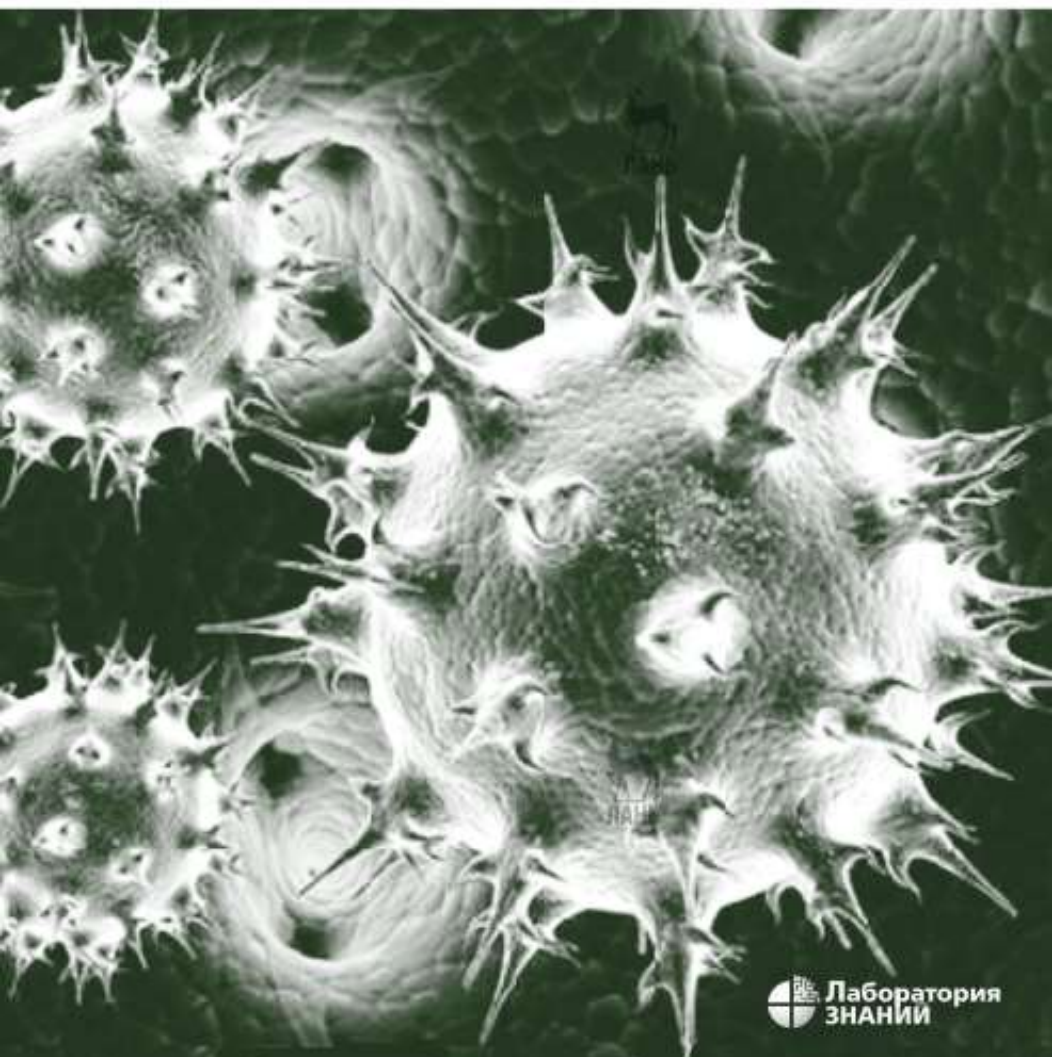


Под редакцией К. Джерома

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПО ЛЕННЕТУ



---

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА  
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ  
ПО ЛЕННЕТУ



World peace!

---

# LENNETTE'S LABORATORY DIAGNOSIS OF VIRAL INFECTIONS

Fourth Edition



Edited by  
Keith R. Jerome  
University of Washington  
Fred Hutchinson Cancer Research Center  
Seattle, Washington, U.S.A.



**informa**  
healthcare

---

New York · London

---

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПО ЛЕННЕТУ

Редактор К. Р. Джером

Перевод с английского  
под редакцией  
д-ра мед. наук, профессора В. Б. Белобородова,  
д-ра мед. наук, профессора А. Н. Лукашева  
и д-ра биол. наук Ю. Н. Хомякова

2-е издание, электронное



Москва  
Лаборатория знаний  
2022

Переводчики:

Е. Н. Колядина (гл. 9–14, 16–19), А. В. Любителей (гл. 1–8)  
и д-р биол. наук Ю. Н. Хомяков (гл. 15, 20–27)

Л12 **Лабораторная диагностика вирусных инфекций по Леннету /** под ред. К. Джерома ; пер. с англ. под ред. д-ра мед. наук, проф. В. Б. Белобородова, д-ра мед. наук, проф. А. Н. Лукашева и д-ра биол. наук Ю. Н. Хомякова. – 2-е изд., электрон. – М. : Лаборатория знаний, 2022. – 783 с. – Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". – Загл. с титул. экрана. – Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-975-6

Книга содержит исчерпывающую информацию о возбудителях вирусных инфекций и методах вирусологической лабораторной диагностики на основе синдромного подхода. Подробно описаны теоретические основы уже используемых в медицинской вирусологии молекулярно-генетических методов (серологические тесты, ПЦР и т. д.) и технологически новых, только входящих в медицинскую практику (микрочипы и электронно-микроскопические исследования). Достаточное внимание уделено проверке результатов исследований, а также правильной статистической обработке. Предложены способы адаптации некоторых методов диагностики при ограниченных финансовых возможностях лабораторий.

Для специалистов-вирусологов научных и практических диагностических лабораторий, а также при повышении квалификации врачей-инфекционистов, эпидемиологов, педиатров и врачей общей практики. Книга будет полезна для студентов-медиков, ординаторов и аспирантов.

УДК 578.7  
ББК 52.63

**Деривативное издание на основе печатного аналога:** Лабораторная диагностика вирусных инфекций по Леннету / под ред. К. Джерома ; пер. с англ. под ред. д-ра мед. наук, проф. В. Б. Белобородова, д-ра мед. наук, проф. А. Н. Лукашева и д-ра биол. наук Ю. Н. Хомякова. – М. : Лаборатория знаний, 2018. – 774 с. : ил., [4] с. цв. вкл. – ISBN 978-5-906828-36-1.



**В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации**

- © 2010 by Informa Healthcare USA, Inc Все права защищены. Авторизованный перевод англоязычного издания, опубликованного CRC Press, подразделением Taylor & Francis Group. All Rights Reserved. Authorized translation from English language edition published by CRC Press, an imprint of Taylor & Francis Group LLC
- © Перевод на русский язык. Лаборатория знаний, 2018

# КРАТКОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1. Проверка точности и достоверности лабораторных вирусологических тестов в клинической диагностической лаборатории</b> .....	<b>13</b>
<i>Х. Ф. Рабанау, Х. Х. Кесслер, Р. Б. Рэггам, Э. Бергер</i>	
<b>2. Статистический анализ результатов диагностических тестов.</b> ..	<b>26</b>
<i>Х. Джейнс, А. Магарет</i>	
<b>3. Методы молекулярной амплификации в диагностике вирусных инфекций</b> .....	<b>42</b>
<i>Д. Уили, Т. Слутс</i>	
<b>4. Генотипирование вирусов и секвенирование вирусных геномов</b> .....	<b>73</b>
<i>П. А. Ревилл, Д. С. Боуден, П. А. Уайт</i>	
<b>5. Разработка молекулярных вирусологических тестов</b> .....	<b>103</b>
<i>Н. Гоффман, М. Рошал</i>	
<b>6. Обнаружение вирусов при помощи микрочипов</b> .....	<b>127</b>
<i>Дж. Фокс</i>	
<b>7. Выделение вирусов</b> .....	<b>163</b>
<i>Д. Лиланд, М. Л. Лэндри</i>	
<b>8. Диагностика при помощи обнаружения вирусных антигенов</b> ..	<b>189</b>
<i>Б. Форгани</i>	
<b>9. Серологические тесты в клинической вирусологии</b> .....	<b>222</b>
<i>Р. Л. Ходинка</i>	
<b>10. Хирургическая патология и цитология вирусных инфекций.</b> ..	<b>247</b>
<i>Дж. Л. Карузо, Дж. М. Чайлдс, Д. Н. Хоуэлл</i>	
<b>11. Электронная микроскопия вирусных инфекций</b> .....	<b>278</b>
<i>С. Э. Миллер</i>	
<b>12. Лабораторная диагностика вирусов в условиях ограниченных ресурсов</b> .....	<b>312</b>
<i>Р. С. Ши, Д. М. Бендер, К. А. Петти</i>	
<b>13. Противовирусная терапия</b> .....	<b>332</b>
<i>Б. Ра, Д. Кимберлин, Р. Уитли</i>	
<b>14. Распространенные детские инфекции</b> .....	<b>357</b>
<i>Д. М. Зерр</i>	
<b>15. Респираторные вирусные инфекции</b> .....	<b>386</b>
<i>Р. Л. Этмар, С. Б. Гринберг</i>	
<b>16. Инфекции желудочно-кишечного тракта</b> .....	<b>428</b>
<i>Р. Л. Этмар, М. К. Эстес</i>	
<b>17. Инфекции кожи и слизистых оболочек</b> .....	<b>447</b>
<i>П. Раванфар, Н. Мендоза, А. Сатьяпракаш, Р. Крид, С. Тайринг</i>	

<b>18. Вирусные инфекции сердца и сосудов</b> .....	<b>471</b>
<i>Х.-П. Шультайсс, У. Кюль</i>	
<b>19. Вирусные гепатиты</b> .....	<b>491</b>
<i>Дж. Скотт, А. Заман, А. Чанг</i>	
<b>20. Вирусные геморрагические лихорадки</b> .....	<b>511</b>
<i>Й. Х. Кун, П. Б. Ярлинг, Ш. Р. Радошицки</i>	
<b>21. Инфекции центральной нервной системы</b> .....	<b>537</b>
<i>Дж. Л. Резнисек, К. С. Блох, Ю-В. Танг</i>	
<b>22. Инфекции, передающиеся половым путем</b> .....	<b>578</b>
<i>А. Уолд, П. Е. Грэвитт, Р. А. Морроу</i>	
<b>23. Вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2</b> .....	<b>601</b>
<i>Р. У. Кумбз</i>	
<b>24. Полиомавирус. Диагностика, репликация вируса и ход болезни</b> .....	<b>632</b>
<i>П. Синк, А. Дюмулен, Х. Х. Хириш</i>	
<b>25. Вирусные заболевания глаз</b> .....	<b>670</b>
<i>Т. Дж. Лизеган</i>	
<b>26. Арбовирусы</b> .....	<b>714</b>
<i>М. Нидриг, А. Ницше, О. Доносо-Мантке</i>	
<b>27. Вирусные инфекции у пациентов с нарушениями иммунной системы</b> .....	<b>730</b>
<i>С. Пергам, К. Р. Джером</i>	



- Бендер Д. М.** *Jeffrey M. Bender*  
Department of Pediatrics, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.
- Блох К. С.** *Karen C. Bloch*  
Departments of Medicine and Preventive Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.
- Боуден Д. С.** *D. S. Bowden*  
Victorian Infectious Diseases, Reference Laboratory, Victoria, Australia (BABS), University of New South Wales, Sydney, Australia
- Гоффман Н.** *Noah Hoffman*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.
- Гринберг С. Б.** *Stephen B. Greenberg*  
Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.
- Грэвитт П. Е.** *Patti E. Gravitt*  
Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- Джейнс Х.** *Holly Janes*  
Division of Public Health Sciences and Program in Biostatistics and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.
- Джером К. Р.** *Keith R. Jerome*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.
- Доносо-Мантке О.** *Oliver Donoso-Manthe*  
Robert Koch-Institut, Berlin, Germany
- Дюмулен А.** *Alexis Dumoulin*  
Transplantation Virology and Division of Diagnostics, Institute for Medical Microbiology, Department of Biomedicine, University of Basel, Basel, Switzerland
- Заман А.** *Atif Zaman*  
Department of Medicine, Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon, U.S.A.
- Зерр Д. М.** *Danielle M. Zerr*  
Department of Pediatrics, University of Washington and Seattle Children's Hospital, Seattle, Washington, U.S.A.
- Карузо Дж. Л.** *James L. Caruso*  
United States Navy and Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.
- Кюль У.** *Uwe Kühl*  
Medizinische Klinik II, Cardiology und Pneumology, Charite — Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany



- Кимберлин Д.** *David Kimberlin*  
Department of Pediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, U.S.A.
- Крид Р.** *Rosella Creed*  
Center for Clinical Studies, Houston, Texas, U.S.A.
- Кумбз Р. У.** *Robert W. Coombs*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.
- Кун Й. Х.** *Jens H. Kuhn*  
NIAID Integrated Research Facility at Fort Detrick (IRF-Frederick), Fort Detrick, Frederick, Maryland, and Tunnell Consulting, Inc., King of Prussia, Pennsylvania, U.S.A.
- Лизеган Т. Дж.** *Thomas J. Liesegang*  
Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, U.S.A.
- Лиланд Д.** *Diane Leland*  
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, U.S.A.
- Лэндри М. Л.** *Marie Louise Landry*  
Department of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, U.S.A.
- Магарет А.** *Amalia Magaret*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Program in Biostatistics and Vaccine Research and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, Washington, U.S.A.
- Мендоза Н.** *Natalia Mendoza*  
Center for Clinical Studies, Houston, Texas, U.S.A.
- Миллер С. Э.** *Sara E. Miller*  
Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.
- Морроу Р. А.** *Rhoda A. Morrow*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Seattle Children's, Seattle, Washington, U.S.A.
- Нидриг М.** *Matthias Niedrig*  
Robert Koch-Institut, Berlin, Germany
- Ницше А.** *Andreas Nitsche*  
Robert Koch-Institut, Berlin, Germany
- Пергам С.** *Steven A. Pergam*  
Department of Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred, Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.
- Петти К. А.** *Cathy A. Petti*  
Department of Pathology, University of Utah School of Medicine, Associated Regional University Pathologists (ARUP) Laboratories, and Department of Medicine, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.

- Ра Б.** *Brian Rha*  
Department of Pediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, U.S.A.
- Рабенау Х. Ф.** *Holger F. Rabenau*  
Institute for Medical Virology, Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt, Main, Germany
- Раванфар П.** *Parisa Ravanfar*  
Department of Dermatology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, New Hampshire, U.S.A.
- Радошицки Ш. Р.** *Sheli R. Radoshitzky*  
United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, U.S.A.
- Ревилл П. А.** *P. A. Revill*  
Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Victoria, Australia
- Резнисек Дж. Л.** *Julie E. Reznicek*  
Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.
- Рошал М.** *Misha Roshal*  
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.
- Сатьяпракаш А.** *Anita Satyaprakash*  
Center for Clinical Studies, Houston, Texas, U.S.A.
- Синк П.** *Paola Cinque*  
Clinic of Infectious Diseases, San Raffaele Hospital, Milan, Italy
- Скотт Дж.** *John Scott*  
Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.
- Слутс Т.** *Theo P. Sloots*  
Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory, Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Queensland; Children's Medical Research Institute, Children's Health Service District, Brisbane, Queensland, Australia
- Тайринг С.** *Stephen Tyring*  
Center for Clinical Studies, Houston, Texas, U.S.A.
- Танг Ю-В.** *Yi-Wei Tang*  
Departments of Pathology and Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.
- Уайт П. А.** *P. A. White*  
School of Biotechnology and Biomolecular Sciences (BABS), University of New South Wales, Sydney, Australia
- Уили Д.** *David M. Whitley*  
Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory, Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Queensland; Children's Medical Research Institute, Children's Health Service District, Brisbane, Queensland, Australia
- Уитли Р.** *Richard Whitley*  
Department of Pediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, U.S.A.

- Уолд А.** *Anna Wald*  
Departments of Medicine, Laboratory Medicine, Epidemiology, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.
- Фокс Дж.** *Julie Fox*  
Department of Microbiology and Infectious Diseases, University of Calgary and Provincial Laboratory for Public Health (ProvLab), Calgary, Alberta, Canada
- Форгани Б.** *Bagher Forghani*  
Viral Immunoserology Section, Viral and Rickettsial Disease Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California, U.S.A.
- Хирш Х. Х.** *Hans H. Hirsch*  
Transplantation Virology and Division of Diagnostics, Institute for Medical Microbiology, Department of, Biomedicine, University of Basel, and Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University, Hospital of Basel, Basel, Switzerland
- Ходинка Р. Л.** *Richard L. Hodinka*  
Departments of Pathology and Pediatrics, Clinical Virology Laboratory, Children's Hospital of Philadelphia and University of Pennsylvania School of Medicine, Pennsylvania, Philadelphia, U.S.A.
- Хоуэлл Д. Н.** *David N. Howell*  
Duke University Medical Center and Veterans Affairs Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.
- Чайлдс Дж. М.** *John M. Childs*  
United States Navy and Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.
- Чанг А.** *Michael Chang*  
Department of Medicine, Portland VA Medical Center, Portland, Oregon, U.S.A.
- Ши Р. С.** *Rosemary C. She*  
Department of Pathology, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.
- Шультайсс Х.-П.** *Heinz-Peter Schultheiss*  
Medizinische Klinik II, Cardiology und Pneumology, Charite — Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
- Эстес М. К.** *Mary K. Estes*  
Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.
- Этмар Р. Л.** *Robert L. Atmar*  
Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.
- Ярлинг П. Б.** *Peter B. Jahrling*  
NIAID Integrated Research Facility at Fort Detrick (IRF-Frederick), Fort Detrick, Frederick, Maryland, U.S.A.

## ПОСВЯЩЕНИЕ ЭДВИНУ А. ЛЕНNETУ

Эдвин Леннет родился 11 сентября 1908 г. в Питтсбурге (шт. Пенсильвания, США) и умер от дыхательной недостаточности после операции 1 октября 2000 г. Эти сухие и холодные факты ничего не способны сказать об этом замечательном человеке и его непростой жизни.

Он получил степень бакалавра в университете Чикаго в 1931 г., а докторскую степень — в 1935 г. Его докторская диссертация была едва ли не первой среди защищенных по дисциплине «Вирусология». Впоследствии Эдвин получил степень доктора медицины в Медицинском колледже Раша (подразделение Чикагского университета) в 1936 г. и после прохождения интернатуры некоторое время работал на кафедре патологии медицинского факультета Вашингтонского университета в Сент-Луисе, а также в лабораториях Рокфеллеровского университета в Нью-Йорке.

В это время в Фонде Рокфеллера работали над проблемами, связанными с желтой лихорадкой, и Международный отдел здравоохранения Фонда отправил Эдвина в Бразилию, где он провел весь период Второй мировой войны, изучая вирусы—возбудители желтой лихорадки и энцефалита.

В 1944 г. его перевели в лабораторию в Беркли (шт. Калифорния, США) для работы по изучению возбудителей вирусного гепатита и энцефалита. В 1947 г. Эдвин стал ее директором, чему предшествовал год работы в качестве начальника медико-ветеринарного отдела на военной базе в Форте Детрик (г. Фредерик, шт. Мэриленд, США).

За 31 год, прошедший с этого момента, Эдвин превратил свою лабораторию во всемирно известный центр подготовки и одну из ведущих лабораторий по диагностике вирусных и риккетсиозных заболеваний. Эта лаборатория занималась исследованиями лихорадки Q и клещевого энцефалита, полиовирусов и прочих возбудителей инфекций, а также роли вирусных инфекций в развитии онкологических заболеваний человека. Многие вирусологи, прошедшие подготовку в этой лаборатории, стали впоследствии всемирно известными специалистами в диагностических лабораториях по всему миру. Помимо этой деятельности Эдвин также был консультантом множества



Эдвин Леннет (1908–2000)

правительственных агентств и принимал участие в работе целого ряда комиссий.

За время своей научной работы Эдвин опубликовал множество статей и был редактором нескольких книг, ставших классическими. Среди них «Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections», над которой он работал совместно с докторами Натали Шмидт и Ричардом Эммонсом.

После ухода в отставку в 1978 г. Эдвин стал председателем Калифорнийского фонда здравоохранения, а в 1981–1982 гг. был директором Центра клеточной биологии им. Алтона Джонса в Лейк-Плэсиде (шт. Нью-Йорк, США).

Я, безусловно, много слышал о легендарном Эдвине Леннете и его многочисленных достижениях, однако лично мне удалось познакомиться с ним только в конце 1980-х гг., хотя ранее доводилось принимать участие в написании глав его книги по вирусологической диагностике. Несмотря на мой трепет перед встречей со столь уважаемым ученым и почтенным человеком, Эдвин смог быстро избавить меня от скованности. Я не перестаю им восхищаться и по сей день.

Его энциклопедические познания и необычайно остроумные практические находки были великолепны. До самого конца он отстаивал идею того, что из любого опыта следует извлекать знания, отвергая чисто технический подход, столь распространенный ныне в некоторых областях диагностики. Когда я, будучи редактором журнала «Virus Diseases», издаваемого ProMED-mail, советовал автору статьи пересмотреть его трактовку результатов и перепроверить их с использованием более старого, но надежного метода, или просто когда я высказывался, как мне потом казалось, неверно, я всегда мог рассчитывать на телефонный звонок или электронное письмо от Эдвина, в котором он говорил бы нечто вроде «так держать, молодой человек!».

Так же как я наслаждался рассказами об опытах Эдвина и чтением его ранних статей в соавторстве с Хилари Копровски, Биллом Хэммоном и другими основателями вирусологии, я наслаждался и его обществом. Эдвин был весьма суров и не терпел фамильярности ни от кого, а сам был очень дипломатичным и вежливым. Он отличался прекрасным чувством юмора, вел насыщенную общественную жизнь, щедро распоряжался своим временем и был терпелив по отношению к молодежи. Несмотря на все печали и разочарования в своей жизни, Эдвин сумел сохранить жизнелюбие. Он был одним из главных людей в моей жизни и в жизни многих других, а его дело продолжает жить, о чем свидетельствует настоящая книга.

Чарльз Кэлишер

## ВВЕДЕНИЕ

При редактировании последнего издания «Лабораторной диагностики вирусных инфекций» большим удовольствием было узнавать новое о предыдущем редакторе этой книги — Эдвине Леннете. Несмотря на то что я никогда не был знаком с ним лично, истории и анекдоты о нем, рассказанные теми людьми, которые его знали, дали мне ощущение почти личного знакомства. В то же время я должен был справиться с задачей практически недостижимой — удержать невероятно высокую планку, заданную Эдвином, великолепным диагностом и ученым. Заменить собой Эдвина в этом качестве я не надеялся, но сделал все возможное для того, чтобы текст этой книги содержал как можно более полную и подробную информацию о столь любимой им дисциплине. Для того чтобы почтить заслуги Эдвина, название настоящего издания было изменено на «Лабораторную диагностику вирусных инфекций по Леннету».

