и 66 типов [25].

В клинической практике преобладает инфицирование высокоонкогенными 16 и 18 типами, с которыми связаны около 70 % случаев рака шейки матки, а также низкоонкогенными 6 и 11 типами, вызывающими около 90 % остроконечных кондилом [26].

Диагностика вируса папилломы человека может осуществляться следующими методами:

**1. Цитологический анализ мазка** — метод выявления морфологических изменений клеток, в том числе связанных с ВПЧ [9]. Клетки для исследования берутся с поверхности шейки матки. Качество результата в значительной мере зависит от квалификации врача-цитолога (трактовка субъективна) и от выбора способа окрашивания. Наиболее информативным методом окрашивания является метод Папаниколау [23].

Характерным цитологическим признаком папилломавирусного поражения является так называемая койлоцитарная атипия [27].

Койлоциты — клетки плоского эпителия неправильной формы с четкими границами. Размер их может быть разным, но обычно они крупнее, чем клетки соответствующего им слоя. Располагаются преимущественно разрозненно или небольшими группами. Цитоплазма обильная, характерно наличие обширной околядерной зоны просветления, полости или нескольких полостей, четко отграниченных от периферических отделов цитоплазмы, которые окрашиваются более равномерно и интенсивно [9].

Околядерную зону просветления обнаруживают не только при папилломавирусной инфекции, но и при других изменениях эпителия, в частности, при плоскоклеточной метаплазии.

При доброкачественных поражениях вирусные частицы располагаются эписомально, при раке — встроены в геном клеток [27].

Специфичность метода составляет 90–97 %. Однако не следует забывать о следующих существенных недостатках цитологического исследования: 1) анализ позволяет диагностировать только клиническую и субклиническую формы инфекции; 2) существует возможность появления ложноположительных результатов при наличии плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой

степени тяжести (в мазок попадают чаще всего поверхностные клетки плоского эпителия, а койлоцитопатия может наблюдаться в более глубоких слоях многослойного плоского эпителия); 3) чувствительность цитологических методов для обнаружения поражений шейки матки варьирует от 50 до 80 %, что может быть отчасти компенсировано повторением теста через короткие промежутки времени [23].

**2. Метод ПЦР** позволяет осуществить выявление и типирование ВПЧ. Метод может быть использован для анализа различных образцов: мазков, соскобов, смывов, биоптатов и тканей, заключенных в парафин. Пробы можно получить неинвазивным путем [9].

Наборы ВПЧ-праймеров гибридизируются с высококонсервативными генами L1, которые кодируют капсидный белок. Для детекции продуктов амплификации используют набор длинных (400 п. н.) зондов, позволяющих определить тип вируса. Другой набор ВПЧ-праймеров гибридизуется с ранними генами E6, которые сохраняются и после того, как вирусная ДНК попадает в клетку [28].

Для идентификации разных типов ВПЧ используют типоспецифические олигонуклеотидные зонды. Этим методом можно выявить даже 10 копий ВПЧ [24].

ПЦР — это наиболее точный из всех возможных методов выявления инфекционных агентов в организме человека. Специфичность метода 100 %, эффективность обнаружения — 98 % [29]. В отличие от иммунологических методов, где о наличии микроорганизма судят исключительно по наличию в крови пациента антител к конкретным возбудителям, ПЦР-диагностика выявляет непосредственно самого возбудителя или его части даже в предельно малых концентрациях, что делает метод ПЦР наиболее точным и чувствительным [30].

ПЦР-диагностика не позволяет установить стадию инфекции, однако однозначно указывает на наличие или отсутствие инфекции. В связи с этим данная группа методов может использоваться только в совокупности с клиническими методами исследования [29].

Дополнительные возможности определения прогноза течения папилломавирусной инфекции может дать проведение генотипирования. Необходимость генотипирования может быть оправдана, так как:

- выявление нескольких генотипов вируса ассоциировано с менее благоприятным прогнозом течения заболевания и более высоким риском персистенции;
- степень онкогенности различных генотипов высокого риска не одинакова. Наибольшей онкогенностью обладают 16 и 18 типы ВПЧ, существуют рекомендации по проведению определения этих двух генотипов вируса после теста на широкий спектр типов с целью определения типов обследования;
- проведение генотипирования позволяет отличить реинфицирование от персистентной инфекции при повторном визите пациента. Получать подобную информацию тем более важно, так как опасность представляет именно хроническая персистентная форма инфекции, недавнее же инфицирование наиболее вероятно спонтанно излечивается. О реинфицировании говорит изменение спектра генотипов, о персистентной инфекции — сохранение генотипа вируса через год после первого тестирования, повторное инфицирование тем же генотипом вируса после самостоятельного излечения практически невозможно [24].