Одной из самых сложных задач при подборе материала книги было найти нишу, не занятую ни одним из уже изданных руководств по вирусологии. Для этого текст пришлось подвергнуть значительной переработке. Первая часть книги практически не отличается от предыдущих изданий, в ней детально описаны различные технологии, лежащие в основе современной диагностической вирусологии. Преподнести материал второй части было гораздо труднее. Наиболее простым решением для ее построения было бы перечисление семейств вирусов и их клинических проявлений, однако такой подход уже устарел. Мы решили использовать синдромный подход, как предложил мой коллега, доктор Йи-Вей Тан. К примеру, если у пациента симптомы вирусного энцефалита, читатель может найти полезные для диагностики сведения в главе, посвященной инфекциям ЦНС, где в дифференциальной форме изложены диагнозы для всех возможных возбудителей, а также оптимальные методики лабораторной диагностики. Хотя такая реорганизация материала возлагала на нас задачу не допустить избыточности или пропусков, я считаю, что этот подход сделает книгу особенно ценной для студентов, изучающих диагностику различных заболеваний, а также для лаборантов.

Клиническая вирусология сильно изменилась за прошедшие с момента последней публикации этой книги 10 лет, поэтому настоящее издание было практически полностью переписано. Важность молекулярных подходов в диагностике продолжает возрастать, и подобным методикам посвящено несколько глав, касающихся различных тем, среди которых — разработка молекулярных тестов, генотипирование и секвенирование вирусных геномов, а также использование микрочипов в диагностике. Еще одна актуальная тема — появление глобальных проблем, связанных с вирусологией, что отражено в новой главе о диагностике вирусных инфекций в условиях ограниченной

доступности оборудования и расходных материалов. Продолжается также выявление взаимосвязей между вирусами и клинической симптоматикой, что обсуждается в главах, посвященных респираторным инфекциям, полиомавирусным инфекциям, геморрагическим лихорадкам, а также во многих других разделах книги.

При подготовке настоящего издания неоценимой оказалась помощь сотрудниц издательства «Infogma» Марии Лоруссо, которая первой привлекла мое внимание к проекту, и Эйми Лассен, взявшей на себя многочисленные организационные вопросы во время работы над книгой. Я также хотел бы поблагодарить моего коллегу, доктора Роду Морроу, за советы и поддержку в ходе работы над проектом.

В предисловии к предыдущему изданию Эдвин говорил о том, что данная книга предназначена для лаборанта в качестве справочной информации при диагностике вирусной инфекции. Это же осталось целью и нового издания, достичь которой было нелегко из-за быстро меняющихся методик, непрерывного обнаружения новых вирусов и появления доказательств вирусной природы клинических синдромов. Я надеюсь, что читатели этого нового издания найдут книгу полезной и хотя бы немного разделят энтузиазм Эдвина по отношению к непрерывно развивающейся и неизменно восхитительной науке вирусологии.

Кит Р. Джером



# 1 ПРОВЕРКА ТОЧНОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

**Х.Ф. Рабенау**

Holger F. Rabenau, Institute for Medical Virology, Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt/Main, Germany

**Х.Х. Кесслер и Р.Б. Рэггам**

Harald H. Kessler and Reinhard B. Raggam, Molecular Diagnostics Laboratory, Institute of Hygiene, Microbiology, and Environmental Medicine, Medical University of Graz, Austria

**Э. Бергер**

Annemarie Berger, Institute for Medical Virology, Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt/Main, Germany

## ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенные методы диагностики вирусов включают в себя как прямые, так и непрямые способы их обнаружения. Непрямое обнаружение вирусов осуществляется главным образом в результате серологических исследований. Методы прямого выявления вирусов включают в себя определение вирусных антигенов, вирусных частиц или их компонентов при помощи выделения вирусов в культурах клеток (либо в лабораторных животных), а также анализ нуклеиновых кислот вирусов. Морфологию вирусов можно также изучать при помощи трансмиссионной электронной микроскопии.

На сегодняшний день выявление нуклеиновых кислот играет решающую роль в диагностике вирусов. Молекулярные методики используются во многих, если не в подавляющем большинстве вирусологических лабораторий. Технологические усовершенствования, начиная от автоматизации подготовки образцов и заканчивая технологией автоматической амплификации, дают возможность разработки и внедрения в клиническую практику методик выявления большинства вирусов. Риск загрязнения образца в последнее время существенно снизился, а время, необходимое для получения результата, заметно сократилось. Однако стандартизация и методики контроля качества и проверки результатов в последние годы оставались без должного внимания и сейчас требуют усовершенствования.

Следует помнить, что качественная диагностика в вирусологии требует дополнительных подготовительных мероприятий, таких как выбор правильного материала для проб, оптимального времени отбора образцов для анализа в соответствии со стадией течения заболевания,



а также сокращения времени транспортировки образцов в диагностическую лабораторию.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И ПРОВЕРКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Действующие на сегодняшний день требования к медицинским лабораториям регламентированы международным стандартом ISO 15189. Вот уже несколько редакций подряд этот стандарт включает в себя методики проверки результатов и контроля их качества. Для диагностических лабораторий в США FDA (Федеральное управление по контролю качества продуктов и лекарственных средств) разработало правила, основанные на существующих стандартах ISO [1].

Директива Европейского союза относительно медицинских приборов для диагностики *in vitro* (*In vitro diagnostics, IVD*) требует от производителя предоставления данных о том, что прибор соответствует заявленным показателям и не утратит этого соответствия после хранения, транспортировки и установки на месте эксплуатации [2].

Системы контроля качества внедрены в большинстве диагностических лабораторий. В отличие от сертификации, которая в первую очередь основана на надзоре, описании и проверке различных процессов, при аккредитации обращают дополнительное внимание на способность лаборатории получать верные результаты и возможность правильно их интерпретировать.

Контроль качества требует ведения в лаборатории строгой отчетности. Для каждого теста или тест-системы должна существовать стандартная методика работы (SOP, *standard operation procedure*) и должны быть представлены способы проверки получаемых результатов (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Первичная проверка и подтверждение достоверности данных вирусологических тестов и тест-систем

### Проверка точности и достоверности тестов или тест-систем, применяемых в диагностической лаборатории

Использование подходящего метода не всегда гарантирует правильность его исполнения и достоверность результатов. Стандарт ISO 15189, директива IVD 98/79/EC и правила FDA требуют проверки

точности и достоверности каждой процедуры исследования для обеспечения использования той или иной методики по назначению и для правильности ее проведения. Сложность и объем применяемых для проверки подходов различаются в зависимости от того, проверяется ли с их помощью тест, соответствующий требованиям IVD/CE и/или FDA, либо тест, разработанный в конкретной диагностической лаборатории и проверки на соответствие указанным требованиям не прошедший. Для проведения диагностики с использованием подобных тестов или тест-систем следует отдавать предпочтение приборам и реагентам, рекомендованным FDA. Использование в диагностических целях любых реагентов, маркированных «только для исследовательских целей» («*Research use only*», RUO), в США запрещено для любого теста или тест-системы, применяемых в клинической диагностической лаборатории. В Европе один или более реагентов с такой маркировкой может быть использован в диагностических тест-системах после проверки достоверности получаемых результатов. Как термин «медицинское устройство для диагностики *in vitro*», используемый в директиве IVD 98/79/ЕС, так и термин «прибор», используемый в нормативных актах FDA, может означать не только тест, но также и тест-систему в том случае, если для получения результата необходимо более одного компонента. Так, диагностические системы, базирующиеся на методе ПЦР, требуют для проведения анализа множества реактивов и приборов для выделения ДНК, амплификации и анализа ПЦР-продуктов.

Проверка точности и достоверности результатов необходима при внедрении теста или тест-системы в повседневную клиническую практику диагностической лаборатории (см. рис. 1.1). Проведение одной или обеих указанных процедур требуется и при внесении изменений в существующие диагностические методики [3].

Производитель коммерческих тестов или тест-систем, регламентированных FDA и/или IVD/CE, должен гарантировать достижение заявленных параметров системы после ее доставки и установки на месте использования. Тем не менее это не освобождает конечного пользователя от необходимости проверки характеристик результатов такого теста или тест-системы, в особенности таких, как правильность и точность (табл. 1.1). Правильность (по старой номенклатуре — правдивость) может быть выражена как отношение измеренного или вычисленного значения параметра к его истинному значению и вычисляется с использованием литературных данных или эталонного метода (рис. 1.2). Только эти два подхода допустимы при анализе правильности. При невозможности использования ни одного из них следует выбрать другой способ для установления степени правильности методики. Неточность определяется как разброс отдельных результатов теста как внутри одной выборки, так и в разных. Неточность чаще всего характеризуется с помощью стандартного отклонения и коэффициента вариации. В случае если тест или тест-система предоставляет количественные результаты, необходима также проверка на линейность (см. табл. 1.1).

	Правильный и точный
	Неправильный, но точный
	Неточный, но правильный
	Неточный и неправильный

Рис. 1.2. Точность и правильность результатов

Таблица 1.1

Минимальные требования при первичной проверке и подтверждении достоверности тестов и тест-систем в клинической вирусологии

Проверка точности и достоверности (верификация)	Подтверждение точности и достоверности (валидация)
Точность	Точность
Стандартное отклонение (внутри выборки и между выборками)	Воспроизводимость
Линейность (для количественных методов)	Селективность
	Стандартное отклонение (внутри выборки и между выборками)
	Линейность (для количественных методов)

Линейность подразумевает определение диапазона, в котором получаемые данные имеют линейную зависимость от истинного значения определяемого параметра. Данные тестов на линейность должны подвергаться анализу линейной регрессии с идеальным коэффициентом регрессии в 1. В случае нелинейности кривой следует пользоваться любым достоверным статистическим методом [4].

Если диагностическая лаборатория использует тесты или тест-системы, не регламентированные IVD/CE и/или FDA, или использует не предполагавшуюся производителем комбинацию таких тестов,

то она сама выступает в качестве производителя, а следовательно, несет ответственность за качество получаемых результатов и их пригодность для диагностических целей. Тесты и тест-системы, используемые такой лабораторией, должны пройти проверку достоверности результатов, включающую в себя проверки точности, правильности, воспроизводимости, селективности и — для количественных методов — линейности (см. табл. 1.1). Проверка воспроизводимости (аналитической чувствительности) подразумевает анализ биологических образцов с заранее известным количеством аналита. Селективность (аналитическая специфичность) отражает способность метода определять присутствие (и количество в случае систем количественного анализа) аналита в сложных смесях биологического материала, называемых фоном. Для селективного теста должна быть исключена любая возможность перекрестной реакции с любым аналитом, помимо того, для определения которого он предназначен. Исследования по взаимодействию аналитов позволяют оценить влияние на результаты тестирования различных веществ, таких как гемоглобин, ревматоидный фактор, аутоантитела, частички материала инструментов для сбора и хранения проб и наиболее часто применяемые при данном заболевании лекарственные препараты. Важно упомянуть, что использование внутреннего контроля (см. ниже) позволяет производить дополнительную проверку для каждого анализа по отдельности на возможное влияние компонентов пробы и таким образом увеличить достоверность теста или тест-системы, основанных на анализе нуклеиновых кислот.

Минимальные требования для процедур контроля точности и достоверности результатов вирусологических тестов описаны в последующих разделах. В том случае, если материал для калибровки труднодоступен или если метод основывается на научной публикации, можно применять упрощенную процедуру проверки. Обычно для калибровки служат референтные образцы, собираемый у пациентов биоматериал или пулы сывороток. При использовании для калибровки образцов от пациентов или пулов сывороток пробы должны быть заранее исследованы с применением наиболее точного и достоверного метода из уже применяемых («золотого стандарта»). Калибровочные образцы могут быть положительными, слабopоложительными и отрицательными. Для тестов и тест-систем на вирусные антигены и вирусспецифичные антитела положительные образцы определяются как образцы с концентрацией аналита, в три и более раз превышающей нижний порог чувствительности метода или порог количественного анализа (см. ниже), и находящиеся ниже верхней границы линейности; слабopоложительными называют образцы с содержанием аналита, не превышающим более чем в три раза порога чувствительности или порога количественного анализа. Для тестов на нуклеиновые кислоты положительными пробами считаются те, в которых концентрация аналита превышает величину, равную 10 в степени значения порога чувствительности метода или порога количественного анализа,

и лежит в пределах участка линейности, тогда как слабоположительными называют пробы с концентрацией аналита, не превышающей этого значения на порядок. Если для проведения проверки требуется более одного положительного контроля, в таких контролях должны быть использованы разные концентрации аналитов.

Минимальные требования, кратко освещенные в этой главе, применимы для всех процедур проверки точности и достоверности в клинической вирусологии. Тем не менее тесты и тест-системы, предназначенные для выявления патогенов списка А приложения II Директивы 98/79/ЕС (вирус иммунодефицита человека 1 и 2, Т-лимфотропный вирус человека типов I и II, вирусы гепатита В, С и D), здесь не рассматриваются в силу действующих для них специальных нормативов (статья 9 Директивы 98/79/ЕС). Технические параметры, принятые для таких тестов и тест-систем, изложены в решениях Еврокомиссии от 7 мая 2002 г. [5]

### **Минимальные требования к проверке достоверности результатов регламентированных FDA и/или IVD/CE тестов и тест-систем, предназначенных для определения вирусспецифичных антител, вирусных антигенов и нуклеиновых кислот вирусов**

При внедрении регламентированного IVD/CE теста или тест-системы для обнаружения вирусспецифичных антител или вирусных антигенов либо теста на нуклеиновые кислоты в диагностическую лабораторную практику производят эксперименты по проверке правильности, точности и (для количественных тест-систем) линейности (табл. 1.2). Для определения точности используют три положительных, три слабоположительных и три отрицательных контроля. Для качественной системы для оценки отклонений отдельного эксперимента (теста) используют одну положительную и одну слабоположительную пробу. Каждый образец исследуют трижды. Для определения отклонений между повторами эксперимента (теста) используют один положительный и один слабоположительный образец. Каждый образец исследуют по одному разу в течение трех разных дней. Для оценки разброса результатов отдельного эксперимента при использовании количественного теста или тест-системы, определяющих вирусспецифичные антитела или вирусные антигены, используют четыре положительных и три слабоположительных образца; для оценки разброса между повторами эксперимента используют два положительных и один слабоположительный образец. Для тестов на нуклеиновые кислоты рекомендуется использовать три положительных и три слабоположительных образца для оценки разброса внутри отдельного эксперимента и по одному положительному и слабоположительному образцу для оценки разброса между повторами эксперимента.

В целях оптимизации процесса проверки допустимо принять первый результат теста разброса внутри эксперимента и в качестве пер-

Таблица 1.2

Проверка точности регламентированных IVD/CE и/или FDA тестов и тест-систем, определяющих вирусспецифичные антитела, вирусные антигены, а также тестов на нуклеиновые кислоты

		Необходимое количество образцов			
		Определение вирусспецифичных антигенов		Тесты на нуклеиновые кислоты	
Параметр	Тип образца	Качественный тест	Количественный тест	Качественный тест	Количественный тест
Точность	Положительный <sup>а</sup>	3	3	3	3
	Слабopоложительный <sup>б</sup>	3	3	3	3
	Отрицательный	3	3	3	3
Разброс внутри отдельного эксперимента	Положительный <sup>а</sup>	1	4	1	3
	Слабopоложительный <sup>б</sup>	1	3	1	3
Разброс между повторами эксперимента	Положительный <sup>а</sup>	1	2	1	1
	Слабopоложительный <sup>б</sup>	1	1	1	1
Линейность	Положительный <sup>а</sup>	0	1	0	1

<sup>а</sup> Более чем на порядок выше нижнего предела чувствительности метода или предела количественного анализа и в пределах участка линейности результатов.

<sup>б</sup> Не более чем на порядок выше нижнего предела чувствительности или предела количественного анализа теста или тест-системы.

вого результата теста разброса между повторами эксперимента, что позволит для завершения оценки разброса между повторами эксперимента провести тест только два раза. Для количественных тестов и тест-систем требуется проверка линейности — определение количества аналита в серии кратных (как правило, десятикратных) разведений положительной пробы (не менее трех последовательных разведений), выполняемое для двух повторов каждой точки.

Рекомендуется также следить за результатами, получаемыми с использованием регламентированных IVD/CE и/или FDA тестов и тест-систем, и после их внедрения в диагностическую практику. Для этого используют дополнительный контрольный образец, независимый от положительных контрольных образцов, предоставляемых поставщиком теста или тест-системы, и применяемый либо при каждом использовании теста, либо через определенные временные интервалы. При внедрении новой тест-системы различие результатов, получаемых для дополнительного контрольного образца и для положительных проб, предоставляемых производителем, позволяет на ранней стадии выявить критические ошибки (рис. 1.3). Полезно также про-

вести статистический анализ результатов, получаемых для дополнительного контрольного образца и для положительных контролей.



**Рис. 1.3.** Использование дополнительного контрольного образца в тесте для выявления нуклеиновых кислот (стрелки обозначают введение нового образца)

### Минимальные требования к проверке точности результатов разработанных в лаборатории тестов и тест-систем, предназначенных для определения вирусспецифических антител, вирусных антигенов и нуклеиновых кислот

Для разработанного в лаборатории теста или тест-системы, предназначенных для определения вирусспецифических антител, вирусных антигенов и нуклеиновых кислот в диагностической практике, эксперименты по проверке точности результатов включают проверку правильности, воспроизводимости, селективности, разброса и (для количественных систем) линейности (табл. 1.3). Для определения правильности используют три положительных, три слабоположительных и три отрицательных образца. Для установления воспроизводимости используют 10 положительных и 10 слабоположительных проб. Селективность теста на вирусспецифические антитела определяют анализом 10 отрицательных проб, включающих антитела, способные давать перекрестные реакции. Для тестов на вирусные антигены и нуклеиновые кислоты используют 10 отрицательных проб, содержащих материал вирусов того же семейства и материал, способный приводить к перекрестным реакциям. Каждый анализ, потенциально ведущий к перекрестным реакциям, должен присутствовать в больших концентрациях (не менее  $10^5$  ЦПЕ<sub>50</sub>/мл (50% цитопатогенных единиц, TCID<sub>50</sub>, от англ. *tissue culture infective dose*) или  $10^5$  геномных эквивалентов в 1 мл). Помимо этого, для проверки селективности требуется 10 слабоположительных образцов, в том числе, например,

образцы с повышенным содержанием гемоглобина, положительные на ревматоидный фактор и/или содержащие аутоантитела. Определение разброса внутри выборки и между выборками сходно с таковым для процедур проверки достоверности результатов, за исключением большего числа положительных проб при проверке количественных тестов (шесть положительных проб вместо трех для определения разброса внутри отдельного эксперимента и две вместо одной для определения разброса между повторами эксперимента). Для количествен-

Таблица 1.3

**Проверка точности результатов разработанного в лаборатории теста или тест-системы, определяющих вирусспецифичные антитела, вирусные антигены и нуклеиновые кислоты**

		Необходимое количество образцов			
		Определение антител или антигенов		Тесты для выявления нуклеиновых кислот	
Параметр	Тип образца	Качественный тест	Количественный тест	Качественный тест	Количественный тест
Точность	Положительный <sup>a</sup>	3	3	3	3
	Слабopоложительный <sup>b</sup>	3	3	3	3
	Отрицательный	3	3	3	3
Степень выделения	Положительный <sup>a</sup>	10	10	10	10
	Слабopоложительный <sup>b</sup>	10	10	10	10
Селективность	Отрицательный <sup>a</sup>	10	10	10	10
	Слабopоложительный <sup>b,г</sup>	10	10	10	10
Разброс внутри выборки	Положительный <sup>a</sup>	1	6	1	6
	Слабopоложительный <sup>b</sup>	1	3	1	3
Разброс между выборками	Положительный <sup>a</sup>	1	2	1	2
	Слабopоложительный <sup>b</sup>	1	1	1	1
Линейность	Положительный <sup>a,д</sup>	0	2	0	2

<sup>a</sup> Более чем на порядок выше нижнего предела чувствительности метода или предела количественного анализа и в пределах участка линейности результатов.

<sup>b</sup> Не более чем на порядок выше нижнего предела чувствительности или предела количественного анализа теста или тест-системы.

<sup>г</sup> Образцы, способные давать перекрестные реакции.

<sup>г</sup> Образцы, содержащие вещества, способные исказить результат.

<sup>д</sup> Последовательные разведения (не менее четырех) двух образцов, исследованные в двух повторях на каждую точку и дважды в разные рабочие дни



ного теста или тест-системы, разработанных в лаборатории, требуется также проверка линейности, включающая анализ серии последовательных разведений (не менее четырех) двух положительных образцов с двумя повторами каждой точки, воспроизведенных в два разных рабочих дня.

### **Процедуры, необходимые для внедрения разработанного в лаборатории теста для выявления нуклеиновых кислот в диагностическую практику**

При разработке теста для выявления нуклеиновых кислот последовательности используемых в нем праймеров и зондов должны проходить тщательную проверку по базе данных геномов. В качестве дополнительных мер проверки следует секвенировать продукт амплификации, получаемый в тесте. Также рекомендуется использовать пару праймеров, публиковавшуюся в авторитетном журнале, чтобы уменьшить объем необходимых исследований для подтверждения специфичности. Тем не менее такие праймеры следует сравнивать с выровненными известными геномными последовательностями патогена для подтверждения правильности опубликованной последовательности.

Кроме того, необходимо подвергать проверке такие составляющие теста, как использованный молекулярно-биологический метод, способ определения результата, наличие внутреннего контроля и метод количественного определения. Автоматизация позволяет свести к минимуму ошибки молекулярно-биологического метода, вызванные человеческим фактором. Для обеспечения специфичности по отношению к анализу результатов требуется внедрение распознавания зонда, поскольку анализ кривой плавления без зондов не обеспечивает нужной специфичности. Поскольку амплификация может оказаться неудачной из-за наличия ингибиторов в пробе, каждый тест должен включать в себя внутренний контроль, позволяющий исключить ложноотрицательные результаты. Для обеспечения контроля теста на нуклеиновые кислоты вируса на всех его этапах внутренний контроль следует вносить в образцы до выделения нуклеиновой кислоты. Для этих целей допускается применение как гомологичного, так и гетерологичного внутреннего контроля. Гомологичным внутренним контролем может служить ДНК (для тестов, задействующих амплификацию ДНК) или РНК-транскрипт, полученный *in vitro* (для РНК-тестов), который содержит сайты отжига праймеров, идентичные таковым в целевой последовательности. Эти сайты фланкируют случайную последовательность, по нуклеотидному составу близкую к последовательности выявляемого вируса, а также сайт связывания зонда, позволяющий отличить продукты амплификации внутреннего контроля от продуктов амплификации целевой последовательности. Таким образом можно изготовить как единичный внутренний контроль, так и серию контролей для набора тестов [6, 7]. В отличие

от гомологичного контроля, гетерологичный контроль представляет другую амплификационную систему в том же реакционном объеме. Контроль должен иметь такие же, как у целевой последовательности, или близкие эффективности выделения нуклеиновой кислоты и амплификации. В качестве гетерологичного контроля удобно использовать стандартные референсные гены эукариот (гены «домашнего хозяйства», *housekeeping genes*) или плазмиды [8]. Как гомологичный, так и гетерологичный контроль вносят в пробу в небольшой концентрации во избежание конкуренции с целевой последовательностью за компоненты реакционной смеси. При разработке тестов, основанных на ПЦР, следует избегать количественного анализа по конечной точке; вместо этого можно использовать одну из точек логарифмической фазы амплификации.

### **Дополнительные этапы проверки точности результатов разработанных в лаборатории тестов или тест-систем**

При проверке разработанного в лаборатории теста или тест-системы следует установить предел чувствительности или предел количественного анализа. Пределом чувствительности называют минимальную концентрацию аналита, которую при помощи метода можно достоверно определить как присутствующую в образце, а пределом количественного анализа — минимальную концентрацию, для которой возможно достоверное определение количества аналита в пробе. Определение этих пределов должно быть четко прописано в протоколе проверки точности системы. Ранее был опубликован частично непараметрический подход к определению таких пределов [9]. Если контрольного (референсного) материала не существует, определение этих пределов невозможно. Для таких случаев при внедрении теста в диагностическую практику предпочтительно применять его в формате ПЦР в реальном времени, позволяющем получить по крайней мере полуколичественные результаты [10, 11].

Помимо этого, следует проводить тесты на диагностическую правильность, особенно в случае если исходный тест был модифицирован или заменен. Тест на диагностическую правильность включает сравнение результатов, полученных с использованием проверяемого теста или тест-системы, с результатами эталонного метода. Для проверки диагностической правильности тоже должен быть исследован ряд параметров [12]. Диагностическая правильность подразумевает диагностическую чувствительность (способность выявлять пациентов с интересующим состоянием) и диагностическую специфичность (способность метода давать разные результаты при обследовании больных с интересующим состоянием и без него). В клинической вирусологии минимальное требование при проверке диагностической правильности — сравнение результатов проверяемого и эталонного методов. Такое сравнение должно быть проведено для 20 образцов (семь положительных, шесть слабоположительных и семь отрицательных).

## Проверка достоверности выделения вирусов на клеточных культурах

Выделение вирусов с использованием клеточных культур представляет собой трудностандартизуемый метод, что делает его проверку особенно актуальной. Прежде всего нужно проверить, подходит ли культура клеток для выделения данного вируса. При внедрении клеточной культуры в качестве индикаторной системы ее необходимо протестировать на чувствительность как к эталонному вирусу из коллекции микроорганизмов, так и к штаммам дикого типа, взятым в двух концентрациях. После раститровки стока вируса инокуляты для проверки восприимчивости культуры должны содержать 0,1 (положительный контроль) и 0,01 (слабоположительный контроль) инфекционной дозы на клетку. Исследования должны быть проведены в трех повторах на каждую точку и воспроизведены в три разных рабочих дня. Определение разброса производят с использованием 20 штаммов дикого типа, тестируемых параллельно на классически используемой и внедряемой клеточных линиях (табл. 1.4). Жизнеспособность клеток и влияние материала пробы на развитие цитопатогенного действия тщательно отслеживают и фиксируют.

Таблица 1.4

### Проверка методов выделения вирусов на клеточных культурах

Параметр	Тип образца	Необходимое количество образцов
Чувствительность	Положительный <sup>a</sup>	1
	Слабоположительный <sup>b</sup>	1
Разброс	Дикий тип	20

<sup>a</sup> 0,1 инфекционной дозы на клетку.  
<sup>b</sup> 0,01 инфекционной дозы на клетку

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение нового теста или тест-системы в лабораторную практику требует тщательной проверки точности и достоверности получаемых с их помощью результатов на соответствие стандартам, заложенным в системе управления качеством, и соответствие требованиям ISO 15189 и/или FDA. Тест или тест-система, регламентированные IVD/CE и/или FDA, требуют только проверки точности результатов, тогда как для системы, разработанной в диагностической лаборатории, важна проверка и диагностической пригодности, и точности результатов. Тем не менее ни одна из этих процедур не дает полной гарантии постоянной корректности результатов, что обуславливает необходимость регулярного контроля качества непосредственно в диагностической лаборатории.

## ЛИТЕРАТУРА

1. U.S. Food and Drug Administration Website. <http://www.fda.gov>. Accessed August 25, 2009.
2. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official J Eur Communities 1998; L331:1-37.
3. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol 2007; 40:93-98.
4. Linnet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods — With statistical techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. St. Louis, MO: Saunders, 2006:353-407.
5. Commission Decision of 7 May 2002 on common technical specifications for in vitro-diagnostic medical devices. Official J Eur Communities 2002; L131:17-30.
6. Raggam RB, Leitner E, Mühlbauer G, et al. Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. Med Microbiol Immunol 2002; 191:119-125.
7. Raggam RB, Leitner E, Berg J, et al. Single-run, parallel detection of DNA from three pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction. J Mol Diag 2005; 7:133-138.
8. Koidl C, Bozic M, Mossböck G, et al. Rapid diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by a fully automated molecular assay. Ophthalmology 2005; 112:1521-1527.
9. Linnet K, Kondratovich M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. Clin Chem 2004; 50:732-740.
10. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Berlin: Springer-Verlag, 2001:21-34.
11. Koidl C, Bozic M, Berg J, et al. Detection of transfusion transmitted virus DNA by real-time PCR. J Clin Virol 2004; 29:277-281.
12. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. Clin Chem 2003; 49:7-18.



## 2 СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

**Х. Джейнс**

Holly Janes, Division of Public Health Sciences and Program in Biostatistics and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.

**А. Магарет**

Amalia Magaret, Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Program in Biostatistics and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.

### ВВЕДЕНИЕ

Применимый в клинической практике тест должен удовлетворять ряду требований, в числе которых — установление заболевания, представляющего опасность, распространенного и излечимого; кроме того, тест не должен причинять вреда обследуемому пациенту и давать точный результат [1–4]. Исключения составляют тесты, позволяющие диагностировать инфекционные заболевания, протекающие в легкой форме у тестируемой группы населения или, наоборот, не поддающиеся эффективному лечению, поскольку такой диагноз может помочь избежать распространения заболевания среди других групп населения с другим течением болезни. Эта глава посвящена оценке точности результатов теста.

Статистический анализ результатов тестов будет рассмотрен отдельно для диагностического, скринингового и прогностического видов тестирования. Диагностическое тестирование, такое как серологическое исследование, направлено на диагностику заболевания у пациентов с соответствующими симптомами. Скрининговые тесты, обычные для медицинской практики, например анализ на ВИЧ, проводят с целью выявить заболевание в бессимптомный период его развития. Прогностические тесты, в том числе тесты на определение подтипа вируса-возбудителя, служат для оценки клинического прогноза у пациента. Статистический анализ данных всех трех типов тестов преследует одну общую цель — выяснить, насколько хорошо тест отделяет одну группу пациентов от другой. Для простоты все три типа тестов мы будем обозначать далее как диагностические тесты, а две группы пациентов — как больных и здоровых, однако описанные подходы справедливы и для прогностических, и для скрининговых тестов.

Эта глава — одна из двух, посвященных проверке лабораторных тестов. В гл. 1 было рассмотрено соответствие лабораторных процедур стандартам, включая обеспечение воспроизводимости результата.

Здесь мы обсудим клиническую ценность получаемых результатов, в частности применимость их для разделения пациентов на больных и здоровых. Методы, представленные в этой главе, подходят для анализа данных двух наиболее распространенных типов исследования: исследований по типу «случай—контроль», в которых тест проводится на фиксированном числе достоверно больных и здоровых людей, и когортных исследований, при которых тестируют интересующую исследователя группу населения, после чего полученные данные используют для установления распространенности заболевания в этой группе [4]. Ниже представлены основные статистические методы для анализа непараметрических (обычно бинарных) и параметрических (непрерывных) данных тестов, а также подходы к обработке неоднозначно трактуемых результатов и некоторые фундаментальные вопросы, касающиеся планирования эксперимента. Последний раздел посвящен особо сложным случаям, подробное рассмотрение которых не входит в задачи настоящей главы.

## СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИНАРНЫХ ТЕСТОВ

Предположим, что бинарный тест ( $Y$ ) используется для диагностики заболевания ( $D$ ). К примеру, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) — для диагностики ВИЧ-инфекции. Среди инфицированных пациентов ( $D = 1$ ) могут быть как пациенты с положительным результатом ИФА ( $Y = 1$ ), т. е. с истинно положительным результатом, так и с отрицательным ( $Y = 0$ ), который в данном случае будет ложноотрицательным (табл. 2.1). Точно так же среди неинфицированных пациентов ( $D = 0$ ) могут быть как истинно отрицательные ( $Y = 0$ ), так и ложноположительные ( $Y = 1$ ) результаты.

Возможные результаты бинарного теста

Таблица 2.1

Результаты теста ( $Y$ )	Наличие заболевания ( $D$ )		Всего
	Пациент болен ( $D = 1$ )	Пациент здоров ( $D = 0$ )	
Положительный ( $Y = 1$ )	$a$	$b$	$a + b$
Отрицательный ( $Y = 0$ )	$c$	$d$	$c + d$
Всего	$a + c$	$b + d$	$a + b + c + d$

## Вероятности классификации

Точность диагностического теста обычно характеризуется парой вероятностей классификации (англ. *classification probabilities*). Доля истинных положительных результатов (TPR от англ. *true positive rate*), или **чувствительность**, представляет собой долю больных пациентов с положительным результатом теста. Доля ложноположительных результатов (FPR от англ. *false positive rate*) представляет собой

долю здоровых пациентов, давших при обследовании положительный результат. Значение FPR равно 1 минус специфичность теста, где специфичность — это доля здоровых пациентов с отрицательным результатом теста. Идеальный тест позволяет распознать всех больных пациентов ( $TPR = 1$ ) и не дает реакции на здоровых ( $FPR = 0$ ). Полностью бесполезный тест, который не лучше подбрасывания монеты, имеет равные шансы на положительную реакцию для больного и здорового пациента ( $TPR = FPR$ ). Рассмотренные параметры важны для работников здравоохранения, поскольку позволяют оценить достоверность результатов теста у заданной группы пациентов. Самим пациентам и лечащим врачам данные позволяют решить, стоит ли вообще применять ту или иную тест-систему для диагностики [5]. Эти параметры помогают оценить, насколько велика вероятность при тестировании выявить заболевание у больного человека. Можно рассчитать и вероятность положительного результата для здорового человека. Вопросы точности тестов интересуют многих врачей и пациентов, которым назначают анализы.

Как TPR, так и FPR можно рассчитать по результатам когортных исследований или исследований типа «случай—контроль». Значения этих показателей в соответствии с обозначениями, принятыми в табл. 2.1, рассчитывают следующим образом:

$$TPR = p(Y = 1 | D = 1) = \frac{a}{a + c} \quad (1)$$

$$FPR = p(Y = 1 | D = 0) = \frac{b}{b + d}$$

Для оценки точности рассчитанных таким образом величин используют доверительные интервалы. Хотя для этих целей подходят и доверительные интервалы для вероятности биномиального распределения, которые можно рассчитывать с помощью практически любого коммерческого пакета программ статистической обработки данных, как правило, лучше использовать доверительные интервалы на основе логит-трансформации; рассчитать их также несложно [4]. Формула 95%-го доверительного интервала (95% ДИ) для TPR:

$$\frac{\exp(\ln[TPR/(1 - TPR)] \pm 1,96\sqrt{1/[TPR/(1 - TPR)(a + c)]})}{1 + \exp(\ln[TPR/(1 - TPR)] \pm 1,96\sqrt{1/[TPR/(1 - TPR)(a + c)]})}$$

Для FPR 95% ДИ рассчитывается так:

$$\frac{\exp(\ln[FPR/(1 - FPR)] \pm 1,96\sqrt{1/[FPR/(1 - FPR)(b + d)]})}{1 + \exp(\ln[FPR/(1 - FPR)] \pm 1,96\sqrt{1/[FPR/(1 - FPR)(b + d)]})}$$

Для ясности рассмотрим следующий пример: проанализируем результаты диагностики инфекции HSV-2 с помощью коммерческой ИФА тест-системы HerpeSelect (Focus Technologies Inc.) (табл. 2.2)

Таблица 2.2

Пример: определение точности HerpeSelect ИФА при диагностике инфекции HSV-2 среди пациентов, тестирующихся на ВИЧ в больнице Кампалы (Уганда)

Результат HerpeSelect ИФА	Наличие инфекции HSV-2*		Всего
	Инфицирован ( $D = 1$ )	Неинфицирован ( $D = 0$ )	
Положительный ( $Y = 1$ )	142	27	169
Отрицательный ( $Y = 0$ )	1	75	76
Всего	143	102	245

\* Наличие инфекции HSV-2 определяли при помощи вестерн-блота

у репрезентативной выборки пациентов, тестирующихся на ВИЧ в г. Кампале (Уганда) [6]. Наличие инфекции HSV-2 определяли при помощи вестерн-блота, считающегося наиболее точным и чувствительным методом диагностики этой инфекции. Было установлено, что HerpeSelect регистрирует  $142/143 = 99,3\%$  инфицированных HSV-2 пациентов (95% ДИ 95,2–99,9%). Тем не менее  $27/102 = 26,5\%$  пациентов, не имеющих инфекции HSV-2, также дали в тесте положительную реакцию (95% ДИ 18,8–35,9%). И хотя высокое значение FPR не может быть препятствием при использовании этого метода для исследования в группе ВИЧ-инфицированных пациентов, для которых ложноположительный результат по HSV-2 не имеет решающего значения, в других группах пациентов высокое значение FPR делает метод неинформативным. Таким образом, при обследовании населения США для диагностики HSV-2 HerpeSelect ИФА неприемлем [7].

### Прогностическая ценность

Прогностической ценностью называют параметр, характеризующий, насколько хорошо результаты теста отражают истинное состояние заболевания. Вероятность классификации используется для описания результатов тестирования больных и здоровых пациентов, а прогностическая ценность отражает вероятность различных исходов заболевания для пациентов с положительными и отрицательными результатами теста. Таким образом, именно эти данные наиболее важны для пациентов и лечащих врачей, поскольку позволяют принимать решения относительно дальнейшего лечения. Положительная прогностическая ценность (PPV, от англ. *positive predictive value*) — доля пациентов с положительным результатом теста, которые на самом деле больны. Отрицательная прогностическая ценность (NPV, от англ. *negative predictive value*) — доля пациентов, давших при тестировании отрицательный результат, у которых в действительности нет инфекции. Идеальным считается тест, в котором все пациенты, давшие положительный результат, больны (PPV = 1), а все, давшие отрицатель-



ный — здоровы ( $NPV = 1$ ). Абсолютно бесполезен тест, для которого вероятность наличия у пациента заболевания никак не коррелирует с его результатами ( $PPV = 1 - NPV$ ).

Прогностическая ценность представляет собой основанное на результатах теста уточнение предположенной до теста вероятности заболевания или распространенности заболевания  $P$  ( $D = 1$ ). Параметр  $PPV$  обозначает вероятность наличия заболевания среди пациентов с положительным результатом теста, тогда как  $1 - NPV$  представляет собой вероятность заболевания среди пациентов с отрицательным результатом теста.

Прогностическая ценность напрямую рассчитывается из данных, полученных в когортном исследовании. В соответствии с табл. 2.1, ценность теста рассчитывается так:

$$PPV = p(D=1 | Y=1) = \frac{a}{a+b}$$

$$NPV = p(D=0 | Y=0) = \frac{d}{c+d}$$

Доверительные интервалы для этих величин рассчитываются так же, как и для  $TPR/FPR$ . Формула расчета доверительного интервала для  $PPV$  следующая:

$$\frac{\exp(\ln[PPV/(1-PPV)] \pm 1,96\sqrt{1/[PPV/(1-PPV)(a+b)]})}{1 + \exp(\ln[PPV/(1-PPV)] \pm 1,96\sqrt{1/[PPV/(1-PPV)(a+b)]})}$$

Для  $NPV$  доверительный интервал рассчитывается так:

$$\frac{\exp(\ln[NPV/(1-NPV)] \pm 1,96\sqrt{1/[NPV/(1-NPV)(c+d)]})}{1 + \exp(\ln[NPV/(1-NPV)] \pm 1,96\sqrt{1/[NPV/(1-NPV)(c+d)]})}$$

Расчет прогностической ценности представлен для разобранного ранее примера с тестом на HSV-2. Обратите внимание, что эти данные были собраны в когортном исследовании. Мы вычислили, что  $142/169 = 84\%$  пациентов с положительным результатом тестирования были на самом деле заражены HSV-2 (95%-й ДИ 77,7–88,8%); 16% из этих пациентов инфицированы не были. Отрицательный результат более точен, поскольку  $75/76 = 98,7\%$  пациентов, получивших отрицательный результат, не были инфицированы (95%-й ДИ 91,2–99,8%).

Прогностическая ценность не может быть напрямую получена из результатов эксперимента вида «случай—контроль», поскольку относительное количество пациентов с заболеванием в таких исследованиях фиксировано начальными условиями. Тем не менее существует непосредственная связь между прогностической ценностью, относительной распространенностью заболевания и вероятностями классификации, выражаемая следующими формулами:

$$PPV = \frac{TPR p(D=1)}{TPR p(D=1) + FPR [1 - p(D=1)]}$$

$$NPV = \frac{(1 - FPR)(1 - p(D=1))}{(1 - FPR)[1 - p(D=1)] + (1 - TPR)p(D=1)} \quad (2)$$

где  $p(D=1)$  — распространенность заболевания в выборке. Уравнение (2) можно использовать также для расчета PPV и NPV, если TPR и NPR получены для эксперимента «случай—контроль», а распространенность заболевания в выборке взята из внешнего источника.

Уравнение (2) ясно показывает, как величины PPV и NPV зависят от распространенности заболевания среди исследуемой группы и варьирует в разных группах в соответствии с этим показателем. В примере с HSV-2, приведенном в табл. 2.2, распространенность составляла  $143/245 = 58,4\%$ . Но при применении HerpeSelect ИФА к выборке с распространенностью заболевания в 10% те же самые TPR и FPR (99,3% и 26,5% соответственно) дали бы значения PPV в 29,4% и NPV в 99,9%. При таких начальных условиях PPV значительно ниже, поскольку инфицирована лишь небольшая часть выборки. Этот пример показывает, что прогностическая ценность зависит от распространенности заболевания, а следовательно, тесты с хорошими показателями TPR и FPR могут иметь низкий PPV в условиях низкой распространенности заболевания [8].

### Другие показатели качества данных

В эпидемиологических исследованиях для описания соотношений между бинарными переменными часто используются отношения вероятностей (OR, от англ. *odds ratio*). Этот показатель — мера взаимозависимости двух переменных, но он не характеризует точность теста, в ходе которого они были получены. Отношение вероятностей для бинарного теста на носительство заболевания вычисляется как функция TPR и FPR теста [9]. При использовании данных табл. 2.1 эту величину можно рассчитать как:

$$OR = \frac{TPR(1 - FPR)}{FPR(1 - TPR)} = \frac{ad}{bc}$$

Отношение вероятностей учитывает и TPR, и FPR, поэтому одну и ту же величину могут давать много различных пар TPR и FPR. Если говорить точнее, то величина отношения вероятностей не позволяет отличить тест с высоким TPR от теста с низким FPR. К примеру, для HerpeSelect ИФА, результаты которого приведены в табл. 2.2, отношение вероятностей равно 394. Это означает, что вероятность положительного теста для анализа больного, инфицированного HSV-2, в 394 раза выше, чем для анализа здорового человека. Если поменять местами количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов (27 и 1), то TPR снизится с 99,3 до 84,0%, FPR снизится с 28,7 до 1,3%, а отношение вероятностей останется прежним. Те-

сты с двумя рассчитанными парами значений TPR и FPR будут иметь очень разные области применения. Для каждого теста эти показатели необходимо рассматривать независимо [9].

Следует учитывать и тот факт, что у тестов с высокой точностью классификации отношение вероятностей, как правило, намного выше, чем у тех, которые чаще всего используются в исследованиях по измерению взаимозависимости показателей [9]. Выше мы видели, что TPR в 99,3% и FPR в 28,7% дают отношение вероятностей, равное 394. Таким образом, факта того, что отношение вероятностей для теста сильно превышает 1, недостаточно для заключения о том, что он обладает высокой точностью классификации.

Другая распространенная величина, характеризующая данные, получаемые при помощи теста, — уровень ошибочной классификации, или доля результатов, не совпадающих с истинным состоянием заболевания. При помощи данных табл. 2.1 можно рассчитать эту величину:

$$\text{Уровень ошибочной классификации} = \frac{b + c}{a + b + c + d} = (1 - \text{TPR})p(D = 1) + \text{FPR}(D = 0)$$

Обратите внимание, что этот параметр также зависит от TPR и FPR, но еще связан и с распространенностью заболевания. Для примера, приведенного в табл. 2.2, уровень ошибочной классификации составляет 11,4% и не меняется при замене вероятности ложноотрицательных результатов на вероятность ложноположительных (а также вероятности истинно положительных на вероятность отрицательных). Как и в случае отношения вероятностей, уровень ошибочной классификации не характеризует TPR и FPR по отдельности и не может служить исчерпывающим критерием качества теста.

## Сравнение бинарных тестов

Сравнение медицинских тестов может быть основано на их стоимости или доступности, простоте проведения, скорости получения результатов, риске для пациента либо на точности [1, 2]. Здесь мы проводим сравнение по параметру точности.

При сравнении тестов часто оказываются полезны результаты парных исследований, проводимых на одном и том же наборе образцов анализов. Такое планирование сравнения позволяет уменьшить вариации и избежать учета различной распространенности заболевания в разных выборках [4]. Эксперименты подобного рода требуют, однако, статистических методов, способных учитывать корреляцию результатов различных тестов для одного и того же образца. Здесь мы рекомендуем читателю ряд работ [4, 10], в которых дан обзор подобных методов.

Для иллюстрации возьмем все то же исследование инфекции HSV-2. Сравним методы HerpeSelect ИФА и Kalon HSV-2 ИФА (табл. 2.3). Оба теста проводили в одной и той же выборке пациентов. Было уста-

Таблица 2.3

Диагностика инфекции HSV-2 методами HerpeSelect ИФА (Focus Technologies, Inc.) и Kalon HSV-2 gG-2 ИФА (Kalon Biologicals Ltd.)