Таким образом, методов, позволяющих определить вирус папилломы человека, не так много, как в отношении других вирусных агентов. Это связано с тем, что ВПЧ не размножаются в культуре клеток, а серологический метод диагностики ВПЧ-инфекции не применяется, так как существует огромное число серотипов вирусов, вследствие антигенного родства которых нередко отмечают перекрестные реакции. Кроме того, до последнего времени не удавалось получить надежные диагностические препараты [30].

Однако исследования показали, что совместное использование ВПЧ-тестирования и цитологии позволяет увеличить чувствительность выявления предрака и рака шейки матки до 96–99 % [29].

На основании изложенного можно сделать вывод о том, что, учитывая преимущества и недостатки каждого из описанных методов определения инфекционных агентов вирусной природы, наиболее эффективным является ПЦР. Метод обладает наибольшей чувствительностью, специфичностью, отличается быстротой получения результата и возможностью выявления вирусного агента даже в латентной форме.

## References

- 1 Skin and venereal diseases (directory) / Ed. O.L.Ivanova. — Moscow: Medicine, 2007. — 352 p.
- 2 *Shligel G.* General microbiology — Moscow: Mir, 1987. — 283 p.
- 3 General Virology / Ed. Yu.Z.Gendon. — Moscow: Mir, 1981 — 680 p.
- 4 *Borisov L.B.* Medical microbiology, virology, immunology. — Moscow: Medicine, 1994 — 736 p.
- 5 *Granitov V.M.* Herpes infection. — Moscow: Book Medical, 2001. — 168 p.
- 6 *Karimova I.M.* Herpes infection. Diagnosis, clinical features, treatment. — Moscow: MIA, 2004. — 120 p.
- 7 *Dyudyun A.* Modern aspects of the clinic, diagnosis and treatment of herpesvirus infections // *Dermatovenerology. Cosmetology. Sexologists.* — 2006. — Vol. 1. — № 2(9). — P. 214–219.
- 8 *Shulzhenko A.E.* Current approaches to diagnosis and treatment of herpesvirus infections // *Doctor.* — 2007. — № 5. — P. 52–55.
- 9 *Adaskevich V.P., Kozin V.M.* Skin and venereal disease. — Moscow: Med. literature, 2006. — 672 p.
- 10 *Anokhin V.A.* Current principles of clinical and laboratory diagnosis of herpetic infections // *Kaz. Med. Journal.* — 1999. — № 2. — P. 127–129.
- 11 *Barinskaja I.F., Shublazde A.K., Kasparov A.A.* Herpes. The etiology, diagnosis and treatment. — Moscow: Medicine, 1986 — 272 p.
- 12 *Kazmirchuk V., Maltsev D.V.* Clinic, diagnosis and treatment of human herpesvirus infections: Monograph. — Kiev: Phoenix, 2009. — 248 p.
- 13 *Peradze T., Halonen P.* Immunological diagnosis of viral infections. — Moscow: Medicine, 1985. — 301 p.
- 14 Theoretical basis of polymerase chain reaction. — Moscow: DNA Technology, 1998. — 128 p.
- 15 *Maltsev D.V.* Modern methods of diagnosis of herpesvirus infections of man and the principles of interpretation of the results // *Clinical Immunology. Allergology. Infectology.* — 2010. — № 1. — P. 23–32.
- 16 *Emery V.C.* Cytomegalovirus infection. — London: Current Medicine Group Ltd, 2006. — 63 p.
- 17 *Guseva L.N., Rogov L.A. et al.* Cytomegalovirus infection (CMV): Classification and variants of the course // *Children's infection.* — 2003. — № 1. — P. 57–61.
- 18 *Shakhgildyan V.I., Tishkevich O.A., Shipulina O.* Clinical and laboratory characteristics, pathologic features, diagnosis and treatment of cytomegalovirus infection // *Infectious Diseases.* — 2004. — Vol. 2. — № 1. — P. 73–80.
- 19 *Ershov F.I., Kasyanov N.V.* Cytomegalovirus infection (recent data on the epidemiology, clinical picture, diagnosis and treatment) // *Moscow, infection and antimicrobial therapy.* — 2002. — Vol. 4. — № 4. — P. 36–39.
- 20 *Shakhgildyan V.I.* Cytomegalovirus infection // *Lectures on Infectious Diseases.* — 3rd ed. / Ed. N.D.Yushchuk, Y.Y.Vengerov. — Moscow: Medicine, 2007. — P. 767–799.
- 21 *Carajas N.* Cytomegalovirus infection — a modern diagnostics // *Clinical Laboratory Diagnostics.* — 1998. — № 2. — P. 16–17.
- 22 *Bashlykova M.V., Masyukova S.A., Karimov I.M.* Development of advanced methods of diagnosis and treatment of herpes and cytomegalovirus infections // *Journal of Dermatology and Venerology.* — 2001. — № 5. — P. 12–14.
- 23 *Dmitriev G.A., Bitkina O.A.* HPV infection. — Moscow: Medical Book, 2006 — 76 p.
- 24 *Dubinsky V.* Urogenital human papillomavirus infection (literature review) // *Russian Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases.* — 2000. — № 5 — P. 50–55.
- 25 *Buryak D., Mikhalevich S.* Human papillomavirus infection in gynecology: the current state // *Health News.* — 2008. — № 2. — P. 7–9.
- 26 *Bashmakov M.A., Savicheva A.M.* HPV infection. — N.Novgorod: Izd NGMA, 2002. — 20 p.
- 27 *Vasiliev M.M.* Modern aspects of human papillomavirus infection of the urogenital tract (clinical picture, diagnosis, treatment). — Moscow, 2003. — 25 p.
- 28 *Kuevda D.A.* HPV testing: diagnostic algorithms and requirements for molecular tests for the detection of human papillomavirus // *Gene diagnostics of infectious diseases: Proceedings of the 6th All-Russian scientific-pract. conf.* — Moscow, 2007. — № 3. — P. 108–119.
- 29 *Dolgiĥ T.I., Mikhailova N.A., Gordienko T., Votrina I.R.* PCR diagnosis of human papillomavirus infection in women of reproductive age // *Gene diagnostics of infectious diseases: Proceedings of the 5th All-Russian scientific-pract. conf. / Ed. V.I.Pokrovsky.* — Moscow, 2004. — Vol. 1. — P. 29–31.
- 30 *Molochkov V.A.* HPV infection. Clinic, diagnosis and treatment: A guide for physicians. — Moscow: Russian Doctor, 2004. — 44 p.