HerpeSelect ИФА	Kalon HSV-2 ИФА		Всего
	Положительный результат	Отрицательный результат	
<i>Инфицированные HSV-2 (D = 1)</i>			
Положительный результат	138	4	142
Отрицательный результат	0	1	1
Всего	138	5	143
<i>Неинфицированные HSV-2 (D = 0)</i>			
Положительный результат	5	22	27
Отрицательный результат	0	75	75
Всего	5	97	102

новлено, что отношение TPR HerpeSelect и Kalon HSV-2 ИФА составляет 1,0 (95%-й ДИ 1,0–1,1), т. е. у обоих тестов одинаковая доля верно определенных случаев инфекции HSV-2. Отношение FPR составило 5,4 (95%-й ДИ 2,5–11,9), т. е. FPR для HerpeSelect ИФА в 5,4 раза выше, чем для Kalon HSV-2 ИФА.

## СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕПРЕРЫВНЫХ (ПАРАМЕТРИЧЕСКИХ) ТЕСТОВ

С увеличением точности в диагностике стали шире применяться такие количественные методы, как ПЦР и некоторые иммунологические методы. К примеру, при HerpeSelect ИФА для обнаружения антител используется измерение спектрофотометром оптической плотности сыворотки, связывающейся со специфичным антигеном HSV-2 (gG-2). Чем больше интенсивность сигнала, тем с большей уверенностью можно говорить о наличии инфекции, и существует определенное пороговое значение, чтобы считать пробу положительной. В этом разделе мы рассмотрим методы оценки точности тестов ( $Y$ ) относительно наличия заболевания ( $D$ ).

### Кривая ошибок (ROC-кривая)

Точность непрерывных тестов чаще всего контролируют при помощи кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигнала, или кривой ошибок (*ROC-curve*, от англ. *receiver operating characteristic*) [4, 10]. Этот метод основан на разделении результатов теста по пороговому значению ( $c$ ) и построении зависимости TPR от FPR для соотношения  $Y > c$ . Для построения набора кривых пороговое значение варьируют во всем возможном диапазоне значений (рис. 2.1). Кривая ошибок идеального теста содержит точку порогового значе-

ния  $TPR = 1$  и  $FPR = 0$  в левом верхнем углу графика. Кривая бесполезного теста представляет собой линию, проходящую под углом  $45^\circ$ , где  $TPR = FPR$ .

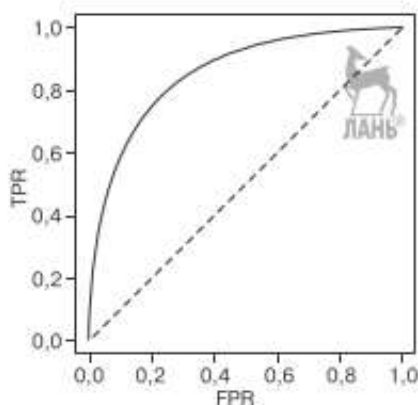


Рис. 2.1. Пример кривой ошибок

Кривая ошибок имеет несколько важных особенностей. Во-первых, она помещает все тесты в рамки единой системы координат и позволяет таким образом сравнивать тесты, результаты которых получены в различных единицах или для разных выборок. Кроме того, на кривой можно увидеть весь набор возможных характеристик, получаемых при установлении различных пороговых значений.

Для иллюстрации построения кривых ошибок мы вновь обратимся к примеру с диагностикой HSV-2. Тест HerpeSelect ИФА дает не-

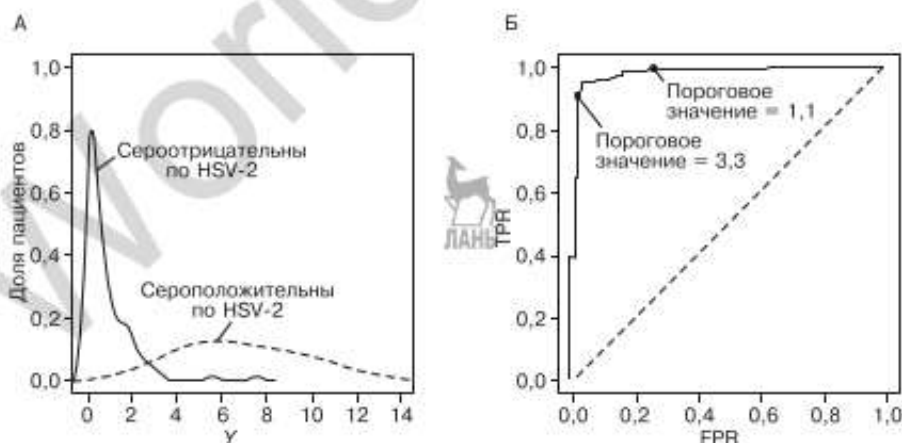


Рис. 2.2. (А) Распределение результатов HerpeSelect ИФА для сероположительных и серонегативных проб при диагностике инфекции HSV-2. По оси ординат отложена доля пациентов, а по оси абсцисс — результат анализа. (Б) Кривая ошибок для HerpeSelect ИФА

прерывный результат, называемый индексом. Ранее для определения результатов бинарных тестов мы пользовались фиксированным пороговым значением, равным 1,1. Давайте теперь оценим точность теста для всех возможных пороговых значений. На рис. 2.2, А показано распределение результатов HerpeSelect ИФА для сероположительных и серонегативных проб. Применяв к этим распределениям ряд пороговых значений, можно получить кривую ошибок, показанную на рис. 2.2, Б. Из этой кривой видно, что TPR в 90,2% и FPR в 2,0% достигаются при использовании порогового значения, равного 3,3. Взятое ранее пороговое значение, равное 1,1, позволяет верно классифицировать больше сероположительных образцов (TPR = 99,3%), однако вместе с тем и значительно большее количество серонегативных проб классифицируются неверно (FPR = 26,5%).

При выборе порогового значения для теста необходимо руководствоваться соотношением важности определения ложноположительных и положительных результатов в данном клиническом контексте. Так, положительный результат при диагностике потенциально опасной для жизни вирусной инфекции получит намного больший приоритет в том случае, если лечение относительно безопасно. Напротив, если инфекция не угрожает жизни, а ее лечение связано с инвазивными процедурами, опасным лечением или психологическим стрессом, то пороговое значение будет выбрано для максимального исключения ложноположительных результатов в ущерб повышению количества ложноотрицательных. При выборе порогового значения следует руководствоваться и статистическими критериями, такими как близость точки на кривой ошибок к левому верхнему углу координатной плоскости [11, 12]. Но если руководствоваться только такими соображениями, то из поля зрения выпадет относительная важность величин TPR и FPR, полностью зависящая от клинического контекста. Статистический подход не в состоянии заменить грамотного и последовательного планирования, учитывающего клинический контекст, в котором тест предполагается применять.

Существует множество других подходов к построению подобных кривых — от непараметрических до полностью параметрических [4, 10]. Большинство коммерческих пакетов программ для статистической обработки данных включают в себя инструменты для построения кривых ошибок. Две недавно вышедшие статьи содержат подробное описание преимуществ и недостатков подобных инструментов в разных пакетах [13, 14]. Две другие статьи описывают новый пакет программ, предназначенный для построения кривых ошибок [15, 16].

## Суммарная оценка кривой ошибок

Суммарная оценка кривых ошибок используется для сравнения непрерывных тестов в данном клиническом контексте. Учет FPR при фиксированном TPR позволяет сравнивать пригодность тестов для тех исследований, в которых приоритетно поддержание высокого зна-

чения TPR. В примере с инфекцией HSV-2 при пороговом значении TPR в 99,0% величина FPR составит 23,5%. Можно, наоборот, рассчитать значение TPR при фиксированном FPR. Это может потребоваться, например, в скрининговых исследованиях, где важно поддержание низкого значения FPR.

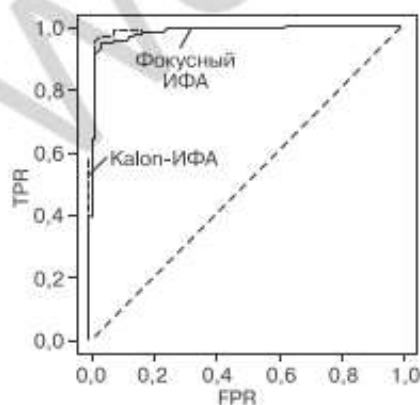
Часто как оценочный параметр используется площадь под кривой ошибок (AUC, от англ. *area under curve*). Ее можно интерпретировать как разность вероятностей положительного результата теста для больного пациента по сравнению со здоровым [17, 18]. Тем не менее ценность подобного параметра для оценки качества теста неоднозначна [5, 19]. Пациенты в больницах не лежат парами. Кроме того, практический интерес представляет только левая часть кривой, где FPR низок. Площадь под участком кривой (pAUC) представляет собой, как ясно из названия, площадь под фиксированным участком кривой ошибок, к примеру, в области со значениями FPR от 0 до 0,1. Однако и эта величина неинформативна для клиники. Для оценки качества результатов теста авторы рекомендуют использовать методы, непосредственно ведущие к клиническим заключениям.

### Другие способы оценки качества теста

Кривая ошибок представляет собой обобщение вероятностей классификации (TPR, FPR) для непрерывных тестов. Для обобщения прогностической ценности выработано несколько различных методик [20, 21], однако единого способа до сих пор не существует. Для каждого отдельного порогового значения величины PPV и NPV можно рассчитать, варьируя условие  $Y > c$ .

### Сравнение непрерывных тестов

Непрерывные тесты можно сравнивать, используя любой из описанных выше параметров сравнения. Как и для бинарных тестов, необходимы статистические методы, учитывающие корреляцию между результатами тестирования одной и той же выборки [4, 22, 23].



**Рис. 2.3.** Кривые ошибок для HerpeSelect ИФА и Kalon HSV-2 ИФА при диагностике инфекции HSV-2

Сравнение результатов непрерывных тестов мы продемонстрируем на все том же примере с исследованием заражения HSV-2. Методики HerpeSelect ИФА и Kalon HSV-2 ИФА сравнивали на всем рабочем диапазоне по качеству получаемых результатов при разных пороговых значениях. На рис. 2.3 показаны кривые ошибок для обоих тестов. Из них следует, что для верной классификации 99,0% проб больных пациентов HerpeSelect ИФА должен иметь FPR в 23,5% (95%-й ДИ 10,9–69,6%), тогда как Kalon HSV-2 ИФА — 19,6% (95%-й ДИ 2,9–67,6%). Таким образом, для указанных условий результаты Kalon HSV-2 ИФА будут лучше, однако значение FPR и в его случае весьма высоко.

## НЕОДНОЗНАЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТА

Часто в результате теста получаются неоднозначные результаты. Некоторые из них тем не менее информативны, например если получены значения, выпадающие за пределы достоверной количественной оценки как слишком малые или слишком большие. Такие результаты могут быть обусловлены теми или иными причинами, позволяющими осуществить их верную категоризацию, как в случае образца, меньшего по объему и соответственно по интенсивности сигнала, или по другой причине выпадающего за диапазон стандартов или контролей. Неоднозначные результаты не следует игнорировать при расчетах точности теста. Тщательное описание теста должно включать долю неоднозначных результатов с указанием причин возникновения неопределенности, а также несколько различных оценок точности в зависимости от трактовки неоднозначных результатов.

Для иллюстрации вновь воспользуемся данными по анализу инфекции HSV-2. Методика HerpeSelect ИФА рекомендует использовать в качестве порогового значения 1,1, выше которого лежат однозначно положительные результаты; результаты, трактуемые как однозначно отрицательные, лежат ниже порога 0,9, тогда как результаты, лежащие между этими двумя значениями, должны трактоваться как неоднозначные. Выше мы описывали результаты HerpeSelect ИФА, пользуясь только одним пороговым значением — 1,1, трактуя таким

Таблица 2.4

Частоты положительных, неоднозначных и отрицательных результатов при исследовании инфекции HSV-2 методом HerpeSelect ИФА

Результат HerpeSelect ИФА	Наличие инфекции HSV-2		Всего
	Пациент инфицирован ( $D = 1$ )	Пациент не инфицирован ( $D = 0$ )	
Положительный ( $> 1,1$ )	142	27	169
Неоднозначный ( $0,9-1,1$ )	0	8	8
Отрицательный ( $< 0,9$ )	1	67	68
Всего	143	105	245



образом все неоднозначные результаты как отрицательные. Однако если использовать оба пороговых значения, результаты изменятся и будут соответствовать представленным в табл. 2.4.

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПЛАНИРОВАНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Стадии исследования

Поскольку разработка новых терапевтических средств проходит в несколько стадий, такой подход разумно использовать и для разработки новых диагностических тестов. В ряде работ эта тема освещена более детально [10, 24, 25]. Элементы, одинаковые для обоих типов исследований, включают переход от фундаментальных работ к экспериментам типа «случай—контроль», в которых выясняется точность классификации, и к когортным исследованиям, позволяющим установить прогностическую ценность. Далее мы рассмотрим основные элементы таких работ.

### План исследования

Для разработки диагностического теста в первую очередь важно выяснить клинический контекст, в котором предполагается использовать тест. Выборка участвующих в исследовании пациентов должна быть отобрана именно из той группы населения, для которой этот тест предполагается в дальнейшем использовать [5, 26]. В исследованиях типа «случай—контроль» часто возникают затруднения, если «случаи» и «контроли» относятся к разным группам населения, например пациенты больницы и ее работники. Группы «случая» и «контроля» при этом варьируют по многим другим параметрам помимо статуса заболевания.

Случайный выбор образцов важен для того, чтобы избежать ошибок выборки [4, 27, 28], при которых выборка не отражает состояния генеральной совокупности (населения в целом). Участие в исследовании пациентов из разных мест способствует приближению получаемых данных к генеральной совокупности.

Другой потенциальный источник ошибок находится уже в лаборатории. Образцы, используемые для исследования диагностического теста, должны собираться, храниться и обрабатываться в максимально одинаковых условиях. Также все операции с образцами, включая непосредственно анализ, должны проводиться специалистами, не осведомленными о статусе заболевания [5].

Стоит отметить, что величина выборки в эксперименте должна быть достаточной для применения к ней инструментов статистики. Цель любого подобного исследования — выяснить, соответствует ли тест минимально допустимым стандартам. В силу этого размер выборки должен определяться с учетом (1) способа определения качества результатов теста и (2) определения минимального размера выборки,

для которого возможен расчет соответствующих величин. Более подробная информация о размерах исследуемой группы как для бинарных, так и для непрерывных тестов описана в литературе [5].

## ВОПРОСЫ, НЕ РАССМОТРЕННЫЕ В ГЛАВЕ

В этой главе мы обсудили основные методы исследования качества результатов диагностических тестов. Ниже мы коротко коснемся более сложных ситуаций и соответствующих методов, созданных для их решения.

Наиболее распространенной проблемой оказывается неточность метода, при помощи которого определяют наличие заболевания. Для решения этой проблемы было разработано несколько статистических приемов [29–31]. Тем не менее окончательно решить эту проблему одними лишь статистическими методами невозможно [4, 32, 33]. Тест, с помощью которого определяется наличие заболевания, непросто выбрать для любого исследования, особенно если достаточно точного и чувствительного метода еще не разработано — в этом случае рекомендуется использовать комбинацию из нескольких наиболее подходящих методов [33].

В некоторых ситуациях невозможно или неэтично выяснять истинный статус заболевания для всех образцов. Если наличие заболевания определено выборочно, например только для положительных образцов, неизбежны ошибки изучения точности и достоверности тестов. Невозможность определить наличие заболевания для отрицательных образцов серьезно затрудняет расчет TPR и FPR, поскольку в предельном случае все образцы будут положительны вне зависимости от истинного статуса заболевания, и тогда обе величины составят 100% независимо от качества предоставляемых тестом результатов. Для устранения подобных ошибок были разработаны специальные статистические приемы [34, 35]. Тем не менее ошибок верификации следует по возможности избегать.

Часто результаты теста могут быть обусловлены целым рядом факторов, не связанных напрямую с наличием заболевания, например общим состоянием пациентов, особенностями проведения процедуры отбора проб, их хранением или анализом. Для учета этой сопутствующей информации также существуют статистические методы [36–40].

Наконец, во многих случаях интерес представляет комбинирование результатов нескольких диагностических тестов, что позволяет повысить точность заключения. Основные принципы обработки подобных данных изложены в ряде работ [4, 41]. Важно, чтобы разработка и проверка комбинированных тестов велись на разных выборках, поскольку это позволяет избежать ошибок избыточной интерпретации (*overfitting*). Также в некоторых случаях для устранения таких ошибок можно воспользоваться методами перекрестной проверки или бутстрэп-анализа [42].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson JMG, Jungner YG. Principles and practice of screening for disease. Public Health Papers 34. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1968.
2. Cole P, Morrison AS. Basic issues in population screening for cancer. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64:1263–1272.
3. Obuchowski NA, Granam RJ, Baker ME, et al. Ten criteria for effective screening: Their application to multislice CT screening for pulmonary and colorectal cancers. *Am J Roentgenol* 2001; 176:1357–1362.
4. Pepe MS. The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction. Oxford: Oxford University Press, 2003.
5. Pepe MS, Feng Z, Janes H, et al. Pivotal evaluation of the accuracy of a classification biomarker. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:1432–1438.
6. Lingappa J, Nakku-Joloba E, Magaret A, et al. HSV-2 serology testing in Uganda: Sensitivity and specificity of various testing methods among HIV-infected and uninfected persons. Manuscript in preparation.
7. Ashley RL. Performance and use of HSV type specific serology test kits. *Herpes* 2002; 9:38–45.
8. Steurer J, Fischer JE, Bachmann LM, et al. Communicating accuracy of tests to general practitioners: A controlled study. *Br Med J* 2002; 324:824–826.
9. Pepe MS, Janes H, Longton G, et al. Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker. *Am J Epidemiol* 2004; 159:882–890.
10. Zhou XH, McClish DK, Obuchowski NA. Statistical Methods in Diagnostic Medicine. New York: Wiley, 2002.
11. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950; 3:32–35.
12. Moses LE, Shapiro D, Littenberg B. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: Data-analytic approaches and some additional considerations. *Stat Med* 1993; 12:1293–1316.
13. Stephan C, Wesseling S, Schink T, et al. Comparison of eight computer programs for receiver-operating characteristic analysis. *Clin Chem* 2003; 49(3):433–439.
14. Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, et al. The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *J Biomed Inform* 2005; 38:404–415.
15. Pepe MS, Longton G, Janes H. Estimation and comparison of receiver operating characteristic curves. *Stata J* 2009; 9:1–16.
16. Janes H, Longton G, Pepe MS. Accommodating covariates in ROC analysis. *Stata J* 2009; 9:17–39.
17. Bamber D. The area above the ordinal dominance graph and the area below the receiver operating characteristic graph. *J Math Psychol* 1975; 12:387–415.
18. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under an ROC curve. *Radiology* 1982; 143:29–36.
19. Cook NR. Statistical evaluation of prognostic versus diagnostic models: Beyond the ROC curve. *Circulation* 2008; 54:17–23.
20. Moskowitz CS, Pepe MS. Quantifying and comparing the predictive accuracy of continuous prognostic factors for binary outcomes. *Biostatistics* 2004; 5:113–127.
21. Huang Y, Pepe MS, Feng Z. Evaluating the predictiveness of a continuous marker. *Biometrics* 2007; 63:1181–1188.

22. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44:837–845.
23. Wieand S, Gail MH, James BR, et al. A family of nonparametric statistics for comparing diagnostic markers with paired or unpaired data. *Biometrika* 1989; 76:585–592.
24. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1054–1061.
25. Baker SG, Kramer BS, McIntosh M, et al. Evaluating markers for the early detection of cancer: Overview of study designs and methods. *Clin Trials* 2006; 3:43–56.
26. Ransohoff DF. How to improve reliability and efficiency of research about molecular markers: Roles of phases, guidelines, and study design. *J Clin Epidemiol* 2007; 60:1205–1219.
27. Van Der Shouw YT, Verbeek ALM, Ruijs SHJ. Guidelines for the assessment of new diagnostic tests. *Invest Radiol* 1995; 30:334–340.
28. Sica GT. Bias in research studies. *Radiology* 2006; 238:780–789.
29. Walter SD, Irwig LM. Estimation of test error rates, disease prevalences, and relative risk from misclassified data: A review. *J Clin Epidemiol* 1988; 41:923–937.
30. Kosinski AS, Flanders WD. Evaluating the exposure and disease relationship with adjustment for different types of exposure misclassification: A regression approach. *Stat Med* 1999; 18:2795–2808.
31. Qu Y, Tan M, Kutner MH. Random effects models in latent class analysis of reevaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* 1996; 52:797–810.
32. Pepe MS, Janes H. Insights into latent class analysis of diagnostic test performance. *Biostatistics* 2007; 8:474–484.
33. Alonzo TA, Pepe MS. Using a combination of reference tests to assess the accuracy of a new diagnostic test. *Stat Med* 1999; 18:2987–3003.
34. Begg CB, Greenes RA. Assessment of diagnostic tests when disease verification is subject to selection bias. *Biometrics* 1983; 39:207–215.
35. Alonzo TA, Pepe MS. Assessing accuracy of a continuous screening test in the presence of verification bias. *J R Stat Soc Ser C Appl Stat* 2005; 54:173–190.
36. Tosteson AAN, Begg CB. A general regression methodology for ROC curve estimation. *Med Decis Making* 1988; 8:204–215.
37. Pepe MS. An interpretation for the ROC curve and inference using GLM procedures. *Biometrics* 2000; 56:352–359.
38. Alonzo TA, Pepe MS. Distribution-free ROC analysis using binary regression techniques. *Biostatistics* 2002; 3:421–432.
39. Janes H, Pepe MS. Adjusting for covariate effects on classification accuracy using the covariate-adjusted receiver operating characteristic curve. *Biometrika* 2009; 96(2):371–382.
40. Janes H, Pepe MS. Adjusting for covariates in studies of diagnostic, screening, or prognostic markers: An old concept in a new setting. *Am J Epidemiol* 2008; 168:89–97.
41. McIntosh M, Pepe MS. Combining several screening tests: Optimality of the risk score. *Biometrics* 2002; 58:657–664.
42. Harrell FE. *Regression Modelling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis*. New York: Springer-Verlag, 2001.

### 3 МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Д. Уили, Т. Слутс

David M. Whiley and Theo P. Sloots, Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory, Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Queensland; Children's Medical Research Institute, Children's Health Service District, Brisbane, Queensland, Australia

#### ВВЕДЕНИЕ

Эффективность клинических мероприятий и возможного лечения пациента с вирусной инфекцией зависит от точной и быстрой идентификации вируса-возбудителя. Ранняя диагностика возбудителя позволяет практикующим врачам принимать эффективные решения и избегать необоснованного использования антибиотиков широкого спектра действия. Традиционно методы, при помощи которых осуществлялась эта задача, включали выделение вируса в культуре клеток, определение продуктов деятельности вируса и обнаружение антител, вырабатываемых организмом в ответ на инфекцию. Тем не менее в ряде случаев эти методы требуют слишком больших затрат труда и времени и не всегда обладают нужной чувствительностью, что откладывает или вовсе делает невозможной постановку верного диагноза и эффективное лечение пациента. Все более широкое применение в диагностических лабораториях находят инструменты молекулярной диагностики, такие как амплификация нуклеиновых кислот, поскольку они упрощают идентификацию вирусных патогенов и облегчают лечение целого ряда вирусных заболеваний.

Разработка методик амплификации нуклеиновых кислот и достижения в области определения продуктов амплификации внесли большой вклад в развитие молекулярной микробиологии. Новые комбинации методов амплификации и определения продуктов амплификации были использованы для создания множества современных лабораторных диагностических систем. Эти системы используют методы количественного определения, генетический фотингерпринтинг на уровне подвида, определение устойчивости микроорганизмов на молекулярном уровне, генотипирование и количественное тестирование (определение вирусной нагрузки). При применении в диагностических лабораториях подобные методы позволяют улучшить диагностику вирусных инфекций и в перспективе способны стать стандартными для клинических лабораторий.

В середине и конце 1980-х гг. было разработано множество методик амплификации, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (1), опосредованную лигированием амплификацию (2) и амплификацию

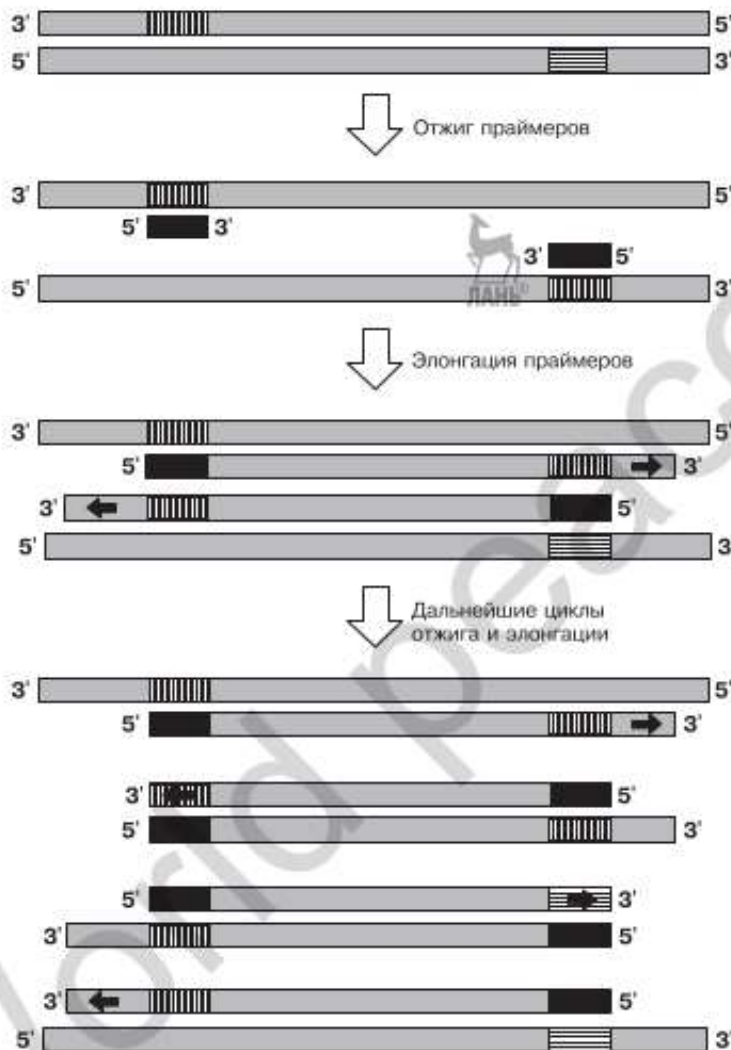
на основе транскрипции (3). Затем эти методы были доработаны, а также появилось множество новых методов селективной амплификации целевых последовательностей (таких, к примеру, как опосредованная транскрипцией амплификация (ТМА, от англ. *transcription-mediated amplification*), амплификация, основанная на последовательности оснований (NASBA, от англ. *nucleic acid sequence-based amplification*), лигазная цепная реакция (LCA, от англ. *ligase chain reaction*), амплификация с вытеснением цепи (SDA, от англ. *strand displacement amplification*) и линейная амплификация [4]). Ни один из этих методов не получил такого широкого распространения, как ПЦР; вероятнее всего причиной этого стала относительная простота и дешевизна метода.

## ЦИКЛИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ

### Полимеразная цепная реакция

Первая ПЦР была проведена в 1983 г.; это была амплификация ДНК *in vitro* с использованием ДНК-полимеразы [1, 5, 6]. В реакционной смеси для ПЦР содержатся амплифицируемая ДНК, термостабильная ДНК-полимераза, избыток дезоксинуклеотидтрифосфатов, а также прямой и обратный праймеры, комплементарные последовательностям, фланкирующим целевой фрагмент ДНК. Проводят ПЦР путем циклического нагревания и охлаждения смеси. Двухцепочечная ДНК (дцДНК) плавится (т. е. ее цепи расходятся) при температуре 94–97 °С, после чего смесь охлаждают до 50–65 °С, что позволяет праймерам (фрагментам одноцепочечной ДНК длиной 18–30 нуклеотидов) отжечься (образовать водородные связи) на комплементарных им последовательностях. Праймеры элонгируются ДНК-полимеразой при 60–72 °С, в результате чего образуются новые копии ДНК-мишени, которые используются далее в качестве матриц для новых циклов амплификации (рис. 3.1).

С момента своего изобретения ПЦР всегда находилась на переднем крае лабораторной диагностики и позволила разработать множество быстрых и чувствительных методов для обнаружения большого числа клинически значимых вирусов, среди которых и РНК-вирусы, выявляемые при помощи ПЦР с обратной транскрипцией. Такой успех в немалой степени связан с развитием методов определения продуктов амплификации. Было опубликовано множество протоколов ПЦР и выпущено большое количество коммерческих наборов для определения наиболее важных вирусов, включая вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV) [7], вирусы гепатитов В и С [8] и цитомегаловирус (ЦМВ, CMV) [9]. Подобные коммерческие наборы доступны далеко не для всех групп вирусов, что привело к созданию многих «местных» диагностических ПЦР-протоколов, не имеющих официальной регистрации и используемых в пределах одной лаборатории.



**Рис. 3.1.** Полимеразная цепная реакция. Две цепи ДНК разделяют (денатурируют) нагреванием, после чего праймеры отжигаются на комплементарных участках целевой ДНК. Затем термостабильная полимеразы элонгирует 3'-конец праймеров, синтезируя комплементарную цепь ДНК, содержащую участок связывания праймеров. В каждом последующем цикле денатурации и элонгации новые цепи ДНК действуют в качестве матриц для отжига праймеров и синтеза комплементарных цепей ДНК

### Методы регистрации результата ПЦР

Традиционно регистрация результата ПЦР производится при помощи прямой визуализации с использованием электрофореза в агарозном геле с интеркалирующими (встраивающимися между двумя цепочка-

ми ДНК) флуоресцентными красителями, такими как бромистый этидий. Методы гель-электрофореза трудоемки и неоднозначны в трактовке, они уже не используются в вирусологической диагностике, иногда только в генотипировании [10]. Кроме того, с помощью гель-электрофореза можно разрешить проблемы регистрации, возникшие при использовании других методов. В силу этого в большинстве лабораторий методы гель-электрофореза в той или иной форме остаются.

Иммуоферментные методы, среди которых твердофазный ИФА, стали первым крупным достижением в области обнаружения продуктов амплификации. Система ПЦР—ИФА использует колориметрический планшет для микротитрования, в котором для прикрепления продукта ПЦР к покрытым стрептавидином стенкам ячеек планшета используется биотинилированный с 5'-конца олигонуклеотидный зонд, комплементарный последовательности между праймерами. Важное преимущество ПЦР—ИФА по сравнению с электрофоретическими методами — объективность, не допускающая ошибочной трактовки результатов. Этот метод особенно хорошо зарекомендовал себя при определении продуктов мультиплексной ПЦР (описана ниже) [12]. Метод ПЦР—ИФА часто применяется в разрабатываемых в лабораториях протоколах, а также в некоторых коммерческих наборах для определения таких вирусов, как ВИЧ [7] и вирусы гепатитов В и С [13]. В настоящее время ПЦР—ИФА все чаще вытесняется ПЦР в реальном времени.

### ПЦР в реальном времени

Изобретение протокола ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) считается важнейшим достижением в амплификации ДНК после изобретения собственно ПЦР и определило наибольшие успехи в использовании приемов молекулярной амплификации в вирусологической диагностике. Этот метод ПЦР основан на выявлении продукта амплификации при помощи флуоресцентных красителей. К реакционной смеси добавляют инактивированные флуоресцентные зонды, они взаимодействуют с продуктом ПЦР, который, накапливаясь, вызывает флуоресценцию. Регистрация флуоресцентного сигнала производится в реальном времени при помощи аппаратуры, измеряющей флуоресценцию либо на протяжении всего цикла амплификации, либо в определенные его периоды. Накопление продукта ПЦР отслеживается в реальном времени, что дает ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами обнаружения. С практической точки зрения важно, что система в этом случае является закрытой и снижается возможность загрязнения лаборатории продуктами амплификации и образца при переносе его из амплификатора в аппаратуру для регистрации продукта. Важно и устранение из методики отдельного этапа регистрации продуктов, что сокращает время анализа и трудозатраты. Помимо этого, такая система обеспечивает количественную оценку исходной пробы, что открывает возможности для подсчета



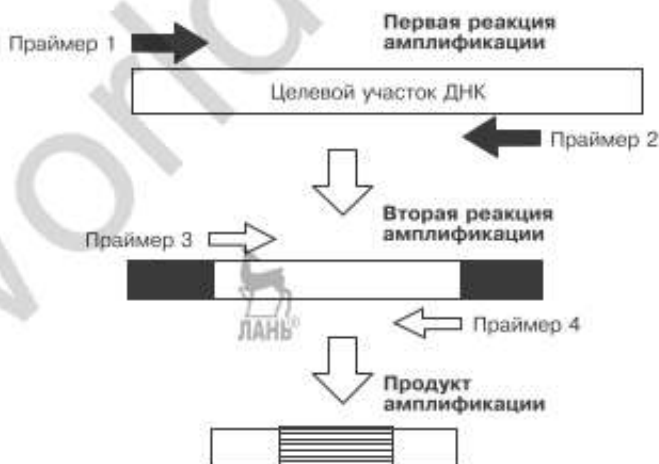
вирусной нагрузки (см. ниже). По этим причинам практически для каждого из патогенных вирусов человека разработано множество протоколов ПЦР в реальном времени, которые нашли самое широкое применение в диагностических лабораториях [14–16].

Существует два основных типа флуоресцентных зондов, используемых для ПЦР в реальном времени, — интеркалирующие флуоресцентные красители, такие как SYBR green, неспецифически взаимодействующие с дцДНК, и ковалентно меченные олигонуклеотидные зонды различной конструкции [17, 18]. После интеркаляции в дцДНК молекула SYBR green начинает излучать флуоресцентный сигнал с длиной волны 522 нм, который легко регистрируется аппаратурой для ПЦР в реальном времени. Использование SYBR green позволяет поставить реакцию ПЦР в реальном времени быстро и технически просто. Основным недостатком такого подхода оказывается неспецифичность, поскольку SYBR green взаимодействует с любой дцДНК, включая продукты неспецифической амплификации и димеризовавшиеся праймеры. Для обработки результатов ПЦР необходимы дополнительные процедуры, например анализ кривых плавления. Специфичные к последовательностям зонды пользуются в вирусологической диагностике значительно большей популярностью, чем интеркалирующие красители, поскольку они взаимодействуют только с целевой последовательностью ДНК и обеспечивают большую точность результатов [15, 16]. Наиболее распространенным типом олигонуклеотидного зонда в диагностике вирусных инфекций стали зонды TaqMan® с двойной меткой. Такой зонд несет на 5'-конце ковалентно связанную молекулу флуоресцентного красителя, например FAM, и молекулу тушителя (гасителя) флуоресценции, такого как TAMRA, на 3'-конце. Зонд образует в растворе при комнатной температуре особую структуру. В таком состоянии флуоресцирующая молекула находится близко от молекулы тушителя, что препятствует испусканию квантов света вследствие явления, называемого флуоресцентным (Фёрстеровским) резонансным переносом энергии (FRET, от англ. Förster resonance energy transfer). Существует множество различных олигонуклеотидных зондов для ПЦР в реальном времени: зонды LUX (англ. light upon extension) компании Invitrogen, праймеры Scorpion и сравнительно недавно появившаяся система Plexor фирмы Promega. Помимо описанных выше способов регистрации продукта ПЦР для реакций ПЦР в реальном времени используется целый ряд других, например молекулярные маяки. MGB и LNA — дополнительные модификации зонда, которые могут быть внесены и в TaqMan®.

### Каскадная (вложенная) ПЦР

Хотя обычная ПЦР теоретически способна амплифицировать даже очень небольшие количества ДНК, присутствующие в реакционной смеси в небольшом числе копий, чувствительность метода можно по-

высить, используя каскадную (вложенную) ПЦР (англ. *nested PCR*). Этот тип реакции амплификации подразумевает использование в качестве матричной смеси для второй реакции ПЦР продуктов первой, для чего во второй реакции применяют праймеры, комплементарные последовательностям, лежащим внутри продукта первой реакции (рис. 3.2). Вариантом каскадной ПЦР является полукаскадная ПЦР, в которой только один праймер второй реакции лежит внутри мишени первой реакции, а второй — такой же, как и в первой ПЦР. Каскадная ПЦР дает два серьезных преимущества по сравнению с обычной ПЦР. Во-первых, чувствительность метода повышается в среднем в 10–100 раз [15]. Это особенно важно при исследовании образцов с небольшой вирусной нагрузкой [19] или в неоптимальном состоянии, например засохшей крови [20]. Второе важное преимущество — наличие «очищенной» ДНК-матрицы для второй реакции. Это не только повышает специфичность определения возбудителя, но и позволяет получить результаты более высокого разрешения, особенно при использовании неспецифичных методов обнаружения продукта, таких как гель-электрофорез или окрашивание с помощью SYBR green. Несмотря на указанные достоинства, протоколы каскадных ПЦР в большинстве случаев непригодны для диагностических целей, главным образом из-за повышенного риска загрязнения образца при переносе реакционной смеси из сосуда в сосуд после первого раунда. Также неоднократно поднимался вопрос о клинической значимости сверхнизкой вирусной нагрузки, регистрируемой только каскадной ПЦР [19].



**Рис. 3.2.** Каскадная ПЦР. В этой модификации ПЦР используется две реакции, или два раунда, ПЦР. После первой реакции амплификации небольшое количество амплификата переносят во вторую реакционную смесь в качестве матричной ДНК. Праймеры, используемые во второй реакции, комплементарны областям, лежащим внутри продукта ПЦР первой реакции

## Мультиплексная ПЦР

Несмотря на то что методы, основанные на ПЦР, позволяют производить анализ с высокой чувствительностью за короткое время, они обладают одним существенным недостатком — выявлять с их помощью можно только один организм, а именно тот, ДНК которого комплементарны праймеры, содержащиеся в реакционной смеси. Традиционные методы, например культуральный, дают возможность выявлять значительно более *широкий спектр* возбудителей. Это не позволяет использовать ПЦР в том случае, когда для постановки диагноза требуется исключить несколько вирусных инфекций и подтвердить наличие одного возбудителя. Такая проблема типична при диагностике респираторно-вирусных инфекций, поскольку одни и те же симптомы характерны для целого ряда возбудителей. Для диагностики в этом случае потребуется поставить целый набор ПЦР с разными праймерами, специфичными для всех возможных вирусов. Это крайне трудоемко, долго и требует высокой технической оснащённости лаборатории. Подобных затруднений можно избежать, используя мультиплексную ПЦР. Если требуется выдать заключение для целого набора возбудителей, мультиплексная ПЦР намного предпочтительнее обычной, поскольку использует несколько наборов праймеров в одном реакционном объеме, что делает возможным одновременное определение сразу нескольких вирусов. Продукты амплификации можно затем разделить множеством различных методов, среди которых гель-электрофорез, использование олигонуклеотидных зондов в технологиях, подобных ПЦР—ИФА или ПЦР в реальном времени, или методы, основанные на анализе температур плавления при использовании SYBR green. Для респираторных вирусов разработано и описано множество протоколов мультиплексной ПЦР, среди которых есть и коммерческие образцы; с помощью этих протоколов удавалось успешно разделить до 19 видов вирусов [12, 21–23]. Мультиплексная ПЦР также хорошо показала себя при определении вирусов — возбудителей заболеваний ЦНС — герпесвирусов и энтеровирусов [24]. Единственный недостаток мультиплексной ПЦР — сниженная чувствительность по сравнению с другими методами ПЦР из-за неспецифичной амплификации, конкурентного ингибирования полимеразных реакций и других эффектов. Тем не менее большой потенциал этого метода будет способствовать росту его значимости в диагностике вирусных заболеваний, особенно после выхода на рынок новых коммерческих наборов, основанных на мультиплексной ПЦР, среди которых жидкие микрочипы [23], предоставляющие гораздо большую гибкость в использовании метода для диагностики.

## Количественная ПЦР

Одно из важных свойств любой ПЦР, и особенно ПЦР в реальном времени, — то, что после минимальной доработки эти методы можно использовать для количественного определения вирусной нагрузки

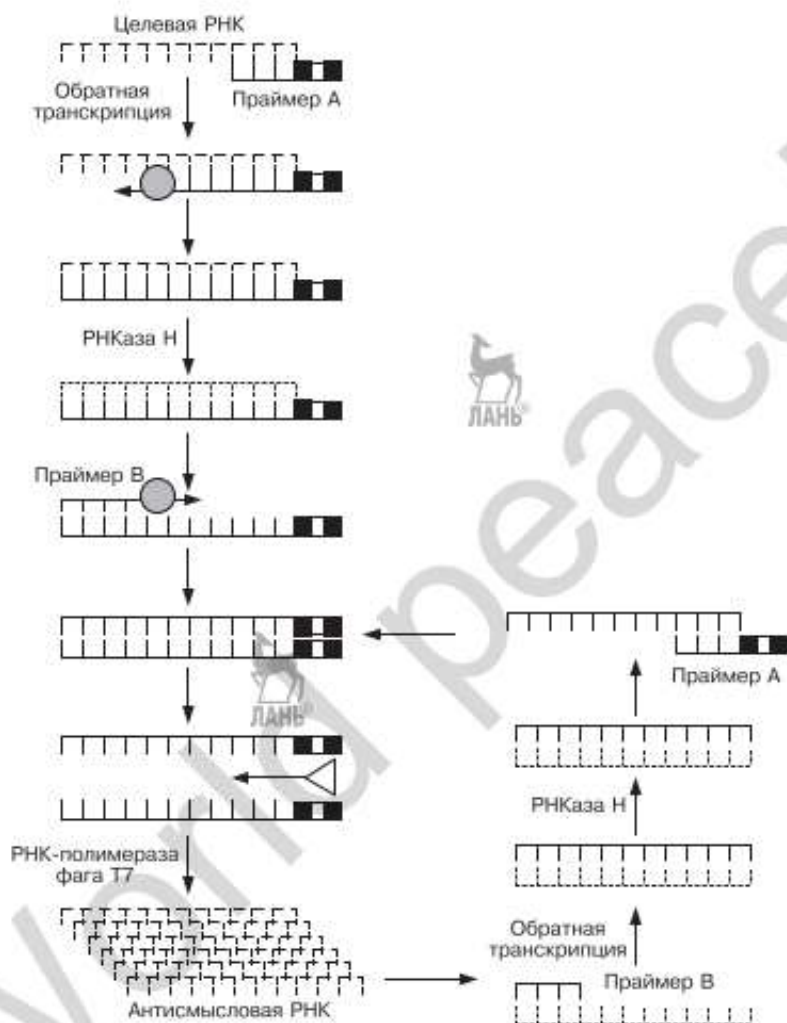
образца. Количественная ПЦР основывается на том, что детектируемое количество продукта ПЦР в образцах с большой вирусной нагрузкой появится на несколько циклов раньше, чем в образце с малой. При ПЦР в реальном времени это выразится в том, на каком цикле ПЦР появится флуоресцентный сигнал. При использовании количественной ПЦР результат можно пересчитать в абсолютную величину, а именно в количество копий ДНК на миллилитр, используя количественные стандарты, или в относительную, сравнив его с результатом другой целевой последовательности, присутствующей в пробе. Для диагностики вирусных заболеваний количественная ПЦР в ряде случаев предпочтительнее, поскольку с ее помощью можно отслеживать динамику размножения вируса или ответ на лечение, дифференцировать острую и хроническую инфекции. Особенно важно это при диагностике и лечении инфекций, вызванных ВИЧ, вирусами гепатитов В и С и цитомегаловирусом [8, 9, 25].

## ДРУГИЕ МЕТОДЫ НАПРАВЛЕННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

### Амплификация, основанная на последовательности нуклеотидов

Первая система специфической амплификации, не основанная на ПЦР, была описана в 1989 г. [3]. Этот метод, ранее известный как амплификация, основанная на транскрипции (TAS, от англ. *transcription-based amplification*), заключался в амплификации целевой последовательности при транскрипции *in vitro*. Впоследствии метод был усовершенствован до изотермической амплификации с использованием трех ферментов в процессе, изначально названном самоподдерживающейся репликацией последовательности (3SR, от англ. *self-sustaining sequence replication*), или амплификацией, основанной на последовательности (NASBA, от англ. *nucleic acid sequence-based amplification*). В ходе этого процесса происходит амплификация РНК с РНК-мишени с использованием ревертазной и ДНК-полимеразной функций ревертазы вируса птичьего миелобластоза (AMV), РНК-полимеразы фага Т7, фермента РНКазы Н и специфичного праймера для полимеразы Т7 [26]. Реакция проходит в несколько циклов обратной транскрипции и РНК—РНК репликации, в результате чего через интермедиат кДНК синтезируется целевая последовательность (рис. 3.3).

В ходе реакции образуется гибрид ДНК—РНК, содержащий промотор Т7. Молекула РНК в этом гибриде разрушается РНКазой Н, а ДНК достраивается ревертазой до дцДНК. Эта дцДНК служит матрицей для полимеразы Т7, синтезирующей с нее множество копий РНК, используя промоторную последовательность. Далее РНК могут быть конвертированы в форму дцДНК и служить матрицами для транскрипции. Процесс протекает при температуре 42 °С до тех пор, пока не исчерпаются реагенты или не будут инактивированы ферменты. За цикл образуется от 100 до 1000 копий целевой последователь-



**Рис. 3.3.** Амплификация на основе нуклеотидной последовательности (NASBA). Метод основан на повторяющихся циклах транскрипции, приводящих к накоплению РНК-продукта через интермедиат дцДНК. Праймер А, содержащий промоторный сайт РНК-полимеразы фага Т7, связывается с целевой РНК. Ревертаза элонгирует праймер, в результате чего промотор Т7 оказывается включен в кДНК. РНКаза Н расщепляет РНК в гибриде РНК–ДНК. Праймер В связывается с кДНК, после чего элонгируется ревертазой с образованием дцДНК, содержащей промотор Т7. Затем РНК-полимераза фага Т7 транскрибирует эту дцДНК с образованием антисмысловых РНК. Антисмысловые РНК далее превращаются в дцДНК, используемые в качестве матрицы в последующих циклах амплификации

ности. В результате количество копий целевой РНК за 15–30 мин возрастает примерно в 10 млрд раз.