В.В.АКИМОВА, Г.П.ПОГОСЯН

### Вирустық инфекцияларды анықтау әдістерінің сипаттамасы

Мақалада вирус агенттерін: I и II типті қарапайым герпес, цитомегаловирус, адам папилломасы вирусын анықтаудың негізгі әдістері мазмұндалған. Цитологиялық, цитоморфологиялық әдістер, иммуноферментті талдау, тікелей иммунофлюоресценция, комплементті байланыстыру, иммунофлюоресцентті және серологиялық әдістер туралы жазылған. Әрбір әдістің артықшылықтары мен

кемшіліктері айқындалған. Сезімталдығы және ерекшелігі бойынша ең жақсы әдіс полимеразды тізбекті реакция болатыны көрсетілген. ПТР-дың түрлері және Real time режимінде полимеразды тізбекті реакцияның артықшылығы дәлелденген.

V.V.Akimova, G.P.Pogosyan

### **Description of the methods of the viral infections determining**

In this article the main methods for determining viral agents: herpes simplex virus types I and II, cytomegalovirus, human papilloma virus are described. The cytologic, cytomorphological methods, enzyme immunoassay, a method of direct immunofluorescence, immunofluorescence method with complement fixation, serological methods are analyzed. The advantages and disadvantages of each technique are detected. Polymerase chain reaction is recommended as a most effective for determination of viral agents. This method has the highest sensitivity and specificity. Types of PCR is indicated and the advantages of real time-PCR is detected.

Репозиторий қарғу