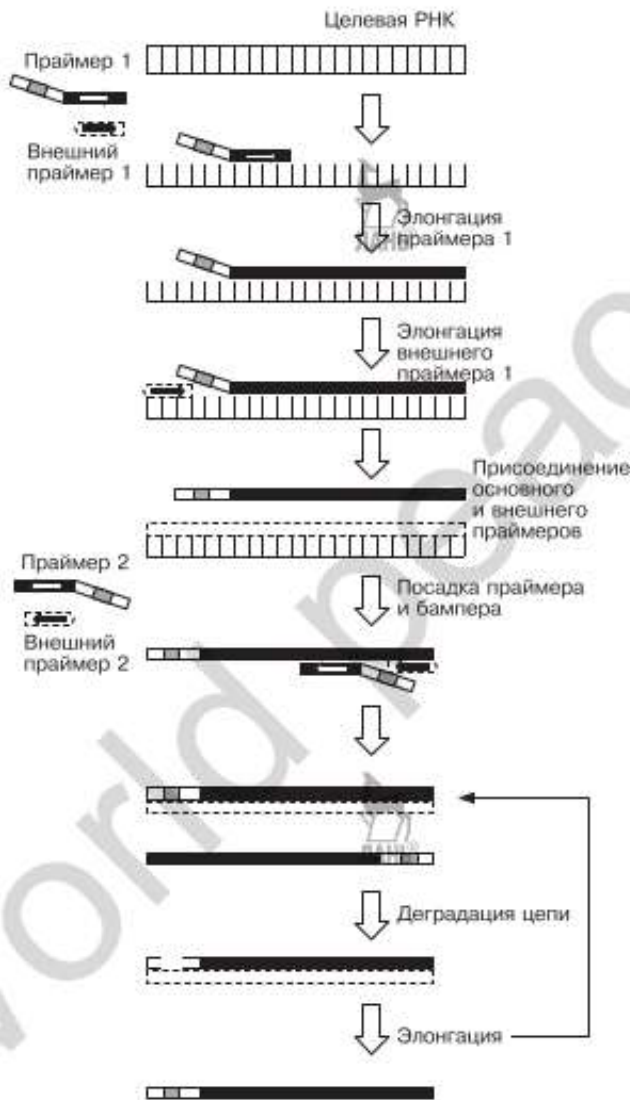
Важное преимущество метода — его нечувствительность к загрязнению образца чужеродной ДНК, что позволяет проводить количественный анализ даже неочищенных клеточных экстрактов. Метод NASBA продемонстрировал чувствительность, сравнимую с чувствительностью ПЦР, а в ряде случаев превзошел ее [27, 28]. Также важно и то, что метод имеет более высокий потенциал оптимизации, чем стандартная ПЦР [29]. На сегодняшний день NASBA наиболее широко используется для обнаружения РНК-вирусов; существуют коммерческие наборы, использующие для регистрации продукта флуоресцентные методы, среди которых — метод молекулярных маяков. Он применяется в системе EasyQ компании bioMérieux, позволяет отслеживать накопление продукта в реальном времени [34] и осуществлять количественный анализ [35–38]. Метод, совмещенный с липосомной технологией усиления сигнала, был использован при разработке биосенсоров для вируса лихорадки денге [39].

### Амплификация, опосредованная транскрипцией

Этот метод аналогичен NASBA, однако для разрушения РНК в гибриде РНК—ДНК используется не РНКазы, а РНКазная активность ревертазы. Как и в методе NASBA, реакцию проводят в изотермических условиях, а целью амплификации может быть как ДНК, так и РНК. В методе амплификации, опосредованной транскрипцией (ТМА, от англ. *transcription-mediated amplification*), транскрипция дцДНК нужна для обогащения реакционной смеси копиями целевой последовательности. Вероятность загрязнения образца при переносе снижена, поскольку РНК менее стабильна, чем ДНК. Метод ТМА стал пользоваться популярностью в лабораторной практике после разработки коммерческих наборов для его проведения, таких как АРТМА компании Gen-Probe Incorporated, предназначенных для определения ВИЧ-1 и вируса гепатита С [40, 41].

### Амплификация с вытеснением цепи

Амплификация с вытеснением цепи (SDA, от англ. *strand displacement amplification*) была впервые описана в 1992 г. [42]. Это еще один метод изотермической амплификации, основанный на способности некоторых ДНК-полимераз элонгировать одноцепочечные разрывы в ДНК, расплетая ДНК-дуплекс и вытесняя надрезанную цепь (рис. 3.4). Основа специфичности метода — внесение сайт-специфичных одноцепочечных разрывов эндонуклеазами рестрикции. В норме эндонуклеазы вносят в ДНК двуцепочечный разрыв, после чего ДНК не может служить матрицей для SDA. Однако в реакции SDA в новосинтезированную ДНК включаются  $\alpha$ -тиозамещенные нуклеотиды, образуя гибридную ДНК. Реакционная смесь содержит ДНК-полимеразу без 5'-3'-экзонуклеазной активности, эндонуклеазу



**Рис. 3.4.** Амплификация с вытеснением цепи (SDA). После денатурации целевой ДНК праймеры связываются со своими одноцепочечными участками комплементарности. Праймер содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Bso*BI. Праймер элонгируется ДНК-полимеразой, не проявляющей 5'-3'-эксонуклеазную активность в присутствии dUTP, dGTP, dATP и  $\alpha$ -тиозамещенного dCTP. Образующаяся ДНК содержит сайт узнавания *Bso*BI, одна из цепей которого содержит фосфотиозидные связи. По этой причине эндонуклеаза рестрикции надрезает только немодифицированную цепь, после чего ДНК-полимераза элонгирует надрез, вытесняя исходную цепь

рестрикции,  $\alpha$ -тиозамещенный дезоксирибонуклеотид и два набора праймеров. Первый набор праймеров аналогичен по действию тому, что используется в ПЦР, но на 5'-концах они несут сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции. Второй набор праймеров, внешние праймеры, связываются непосредственно за 5'-концами праймеров первого набора. После денатурации целевой ДНК первый набор праймеров инициирует синтез гибридной ДНК. Эти гибриды разделяются при элонгации внешних праймеров, и затем полуфосфотиолированная цепь ДНК вытесняется.

Образующаяся в результате оцДНК достраивается до двухцепочечной в результате элонгации прямого или обратного праймера. Полуфосфотиолированная дцДНК содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции и является субстратом для SDA. Она надрезается эндонуклеазой рестрикции по немодифицированной цепи, а сайт надрезания элонгируется затем ДНК-полимеразой. С момента возникновения полуфосфотиолированной дцДНК процесс становится самоподдерживающимся.

Недостаток метода — большая вероятность неверного присоединения праймера, а значит, высокий уровень фоновой амплификации. Преодолевается этот недостаток при помощи жесткого ограничения колебания температуры или добавления в реакционную смесь белка, связывающегося с оцДНК, который кодируется геном 32 фага T4 [43]. Этот белок также улучшает амплификацию длинных фрагментов в методе.

Компания Becton Dickinson Technologies (шт. Северная Каролина, США) разработала методику, сочетающую SDA и флуорогенные репортерные зонды, что позволяет специфично отслеживать накопление продукта амплификации в реальном времени [44]. Зонды состоят из одной из цепей сайта связывания рестриктазы *BsoBI*, фланкированных флуоресцентным красителем и тушителем флуоресценции. К 3'-концу от сайта распознавания рестриктазы зонд содержит сайт, комплементарный целевой последовательности. Флуоресцентный краситель и тушитель находятся достаточно близко друг от друга для предотвращения флуоресценции. Если в смеси есть амплификат целевой последовательности, зонд гибридизуется с мишенью, разрезается энонуклеазой рестрикции, в результате чего флуоресцентный краситель отделяется от тушителя и появляется флуоресцентный сигнал. Таким образом, этот процесс позволяет отслеживать накопление продукта амплификации в реальном времени. Качество зонда повышается при помещении сайта разрезания *BsoBI* внутри одноцепочечного участка шпильчатой структуры. Такие зонды обладают чувствительностью в 10 копий на реакционный объем.

Описанная методика легла в основу коммерческого теста BD ProbeTec компании Becton Dickinson Technologies, используемого для клинической диагностики бактериальных инфекций. Применение SDA в клинической вирусологии пока ограничено, хотя для исследовательских целей уже использовали методики этого типа [45, 46].



## Амплификация по типу катящегося кольца

Амплификация по типу катящегося кольца (RCA, от англ. *rolling circle amplification*) представляет собой методику изотермической амплификации кольцевой целевой молекулы при элонгации одного праймера в течение нескольких раундов. В процессе реакции полимераза вытесняет лежащую впереди цепь ДНК, синтезируя конкатемер, состоящий из множества копий целевой молекулы. Кинетика реакции амплификации линейна, а сама реакция протекает при постоянной температуре в течение нескольких часов или даже дней, давая в результате до нескольких миллионов копий целевой последовательности. Впервые метод был описан в середине 1990-х гг. [47, 48] и нашел применение для диагностических целей, требующих обнаружения РНК или ДНК, особенно в ограниченном количестве материала.

Одна из модификаций этого метода, использующая два праймера, носит название экспоненциальной или каскадной RCA [49–52]. Один из праймеров комплементарен целевой последовательности и инициирует синтез по типу катящегося кольца. Другой праймер комплементарен последовательности внутри амплифицированной молекулы и служит для образования точек ветвления, что позволяет получить до  $10^{12}$  копий целевой последовательности за час [50–52]. Кинетика такой реакции носит экспоненциальный характер.

Для проведения реакции RCA не требуется специальной аппаратуры, поскольку температура реакционной смеси в методе постоянна. Кроме того, этот метод менее чувствителен к загрязнению пробы и, в отличие от других изотермических методов, практически не требует оптимизации. Диагностическое применение метода многократно обсуждалось [53], и хотя перспективы внедрения его в вирусологическую диагностику представляются неплохими [54], в клинической практике он все еще не играет заметной роли.

## Изотермическая амплификация, опосредованная петлей

В 2000 г. Notomi с сотрудниками разработал новый метод изотермической амплификации, названный амплификацией, опосредованной петлей (LAMP, от англ. *loop-mediated isothermal amplification*). Он позволяет быстро амплифицировать участок ДНК с высокой специфичностью и эффективностью, что устраняет необходимость регулировать температуру реакционной смеси в установках для ПЦР [55]. Этот метод подразумевает использование в одном реакционном объеме четырех праймеров, гомологичных шести областям внутри целевой ДНК; внутренний праймер при этом содержит последовательности обеих цепей целевой ДНК и служит для инициации реакции. После инициации внешний праймер инициирует синтез с вытеснением цепи, в результате которого высвобождается оцДНК. Эта ДНК служит матрицей для дальнейшего синтеза со второго набора внутренних и внешних праймеров, связывающихся с противоположным концом ДНК и формирующих шпильку (структуру типа «ручка сковороды»).

В последующих циклах один из внутренних праймеров спаривается с петлей, образованной новосинтезированной оцДНК, и инициирует следующий синтез с вытеснением цепи. Реакция позволяет получить более миллиарда копий целевой последовательности менее чем за час.

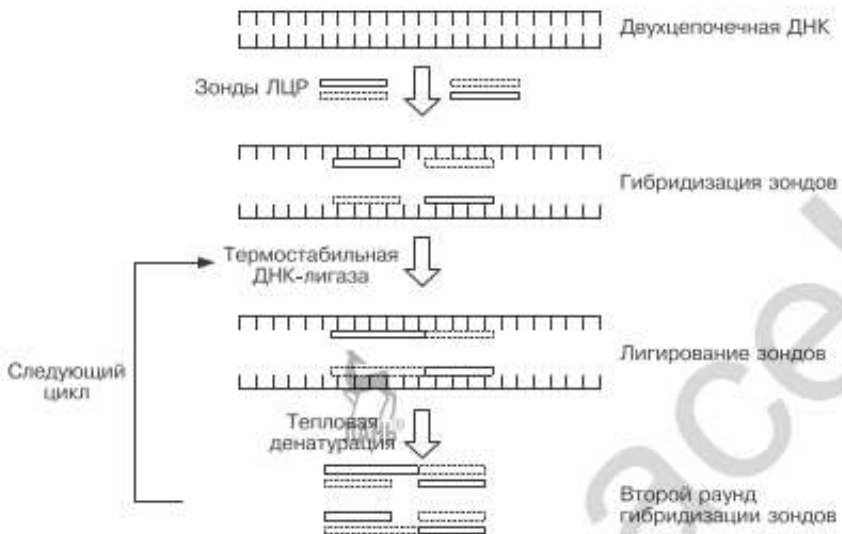
Реакция обладает очень высокой специфичностью, поскольку основана на распознавании шести различных целевых последовательностей на начальном этапе и четырех на последующих. Метод может быть комбинирован с обратной транскрипцией для определения РНК. Регистрация продуктов амплификации осуществляется при помощи SYBR green. Характеристики метода LAMP позволяют создать на его основе методики скрининга в полевых условиях или в условиях технически слабо оснащенных пунктов медицинской помощи.

## МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ ЗОНДОВ

### Лигазная цепная реакция

Лигазная цепная реакция (ЛЦР, англ. LCR) представляет собой еще один метод амплификации нуклеиновых кислот, разработанный вскоре после ПЦР и использующий две пары зондов, комплементарных друг другу (рис. 3.5) [56]. В отличие от ПЦР, сайты комплементарности пары зондов не фланкируют целевую последовательность, а лежат внутри нее с промежутком в 1–3 нуклеотида. Промежуток между зондами лигируется термостабильной ДНК-лигазой, соединяющей зонды только в случае точной комплементарности целевой последовательности. ДНК-лигаза обладает высокой специфичностью и чувствительна к неполному спариванию цепей ДНК, что используется в методиках обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, от англ. *single nucleotide polymorphism*) в реальном времени [57]. После лигирования реакционную смесь нагревают до 95 °С для отделения продукта лигирования от целевой ДНК. После охлаждения с продуктом лигирования могут связаться новые зонды. Последовательная денатурация, отжиг и лигирование ведут к экспоненциальному нарастанию количества лигированных зондов. Основные достоинства этого метода — чувствительность к однонуклеотидным полиморфизмам, а также возможность автоматизации.

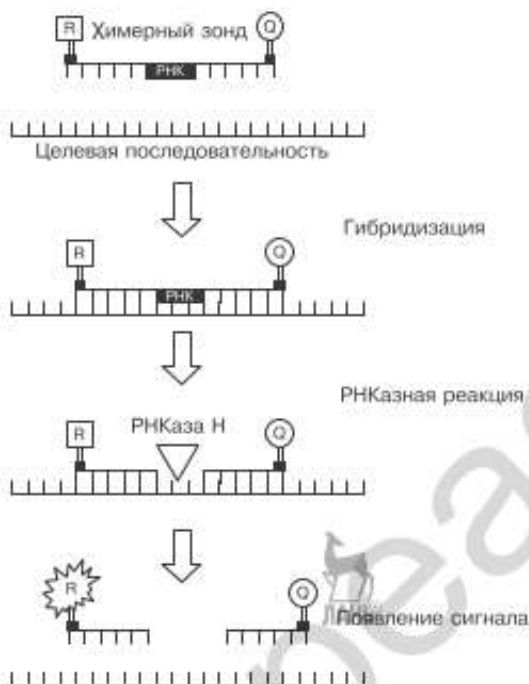
Применения в диагностике ЛЦР до настоящего времени не получила, а использование метода для определения бактерий и вирусов ограничено на сегодняшний день несколькими исследованиями. Метод, основанный на лигазной амплификации ДНК, был применен для определения области *gag* генома ВИЧ-1 [58]; также похожая методика применялась для выявления вируса простого герпеса и HPV, она показала значительно меньшее время определения по сравнению с традиционными методами, такими как метод клеточных культур [59, 60]. Сейчас коммерческое применение метода ограничивается не всегда успешным определением бактериальных геномов (Abbott laboratories, г. Эбботт-Парк, шт. Иллинойс, США) [4].



**Рис. 3.5.** Лигазная цепная реакция. Цепи целевой ДНК разделяют тепловой денатурацией, что позволяет двум парам комплементарных зондов гибридизоваться с комплементарными им последовательностями таким образом, чтобы промежуток между ними не превышал 2–7 нуклеотидов. Термостабильная ДНК-лигаза соединяет концы зондов, образуя комплементарный целевой последовательности фрагмент. В следующих циклах гибридизации и лигирования участвуют как целевая последовательность, так и продукты предыдущих реакций лигирования

### Технология зондового цикла

Технология зондового цикла (CPT, от англ. *cycling probe technology*) была разработана ID Biomedical (г. Ванкувер, Канада) в 1999 г. [61], после чего права на метод приобрела Takara Biomedical Group (Takara Shuzo Company, г. Токио, Япония). Этот метод представляет собой систему амплификации сигнала, позволяющую обнаруживать целевую последовательность без ее амплификации (рис. 3.6). В методе используется химерный ДНК–РНК-зонд, состоящий из участка РНК, комплементарного целевой последовательности, который фланкирован двумя фрагментами ДНК. На концах зонда находятся флуоресцентный краситель и тушитель. После отжига РНК зонда становится субстратом для РНКазы H. В результате нуклеазной реакции концы зонда уходят в раствор, освобождая сайт посадки зонда. В растворе концы зонда отдаляются друг от друга, в результате чего флуоресцентная молекула на одном из них оказывается на достаточном расстоянии от молекулы-тушителя на другом конце, что ведет к появлению сигнала. Флуоресцентный сигнал усиливается с каждым расщепленным зондом, что открывает возможности для количественного анализа. Амплификация сигнала носит линейный, а не экспоненциальный характер, что делает метод малочувствительным к загрязнению и позволяет производить оценку бактериальной или вирусной нагрузки образца. Поскольку вся



**Рис. 3.6.** Технология зондового цикла. В методе используется зонд ДНК—РНК—ДНК, несущий сигнальную молекулу (R) на 5'-конце и молекулу тушителя (Q) на 3'-конце. Молекула РНК специфично связывается с целевой ДНК, после чего расщепляется РНКазой Н, что ведет к высвобождению и разделению некомплементарных ДНК-концов зонда. Удаление друг от друга сигнальной молекулы и тушителя ведет к появлению сигнала

реакция проходит одностадийно, тест дешев и прост, а также обладает широкими перспективами в плане автоматизации.

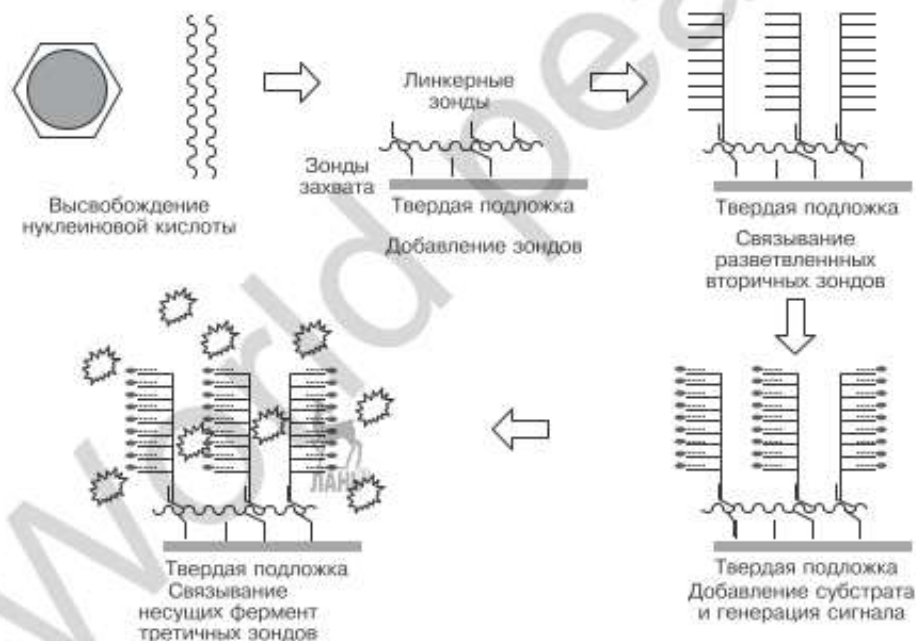
В улучшенной версии метода [61] химерные зонды присоединены к магнитным частицам, что позволяет эффективно разделять расщепленные и интактные зонды. При помощи закрепления целевой ДНК на зондах и отделения неспецифичной ДНК удалось снизить интенсивность фонового сигнала и повысить чувствительность метода. На сегодняшний день технология зондового цикла используется для определения устойчивых к метициллину штаммов стафилококка [62], однако широкого применения в вирусологической диагностике метод не нашел.

## МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ СИГНАЛА

### Разветвленная ДНК

Еще один метод, основанный на амплификации сигнала, а не на целевой последовательности — метод разветвленной ДНК (bDNA, от англ.

*branched DNA*). Он был впервые представлен компанией Chiron Corporation (г. Эмеривилл, шт. Калифорния, США) в 1987 г. и сейчас из систем амплификации сигнала применяется наиболее широко. Методика включает несколько одновременных стадий гибридизации ДНК, задействующих несколько разных типов олигонуклеотидных зондов (рис. 3.7). Это так называемые зонды захвата, серия целевых зондов, разветвленный вторичный зонд и связанные с сигнальными молекулами третичные зонды. На первом этапе набор специфичных зондов связывается с целевой ДНК и гибридизуется с зондами захвата, иммобилизуя всю конструкцию на твердой подложке. Второй набор специфичных зондов связывается с иммобилизованной ДНК и служит местами прикрепления разветвленных вторичных зондов благодаря наличию линкерного участка на 5'-конце. Разветвленный зонд обычно содержит 15 или более участков ДНК, комплементарных меченым третичным зондам. В результате на одной целевой последовательности оказывается закреплено от 300 до 3000 сигнальных мо-



**Рис. 3.7.** Амплификация сигнала с использованием разветвленной ДНК. Целевая нуклеиновая кислота иммобилизуется на твердой подложке при помощи зондов захвата. С целевой последовательностью связывается несколько линкерных зондов. Эти зонды несут участки, комплементарные разветвленным вторичным зондам и служат для их специфичной посадки. Третичные зонды, несущие молекулы фермента, связываются с ветвями вторичных зондов. Все процессы гибридизации идут одновременно в одном реакционном объеме. После отмывки пробы и добавления соответствующего субстрата генерируется сигнал в форме хемилюминесценции

лекул, в роли которых чаще всего выступают ферменты. После промывания подложку переносят в хемилюминесцентный субстрат для ферментов, и проявляется сигнал. Чувствительность системы оценивается в пределах от 1000 до 100 000 копий целевой последовательности на пробу.

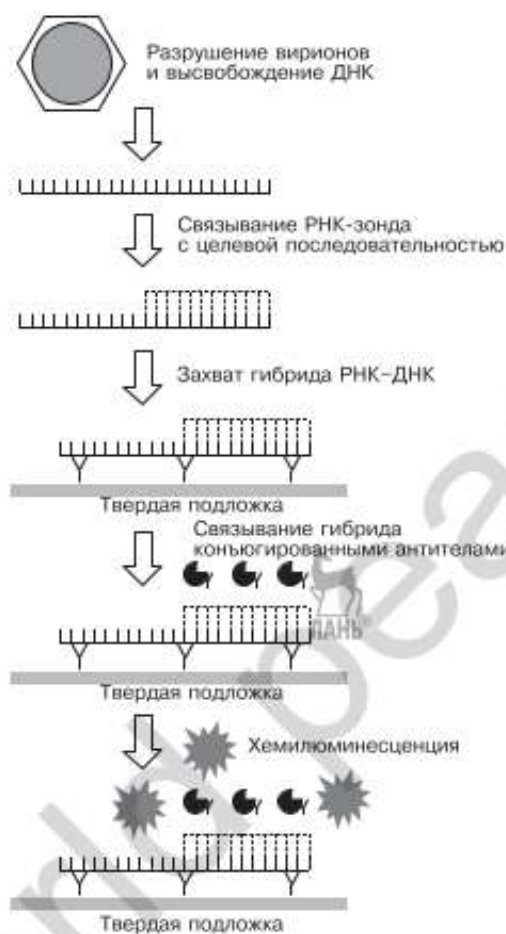
Метод разветвленной ДНК был улучшен путем применения в олигонуклеотидных зондах изомеров нуклеотидов изо-С и изо-G и модификации реагентов, что привело к повышению чувствительности и снижению фонового сигнала [64]. Другие модификации включают использование более коротких комплементарных участков для захвата целевых ДНК, приспособление зондов для последующей амплификации и добавление молекулы — усилителя сигнала. Методика была применена компанией Siemens Healthcare Diagnostics (д. Дирфилд, шт. Иллинойс, США) в системе Versant™ 440, предназначенной для определения вирусной нагрузки в анализах пациентов с гепатитом С или ВИЧ-1-инфекцией [65].

### Гибридный захват

Амплификация сигнала лежит в основе метода гибридного захвата (НС, от англ. *hybrid capture*). Эта технология позволяет регистрировать нуклеиновые кислоты непосредственно и использует амплификацию сигнала для обеспечения чувствительности, сравнимой с таковой для методов целевой амплификации (рис. 3.8) [66]. В ходе определения целевая ДНК и РНК-зонд образуют комплементарный гибрид РНК—ДНК, захватываемый специфичными к гибридной ДНК антителами, иммобилизованными на твердой подложке. С иммобилизованными гибридами связываются вторичные конъюгированные антитела, несущие фермент, который расщепляет хемилюминесцентный субстрат. Каждый гибрид может взаимодействовать с несколькими конъюгированными антителами, что позволяет усилить сигнал. Важное преимущество этого метода в том, что продукт амплификации не является нуклеиновой кислотой, что сводит к минимуму риск перекрестного загрязнения. Гибридный захват обладает хорошей чувствительностью, метод быстр и прост в использовании, а также дает возможность оценки вирусной нагрузки. Существуют использующие метод коммерческие тесты, выпускаемые Digene Corporation (г. Гейтерсберг, шт. Мэриленд, США) и предназначенные для определения HPV, вирусов в крови, вируса гепатита В и CMV.

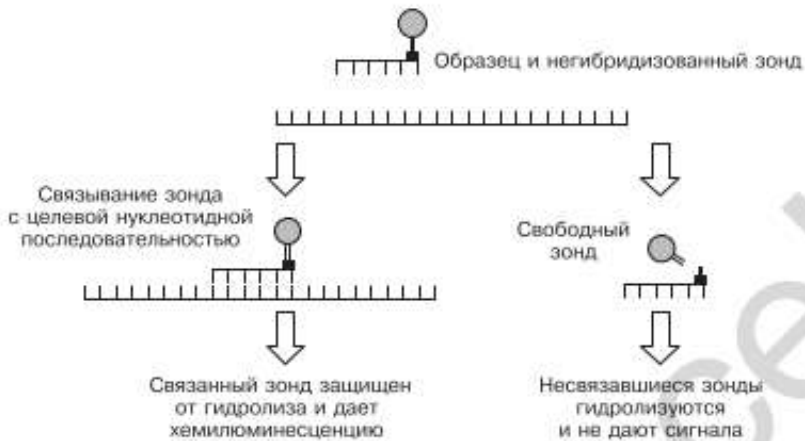
### Метод защиты гибридизацией

Метод защиты гибридизацией (НРА, от англ. *hybridization protection assay*) основан на использовании хемилюминесцентного акридинового эфира, связанного с ДНК-зондом, комплементарным целевой РНК (рис. 3.9). Связь, закрепляющая молекулу акридина на зонде, чувствительна к действию кислот [67]. Зонды, связавшиеся с целевой



**Рис. 3.8.** Метод гибридного захвата. Клинические пробы обрабатывают для высвобождения вирусной ДНК. Целевая ДНК гибридизуется с РНК-зондом, образуя РНК-ДНК-гибрид. Такие гибриды связываются иммобилизованными на твердой подложке антителами, специфичными к любому гибриду РНК-ДНК (а не к его специфической последовательности). Регистрация иммобилизованных гибридов осуществляется при помощи конъюгированных с ферментами антител. Генерация сигнала обеспечивается при добавлении в среду хемилюминесцентного субстрата, высвечивающего при гидролизе кванты света, регистрируемые люминометром. Коэффициент усиления сигнала в системе равен по меньшей мере 3000

молекулой, защищены от такого действия и способны давать люминесценцию, тогда как свободные зонды гидролизуются, необратимо утрачивая способность люминесцировать. Этот метод был разработан компанией Gen-probe (AccuProbe, г. Сан-Диего, шт. Калифорния, США) для обнаружения бактериальных патогенов.



**Рис. 3.9.** Метод защиты гибридизацией. Акридиновая метка ковалентно присоединена к одному из концов ДНК-зонда через чувствительный к действию кислот кислородный мостик. В присутствии целевой нуклеиновой кислоты зонд связывается с ней, что защищает кислородный мостик от гидролиза. Негибридизованные зонды гидролизуются, необратимо инактивируясь

## ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ ВИРУСОВ

До недавнего времени практически все вирусы открывали при использовании традиционных методов, таких как выделение в клеточной культуре или электронно-микроскопические исследования штаммов возбудителя. Вирус гепатита С был первым вирусом, открытым в 1989 г. исключительно при помощи молекулярно-биологических методов, и с этого момента приемы молекулярной биологии стали основным инструментом выделения новых вирусов [68]. За обнаружением вируса гепатита С последовало выделение человеческого герпесвируса-8 [69] и вируса гепатита G [70] с использованием методов целевой амплификации. Сегодня молекулярные методики шире применяются для определения новых вирусов в образцах из различных органов, особенно из дыхательных путей, кала и крови. Наибольшая активность в применении таких методов наблюдается для вирусов дыхательных путей. Так, с момента открытия метапневмовируса человека (HMPV) в 2001 г. [71] было обнаружено шесть прежде неизвестных вирусов в ходе молекулярно-биологических анализов клинических образцов из дыхательных путей человека. В их число входят три коронавируса человека (HCoV): коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), описанный в 2003 г. [72], коронавирус NL63, открытый в 2004 г. [73] и коронавирус HKU1, открытый в 2005 г. [74], а также бокавирус человека (HBoV), открытый в 2005 г. [75] наряду с недавно описанными человеческими полиомавирусами KI и WU [76, 77].

Эти новые вирусы были открыты с использованием недавно разработанных молекулярных методов, таких как VIDISCA [73], ДНК-

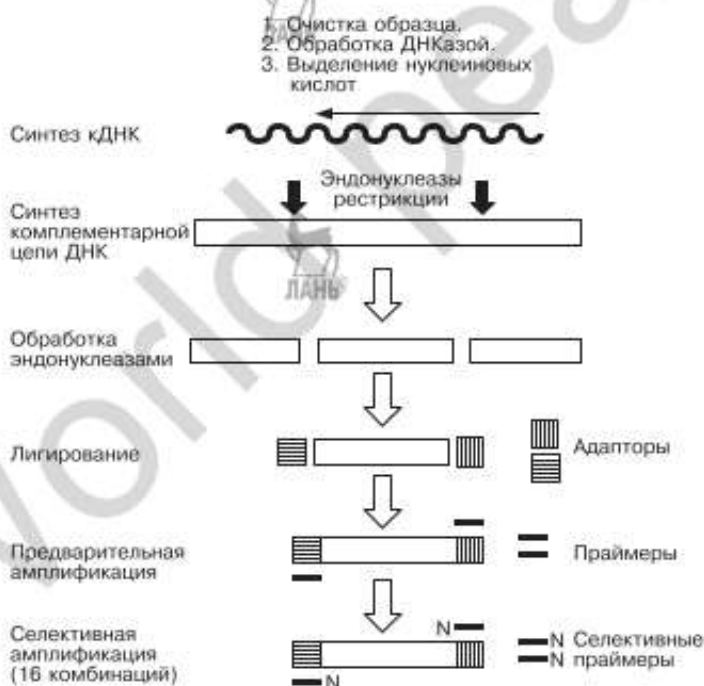


микрочипы широкой специфичности [78] и высокопроизводительное секвенирование [76, 77]. Эти и другие методы рассмотрены подробнее в работе Ambrose и Clewley [79].

### Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов кДНК, позволяющий обнаружить новые вирусы

В 2004 г. van der Noek и соотр. использовали модификацию метода амплификации с независимыми от последовательности праймерами, называемую полиморфизмом длины амплифицированных фрагментов кДНК (VIDISCA, от англ. *virus-discovery-cDNA-amplified fragment length polymorphism*) для определения нового коронавируса человека HCoV-NL63 в образцах из дыхательных путей (рис. 3.10). Этот метод основан на использовании двух праймеров в ПЦР и метода полиморфизма длины амплифицированных фрагментов [73].

Молекулу ДНК разрезают двумя эндонуклеазами рестрикции, например *MseI* и *HinP1I*, которые имеют сайты узнавания длиной



**Рис. 3.10.** VIDISCA. После синтеза кДНК ее расщепляют двумя эндонуклеазами рестрикции, например *MseI* и *HinP1I*, что приводит к образованию фрагментов с сайтами узнавания *MseI* и *HinP1I* на концах. Адапторы связываются с одним из липких концов, образуемых рестриктазами. Два праймера, специфичных к адапторам, затем используются для ПЦР-амплификации. Дальнейшая реакция вложенной ПЦР используется для преобразования шмера (множества) ДНК-продуктов в несколько полос

в 4 нуклеотида. Это приводит к образованию набора фрагментов ДНК с липкими концами *MseI* и *HinPII*, а также с липкими концами *MseI—MseI* и *HinPII—HinPII*. Далее амплифицируются только первые, поскольку в последующей ПЦР с одним из липких концов связываются адапторы. Для дальнейшей амплификации используются праймеры, комплементарные последовательностям адапторов. Для выделения из множества продуктов амплификации нескольких специфических продуктов (четких полос на агарозном геле) в дальнейшем используют приемы вложенной ПЦР.

### ДНК-микрочипы широкой специфичности

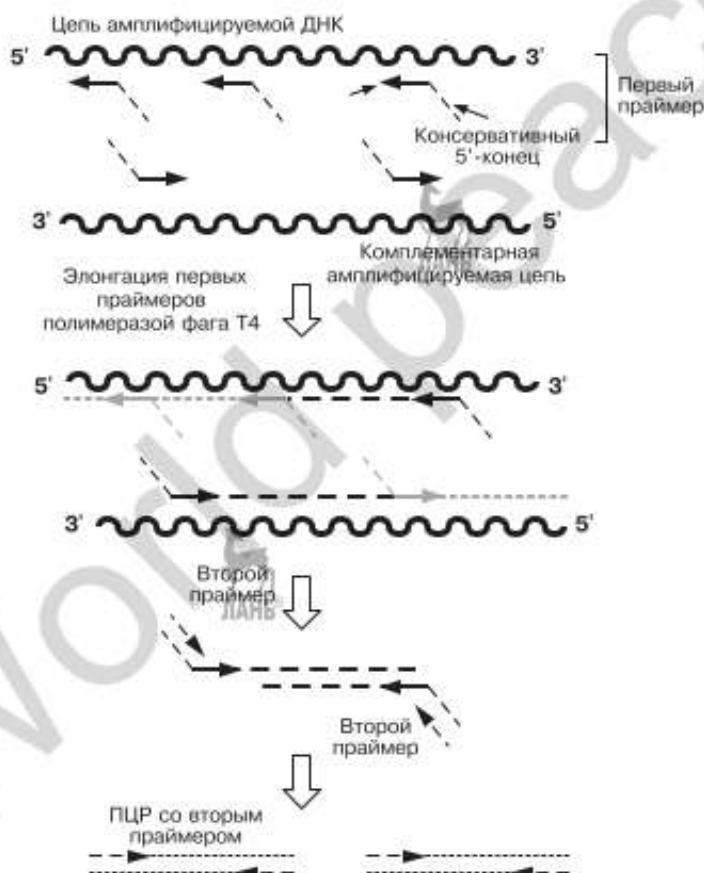
Wang и соавт. [81] создали «всеобъемлющие» ДНК-микрочипы, предназначенные для выделения геномов новых вирусов, и успешно идентифицировали с их помощью новый коронавирус, ассоциированный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS) [78], и полиомавирус человека WU [77]. Эти микрочипы состоят из 70-нуклеотидных зондов, комплементарных высококонсервативным вирусным последовательностям, идентифицированным при анализе баз данных секвенированных вирусных геномов [78]. Для каждого вируса было изготовлено 10 зондов, в результате чего на готовом микрочипе присутствовало порядка 10 000 зондов из последовательностей геномов примерно 1000 вирусов. Ученые [81] использовали эти микрочипы для идентификации коронавируса, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом, после его выделения из образцов страдающего SARS пациента и культивирования в культуре клеток Vero. Для изучения этого нового коронавируса гибридизовавшиеся с микрочипом фрагменты ДНК были выделены и секвенированы.

Для регистрации продуктов независимой от последовательности ПЦР также были разработаны вирусспецифичные микрочипы. Boriskin и соавт. [82] разработали диагностический ДНК-микрочип, специфичный к возбудителям заболеваний центральной нервной системы, для анализа образцов спинномозговой жидкости и других проб. Чип содержит 38 генов-мишеней 13 вирусных возбудителей менингитов и энцефалитов. Другие микрочипы были созданы для быстрого определения и серотипирования вирусных возбудителей острых заболеваний дыхательных путей [83], а также для одновременного определения герпесвирусов, энтеровирусов и флавивирусов [84]. Микрочипы широкой специфичности, основанные на последних данных секвенирования вирусных геномов, имеют большие перспективы в плане обнаружения неизвестных вирусов, имеющих гомологии с ранее описанными [85].

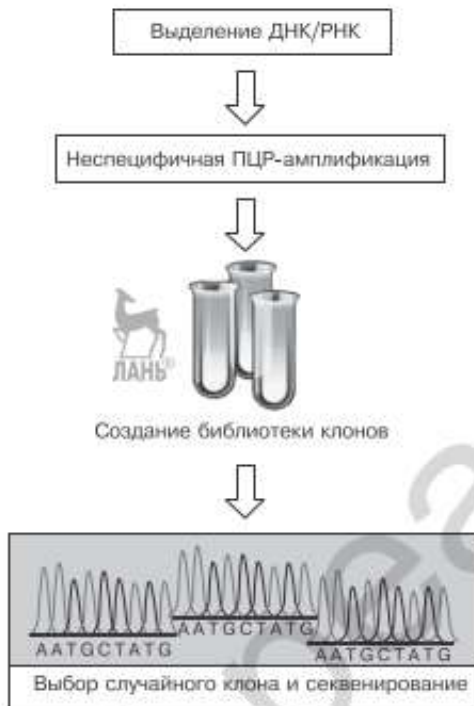
### Неспецифичная ПЦР-амплификация и высокопроизводительное секвенирование

В некоторых случаях гораздо проще амплифицировать вирусные нуклеиновые кислоты при помощи неспецифичной (англ. *random*) ПЦР,

чем выделять их, используя микро칩ы [81]. Для неспецифичной ПЦР обычно используют один вырожденный праймер с консервативной последовательностью на 5'-конце (рис. 3.11). Эта последовательность содержит сайты узнавания рестриктаз, необходимые для последующего клонирования. На 3'-конце праймер содержит вырожденную гепта- или гексамерную последовательность [80, 86]. Второй праймер, необходимый для дальнейшей амплификации, комплементарен консервативной последовательности на 5'-конце первого праймера. Полученные продукты ПЦР затем клонируют и секвенируют (рис. 3.12). Неспецифичная ПЦР может использоваться для обнаружения как ДНК-, так и РНК-вирусов [87].



**Рис. 3.11.** Неспецифичная ПЦР. Изначальную ПЦР проводят с использованием праймеров, состоящих из консервативного 5'-конца и вырожденных 6- или 5-нуклеотидных последовательностей на 3'-конце. Вторым праймером для последующей амплификации продуктов служит последовательность, комплементарная консервативному 5'-концу первых праймеров



**Рис. 3.12.** Неспецифичная ПЦР и высокопроизводительное секвенирование. После неспецифичной ПЦР полученные продукты клонируют (либо неспецифически разрезают и лигируют к адапторам) и затем секвенируют

## ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Несмотря на то что методы, основанные на определении нуклеиновых кислот, обладают целым рядом преимуществ, применять их следует с осторожностью; эта рекомендация особенно актуальна для тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, для которых крайне важно предотвратить загрязнение образца и обеспечить контроль качества результатов. Теоретически для появления сигнала при амплификации нуклеиновых кислот достаточно одной копии ДНК- или РНК-мишени. В силу этого даже одна копия вирусного генома, попавшая в реакционную смесь из других образцов или из лабораторного окружения, может дать ложноположительный результат. Точно так же ингибиторы, содержащиеся в материале образцов или разрушение нуклеазами могут приводить к ложноотрицательным результатам. Ложноотрицательные результаты могут также быть следствием нарушения методики на этапе выделения нуклеиновых кислот [14, 16].

Следует понимать, что ложноотрицательные результаты можно получить даже при идеальной постановке эксперимента и отборе образцов. Такая ситуация обусловлена отсутствием в геноме некоторых вирусов последовательностей, консервативных в достаточной степени для их однозначного определения в диагностических тестах; ложноотрицательные результаты в этом случае вызваны недостаточной комплементарностью праймера и целевой последовательности. Причин этому несколько, и среди них — полиморфизм вирусных геномов и отсутствие информации о всех возможных в природе последовательностях. Недавно открытые вирусы представляют наибольшую проблему из-за отсутствия информации о последовательностях их геномов. Так, неизвестна полная нуклеотидная последовательность теоретически ожидаемого пандемического варианта вируса гриппа H5N1, который может возникнуть в любое время, что осложнит его диагностику в самом начале пандемии. Разработанные методики определения этого вируса, основанные на использовании последовательностей генома циркулирующего сейчас H5N1, — наиболее эффективная мера диагностики и профилактики такой пандемии. В настоящий момент предложено несколько методов определения нуклеиновых кислот вируса, снижающих вероятность ложноотрицательных результатов [88].

Влияние вариабельности целевых последовательностей на результаты диагностических тестов не ограничивается только ложноположительными результатами и иногда имеет менее выраженные эффекты. Вместо полной невозможности амплификации несоответствие между последовательностями *праймера* и мишени может вести к задержке начала амплификации. При ПЦР в реальном времени такая задержка обуславливает появление сигнала на более позднем цикле. При *количественной* ПЦР в реальном времени это ведет к недооценке вирусной нагрузки образца на несколько порядков. Для *качественных* анализов, основанных на ПЦР, такая задержка может привести к снижению чувствительности до 1000 раз [89]. Вариации в целевой последовательности *зондов* могут вести к снижению флуоресцентного сигнала положительных образцов до такой величины, при которой однозначно классифицировать образец как положительный будет невозможно [90]. Вариабельность целевых последовательностей тоже может затруднить генотипирование с применением зондов [91].

Еще один недостаток анализов, основанных на определении нуклеиновых кислот, — невозможность получить с их помощью данные о жизнеспособности патогена. Тем не менее такие методы оказываются прекрасным инструментом для диагностики некультивируемых и медленно растущих патогенов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения молекулярной биологии последних 20 лет произвели революцию в диагностике вирусных заболеваний и расширили ар-

сенал инструментов выделения и описания ранее неизвестных вирусов. На сегодняшний день наиболее применяемый в диагностической практике метод — это ПЦР, однако постепенно все большее значение приобретают и другие методы. Новые приборы и разработка готовых наборов принесли необходимую стандартизацию и простоту, которые позволяют надеяться на внедрение молекулярных методов в большинстве лабораторий в ближайшее десятилетие.

После разработки новых молекулярно-биологических методов возможности регистрации и описания ранее неизвестных вирусных агентов заметно расширились. Результатом этого является получение последовательностей генома новых вирусов, ассоциированных с дыхательными путями и пищеварительной системой, а также нескольких вирусов из крови. Некоторые из этих вирусов оказались патогенными, вызывающими заболевания у определенных групп населения. Другие обнаруживаются в клинических образцах безо всякой связи с какими-либо заболеваниями, тогда как третьи, такие как ТТ-вирус (*torque teno virus*) [92, 93] и мимивирус [94, 95], оказались слабо ассоциированными с респираторными заболеваниями человека. Следует полагать, что существенная часть клинически значимых вирусных патогенов до сих пор остается неидентифицированной. Хотя молекулярно-биологические методы все шире используются для исследования заболеваний предположительно вирусной природы, они по-прежнему остаются технически сложными и все еще очень часто дают неспецифичную амплификацию невирусных нуклеиновых кислот. Тем не менее продолжающееся совершенствование существующих методик и разработка новых, более надежных и воспроизводимых приемов означает, что выделение и описание новых вирусных патогенов человека выходит на следующий уровень.

Все более широкое внедрение методов молекулярной биологии в клинической диагностике позволяет надеяться на качественный скачок в понимании эпидемиологии вирусных заболеваний. И хотя для диагностики бактериальных заболеваний по-прежнему будут использоваться традиционные методы, в диагностике вирусных заболеваний на первое место выйдут молекулярные подходы. В ближайшее десятилетие намечается прогресс в диагностике важных детских вирусных заболеваний с определением вирулентности патогена и его устойчивости к химиотерапевтическим препаратам в течение четырех—шести часов. Применение таких методов позволит также расширить знания об эпидемиологии вирусных инфекций дыхательных путей и пищеварительного тракта. Точное определение и идентификация уже известных и еще не открытых вирусов у детей и лиц с ослабленным иммунитетом будут развиваться с внедрением последних молекулярно-биологических разработок, что в сочетании с достижениями в клеточной биологии позволяет надеяться на появление новых противовирусных и иммуномодулирующих препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335–350.
2. Wu DY, Wallace RB. The ligation amplification reaction (LAR) — Amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989; 4:560–569.
3. Kwok DY, Davis GR, Whitfield KM, et al. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1173–1177.
4. Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 2006; 6:2–12.
5. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487–491.
6. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350–1354.
7. Mulder J, McKinney N, Christopherson C, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32:292–300.
8. Berger A, Braner J, Doerr HW, et al. Quantification of viral load: Clinical relevance for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Intervirology* 1998; 41: 24–34.
9. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:533–554.
10. Lee WM, Kieszner C, Pappas T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS ONE* 2007; 2:e966.
11. Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem* 1991; 198:86–91.
12. Syrnis MW, Whiley DM, Thomas M, et al. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn* 2004; 6:125–131.
13. Roth WK, Lee JH, Rüster B, et al. Comparison of two quantitative hepatitis C virus reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol* 1996; 34:261–264.
14. Niesters HG. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 5–11.
15. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, et al. Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol* 2007; 9:87–102.
16. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:165–256.
17. Livak KJ, Flood SJ, Marmiro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4:357–362.
18. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22:130–131, 134–1348.

19. Brainard JA, Greenson JK, Vesey CJ, et al. Detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsies. A comparison of light microscopy, immunohistochemistry, duplex PCR and nested PCR. *Transplantation* 1994; 27:1753–1757.
20. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC, et al. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods* 2001; 97:159–164.
21. Schützle H, Weigl J, Puppe W, et al. Diagnostic performance of a rapid antigen test for RSV in comparison with a 19-valent multiplex RT-PCR ELISA in children with acute respiratory tract infections. *Eur J Pediatr* 2008; 167:745–749.
22. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, et al. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1696–1701.
23. Lee WM, Grindle K, Pappas T, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2626–2634.
24. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1352–1355.
25. Jung R, Soondrum K, Neumaier M. Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:833–836.
26. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwok DY, et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1874–1878.
27. Loeffler J, Hebart H, Cox, P, et al. Nucleic acid sequence-based amplification of *Aspergillus* RNA in blood samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1626–1629.
28. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet* 2001; 358:892–893.
29. Mahony JB, Song X, Chong S, et al. Evaluation of the NucliSens Basic Kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1429–1435.
30. Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 61:67–99.
31. van Gemen B, van Beuningen R, Nabbe A, et al. A one-tube quantitative HIV-1 RNANASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes. *J Virol Methods* 1994; 49:157–167.
32. Witt DJ, Kemper M, Stead A, et al. Analytical performance and clinical utility of a nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3994–3999.
33. Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2794–2798.
34. Leone G, van Schijndel H, van Gemen B, et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:2150–2155.
35. Ayele W, Pollakis G, Abebe A, et al. Development of a nucleic acid sequence-based amplification assay that uses gag-based molecular beacons to distinguish between human immunodeficiency virus type 1 subtype C and C infections in Ethiopia. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1534–1541.



36. Capaul SE, Gorgievski-Hrisoho M. Detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ Enterovirus assay. *J Clin Virol* 2005; 32:236–240.
37. Gulliksen A, Solli L, Karlsen F, et al. Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes. *Anal Chem* 2004; 76:9–14.
38. Moore C, Hibbitts S, Owen N, et al. Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A. *J Med Virol* 2004; 74:619–628.
39. Zaytaeva NV, Montagna RA, Lee EM, et al. Multianalyte single-membrane biosensor for the serotype-specific detection of Dengue virus. *Anal Bioanal Chem* 2004; 380:46–53.
40. Walensky RP. APTIMA assay approved for HIV testing. *AIDS Clin Care* 2006; 18:109–110.
41. Morishima C, Morgan TR, Everhart JE, et al. HCV RNA detection by TMA during the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (Halt-C) trial. *Hepatology* 2006; 44:360–367.
42. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, et al. Strand displacement amplification — An isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1691–1696.
43. Walker GT, Linn CP, Nadeau JG. DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using a DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:348–353.
44. Nadeau JG, Pitner JB, Linn CP, et al. Real-time, sequence-specific detection of nucleic acids during strand displacement amplification. *Anal Biochem* 1999; 6:177–187.
45. Nycz CM, Dean CH, Haaland PD, et al. Quantitative reverse transcription strand displacement amplification: Quantitation of nucleic acids using an isothermal amplification technique. *Anal Biochem* 1998; 259:226–234.
46. Nuovo GJ. In situ strand displacement amplification: An improved technique for the detection of low copy nucleic acids. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9:195–202.
47. Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(10):4641–4645.
48. Liu D, Daubendiek SL, Zillman MA, et al. Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J Am Chem Soc* 1996; 118(7):1587–1594.
49. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2006; 363:206–220.
50. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 1998; 19:225–232.
51. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TCH, et al. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene* 1998; 211:277–285.
52. Thomas DC, Nardone GA, Randall SK. Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:1170–1176.
53. Demidov VV. 10 years of rolling the minicircles: RCA assays in DNA diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:477–478.
54. Cheglakov Z, Weizmann Y, Basnar B, et al. Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of DNazymes. *Org Biomol Chem* 2007; 5:223–225.
55. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E63.

56. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:189–193.
57. Chen X, Livak KJ, Kwok PY. A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Res* 1998; 8:549–556.
58. Carrino JJ, Laffler TG. Detection of HIV DNA sequences using the ligase chain reaction (LCR). *Clin Chem* 1991; 37:1059.
59. Rinehardt L, Hampl H, Laffler TG. Ultrasensitive non-radioactive detection of herpes simplex virus by LCR, the ligase chain reaction. In: 20th Annual Meeting of the Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, March 8–15, 1991:101. Lake Tahoe, CA.
60. Bond S, Carrino J, Hampl H, et al. New methods of detection of HPV. In: Monsonogo J, ed. *Serono Symposia*. Paris, France: Raven Press, 1990:425–434.
61. Bhatt R, Scott B, Whitney S, et al. Detection of nucleic acids by cycling probe technology on magnetic particles: High sensitivity and ease of separation. *Nucleosides Nucleotides* 1999; 18:1297–1299.
62. Bekkaoui F, McNevin JP, Leung CH, et al. Rapid detection of the mecA gene in methicillin resistant staphylococci using a colorimetric cycling probe technology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:83–90.
63. Urdea MS, Running JA, Horn T, et al. A novel method for the rapid detection of specific nucleotide sequences in crude biological samples without blotting or radioactivity; application to the analysis of hepatitis B virus in human serum. *Gene* 1987; 61:253–264.
64. Kern D, Collins M, Fultz T, et al. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34:3196–3202.
65. Elbeik T, Dalessandro R, Loftus RA, et al. HIV-1 and HCV viral load cost models for bDNA: 440 molecular system versus real-time PCR AmpliPrep/TaqMan test. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7:723–753.
66. Black CM, Morse SA. Diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. *Current Infectious Disease Reports* 2000; 2:31–43.
67. Arnold LJ Jr, Hammond PW, Wiese WA, et al. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 1989; 35:1588–1594.
68. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359–362.
69. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266:1865–1869.
70. Birkenmeyer LG, Desai SM, Muerhoff AS, et al. Isolation of a GB virus-related genome from a chimpanzee. *J Med Virol* 1998; 56:44–51.
71. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719–724.
72. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1953–1966.
73. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368–373.
74. Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005; 79:884–895.
75. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:12891–12896.

76. Allander T, Andreasson K, Gupta S, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007; 81:4130–4136.
77. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007; 3:595–604.
78. Wang D, Urisman A, Liu YT, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003; 1:257–260.
79. Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol* 2006; 16:365–383.
80. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nuc Acids Res* 1995; 23:4407–4414.
81. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15687–15692.
82. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, et al. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5811–5818.
83. Lin B, Vora GJ, Thach D, et al. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory disease-associated adenoviruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3232–3239.
84. Korimbocus J, Scaramozzino N, Lacroix B, et al. DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses, and flaviviruses. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3779–3787.
85. Clewley JP. A role for arrays in clinical virology: Fact or fiction? *J Clin Virol* 2004; 29:2–12.
86. Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 1996; 9:745–753.
87. Stang A, Korn K, Wildner O, et al. Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43:716–720.
88. Whiley DM, Lambert SB, Bialasiewicz S, et al. False-negative results in nucleic acid amplification tests—do we need to routinely use two genetic targets in all assays to overcome problems caused by sequence variation? *Crit Rev Microbiol* 2008; 34:71–76.
89. Lengerova M, Racil Z, Volfova P, et al. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability within exon 4 of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1042–1044.
90. Whiley DM, Sloots TP. Sequence variation can affect the performance of minor groove binder TaqMan probes in viral diagnostic assays. *J Clin Virol* 2006; 35:81–83.
91. Whiley DM, Sloots TP. Melting curve analysis using hybridisation probes: Limitations in microbial molecular diagnostics. *Pathology* 2005; 37:254–256.
92. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: Relations to viremia and disease severity. *J Virol* 2003; 77:2418–2425.
93. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, et al. High torqueteno virus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:804–808.
94. Khan M, La SB, Lepidi H, et al. Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *Microb Pathog* 2007; 42:56–61.
95. Raoult D, La SB, Birtles R. The discovery and characterization of mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clin Infect Dis* 2007; 45:95–102.

## 4 ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСОВ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ

**П.А. Ревилл, Д.С. Боуден**

P.A. Revill and D.S. Bowden, Victorian Infectious Diseases  
Reference Laboratory, Victoria, Australia

**П.А. Уайт**

P.A. White, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences  
(BABS), University of New South Wales, Sydney, Australia

### ВВЕДЕНИЕ

По мере разработки новых технологий возможности изучения новых вирусов непрерывно изменяются. Большая часть известных сейчас вирусов человека была обнаружена с использованием лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток. И хотя не все вирусы способны расти в культуре и не все вирусы в таких условиях дают цитопатогенный эффект, заражение культуры может приводить к характерным и воспроизводимым изменениям морфологии клеток. В некотором смысле описание таких изменений представляет собой вариант фенотипирования. После развития серологических методов в 1970-х гг. некоторые классы вирусов стали определять при помощи специфических антител, нейтрализующих их инфекционность. Серотипирование с использованием нейтрализующих антител позволило охарактеризовать типоспецифичные антигены, на основании сведений о которых строится классификация вирусов. Так были описаны полиовирус (типы 1, 2 и 3), вирус гепатита В (adw, adr, ayw и ayg), вирус денге (типы 1, 2, 3 и 4) и множество других групп вирусов, однако для некоторых вирусов серотипирование невозможно. С развитием молекулярной биологии они были охарактеризованы генетически — сначала с использованием технологии гибридизации, а позже при помощи молекулярной амплификации (ПЦР) и высокопроизводительного секвенирования.

### МУТАЦИИ ВИРУСОВ

Генотип формируется в ходе эволюции вируса при мутировании исходного генетического материала. Геномы вирусов очень небольшого размера и интенсивно мутируют [1], поэтому их изменчивость крайне высока. В противоположность вирусам, эволюция млекопитающих идет сравнительно медленно благодаря высокой точности репликации и медленной смене поколений. Вирусы используют все возможные механизмы мутагенеза: точечные мутации, рекомбинацию, инверсию и реассортацию. Чаще всего частота мутаций вирусов напрямую зависит от точности их полимераз. У РНК-содержащих вирусов, по всей видимости, интенсивность мутаций наибольшая, примерно  $10^{-3}$ – $10^{-4}$

мутаций на нуклеотид за одну репликацию (величина, обозначаемая как  $u = M/N$ ; где  $M$  — число мутаций,  $N$  — количество циклов репликации генома [2]). Частота мутаций на каждый синтезированный РНК-геном ( $U$ ) для большинства РНК-содержащих вирусов колеблется в диапазоне от 1 до 0,1, где  $U = G \cdot u$  ( $G$  — размер генома в нуклеотидах [2]). Иными словами, при их репликации вероятность ошибки в геноме составляет от 0,1 до 1. Наибольшее значение  $U$ , составляющее примерно 1, наблюдается у таких вирусов, как вирус гепатита С и ВИЧ. При частоте мутаций  $U > 1$  возникают серьезные отрицательные последствия, поэтому РНК-вирусы не превышают этого значения [1]. При такой частоте мутаций в организме хозяина в каждый момент времени существует несколько вариантов вируса, вместе называемых квазивидом. Квазивиды — группа близкородственных молекул ДНК или РНК, имеющих небольшие различия, но тем не менее эволюционирующих как единая популяция при изменении условий среды [3]. Возникновение квазивида при инфекции HCV или ВИЧ и их высочайшая генетическая изменчивость обусловлены низкой точностью их репликативных полимераз и отсутствием у них корректирующей активности [4]. По сравнению с РНК-вирусами реплицируемые ДНК-полимеразой ДНК-вирусы обладают примерно в 100 раз меньшей частотой ошибок на нуклеотид ( $u = 1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$ ). Исключение из этого правила составляет вирус гепатита В (HBV). Хотя он относится к ДНК-содержащим, его жизненный цикл включает стадию прегеномной РНК (пгРНК). Эта пгРНК в ходе обратной транскрипции превращается в вирусную ДНК кодируемой вирусом ревертазой, не имеющей корректирующей активности, что и служит причиной такой же высокой частоты ошибок, как и у HCV или ВИЧ.

Невысокая частота мутаций у ДНК-вирусов в значительной степени объясняется наличием у их полимераз корректирующей активности, которой нет у полимераз РНК-вирусов и ретровирусов. Одно из следствий более низкой частоты мутаций — способность ДНК вирусов поддерживать репликацию более длинных геномов, что позволяет кодировать, помимо абсолютно необходимых, еще и некоторые другие функции, такие как механизмы избегания иммунной реакции и ферменты транскрипции. В этом отношении HBV вновь оказывается исключением: из-за наличия стадии пгРНК и обратной транскрипции вирус гепатита В обладает одним из самых коротких ДНК-геномов — всего 3,2 т. п. н.

Случайные мутации вследствие ошибок репликации могут приводить к изменениям фенотипа, которые дают селективное преимущество — такие вирусы подвергаются положительному отбору. Селективные преимущества, обусловленные мутациями, могут быть самыми разными — от размножения в присутствии противовирусных препаратов до способности обходить ответ клетки на инфекцию. Иногда такие изменения могут даже давать вирусу способность заражать нового хозяина. У ВИЧ и вируса гепатита В мутациями в гене ревертазы обусловлена устойчивость к целому ряду противовирусных пре-

паратов (см. ниже), а мутации вируса гриппа в генах гемагглютинина и нейраминидазы позволяют ему расширять круг хозяев, например заражать не только птиц, но и человека (см. великоленные обзоры по теме [5–7]). Однако далеко не все мутации дают селективное преимущество. Вирусы с вредными мутациями подвергаются отрицательному отбору и удаляются из популяции. Существует теория, согласно которой подавляющее большинство мутаций никак не отражаются на фенотипе и закрепляются в геноме случайно [8]. Теория получила название нейтральной теории молекулярной эволюции. Генетическая вариабельность популяции поддерживается, по этой теории, постоянным возникновением нейтральных мутаций, ведущих к появлению равноценных изоаллелей. Для вирусов, подобных HCV, такой нейтральный дрейф генов вероятнее всего и служит основной причиной огромного разнообразия геномных последовательностей, поскольку географически изолированные популяции вируса в течение долгого времени накапливают мутации независимо, в то же время практически полностью сохраняя основные фенотипические характеристики [9]. Предположительное время дивергенции существующих генотипов HCV от общего предка на основании скорости накопления мутаций оценивается в 500–1000 лет, хотя не исключено, что оценка эта занижена [9].

Хотя нейтральные мутации не оказывают прямого влияния на фенотип вирусов, они тем не менее способны играть важную роль в эволюции и жизнедеятельности вирусов. Мутации, не приводящие к изменению последовательности белка, могут влиять на некодирующие транскрипционные факторы и промоторные последовательности или на вторичную структуру РНК, изменяя тем самым синтез РНК, стабильность генома и синтез белка.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ

В вирусологии геномные последовательности в пределах вида обычно разделяют на несколько групп. Уровни классификации обычно называют геногруппами, генотипами и кластерами. Степень различия для этих трех классификационных групп варьирует для разных видов, что объясняет отсутствие межвидовой стандартизации в номенклатуре. Среди вирусов человека наибольшая частота мутаций наблюдается у ВИЧ и HCV, а другие вирусы, включая такие РНК-содержащие как вирусы кори и эпидемического паротита, проявляют более низкую генетическую изменчивость и существуют в виде одного или нескольких генетических кластеров или генотипов. Среди ВИЧ-1 наиболее распространены вирусы группы М, у них от 50 до 80% нуклеотидной последовательности, кодирующей оболочку, общие с вирусами других групп ВИЧ-1 (табл. 4.1). Группы ВИЧ разделены на несколько клад, которые различаются до 30% нуклеотидной последовательности области белков оболочки, а вирусы внутри клады различаются не более чем на 15%.

Таблица 4.1

## Генетические различия на разных уровнях классификации

Вирус	Ген	Уровень 1		Уровень 2		Уровень 3		Ссылка
		Номенклатура	Различия, %	Номенклатура	Различия, %	Номенклатура	Различия, %	
ВИЧ-1	Между группами (M или N)			Между кладами (A или B)		Внутри клады (A или A)		10, 11
			-30%		-15%		4-10,5%	
NoV	ген							12
	ген		20-52%		-30%		10-15%	
HCV	Геном	Между генотипами (G1 или GII)	-46%	Между генотипами (GII. 4 или GII. 6)	-18%	Внутри генотипа (GII. 4 или GII. 4)	-6%	12
	Геном	Между генотипами (1 или 2)	-33%	Между подтипами (1a или 1b)	-23%	Внутри подтипа (1a или 1a)	-9%	
HBV	Ген s	Генотипы	>8%	Субгенотипы	-4%			13

Генетическая классификация вируса гепатита С (HCV) включает три уровня. Первый уровень — это генотипы, имеющие >35% различий на геном в 9,5 т. п. н. (см. табл. 4.1, [10–13]). Второй уровень делит генотипы на подтипы, внутри которых генетическая последовательность варьирует в пределах 27%. Третий уровень объединяет штаммы внутри подтипа, различающиеся примерно на 8%. Для вируса гепатита В (HBV) по всему миру было выявлено восемь разных генотипов (от А по Н), имеющих не более 8% различий на геном [14–17]. Внутри генотипа геномы отличаются не более чем на 4% [18–21] и подразделяются на множество субгенотипов, хотя клиническое значение многих субгенотипов не установлено. У HBV разделение по генотипам основано на нуклеотидной последовательности детерминанты гена поверхностного антигена [13] или, в более поздних работах, на основании промоторной и кодирующей областей прекодового гена, кодирующего секретируемый белок HBeAg [22]. Недавно разработанная компьютерная программа позволяет идентифицировать генотип по исходной геномной последовательности HBV, содержащей детерминанту, а также мутации в геноме [23].

Высокое разнообразие генотипов также наблюдается у вирусов других групп; так, анализ полных последовательностей геномов норовирусов (NoV) генотипа II привел к выделению внутри нее 17 генотипов, различающихся примерно на 18% (см. табл. 4-1, [12]).

## Рекомбинация

Классификацию генотипа затрудняет также наличие рекомбинантов в вирусных популяциях. Рекомбинация РНК — одна из основных движущих сил эволюции вирусов (обзор см. в [24]). Рекомбинация может влиять на филогенетическое группирование вирусов, повысить вирулентность вируса, затруднить молекулярно-эпидемиологические исследования и сильно повлиять на ход разработки вакцины. Рекомбинация представляет собой обмен генетическим материалом двух различных вирусов при одновременном заражении ими одной клетки, в результате чего образуется новый вирусный геном, способный к автономной репликации [24]. Рекомбинация широко распространена у таких вирусов, как ВИЧ, HBV и NoV [25], однако не характерна для HCV. Наиболее распространенный в Азии подтип генотипа В HBV на самом деле представляет собой рекомбинант генотипов В и С [21, 26]; наряду с ним существует множество других рекомбинантов, несущих фрагменты геномов различных генотипов. Рекомбинация может осложнять таксономическую классификацию, что было наглядно продемонстрировано при генотипировании нового варианта HBV во Вьетнаме, представлявшего собой рекомбинант генотипов А, В и D, который был ошибочно выделен в новый генотип I [27]. Впоследствии это решение было пересмотрено [28]. Таким образом, необходимо проявлять осторожность при классификации вирусов на основании небольшого количества известных последовательностей. Сложности классификации, связанные с рекомбинацией, не ограничивают-



ся таксономией HBV. Рекомбинант ВИЧ подтипа А был изначально классифицирован как подтип Е [29, 30], после чего был уже отнесен к подтипу А (обзор в [31]); также были выявлены рекомбинанты HCV со структурными генами генотипа 2k, несущие неструктурные гены генотипа 1b [32]. Истинная частота рекомбинаций в вирусных геномах, по всей видимости, недооценена, так как вирусные геномы редко секвенируют полностью.

### Филогенетический анализ

После получения полной последовательности вирусного генома можно применить филогенетический анализ для установления родства между вирусами, а также осуществить кластеризацию родственных геномов, определить скорость эволюции, проследить происхождение возбудителя и даже применить полученные знания для разработки вакцин. Раньше филогенетический анализ позволял только сравнивать последовательность с геномами одного или нескольких близкородственных видов с использованием простой программы выравнивания. Однако по мере расширения и усложнения базы анализируемых последовательностей такой подход быстро становится непрактичным. Сложные программы анализа, использующие методы присоединения соседей (*neighbor joining*), максимального правдоподобия (*maximum likelihood*), максимальной экономии (*parsimony*), а затем и Байесов анализ [33], позволяют строить филогенетические деревья, графически представляющие родственные связи и в некоторых случаях позволяющие установить время возникновения таксономической группы. После непродолжительного обучения исследователь даже с самыми незначительными навыками работы на компьютере способен при помощи таких программ строить филогенетические деревья. Тем не менее такой анализ не лишен недостатков. При неверном проведении филогенетического анализа выводы могут оказаться ошибочными. Важнейшее условие получения верных сведений при помощи филогенетического анализа — построение верных выравниваний. Простота использования программ выравнивания, таких как CLUSTAL\_X [34], и программ построения филогенетических деревьев, например TreeView [35], позволяет получить результаты (не обязательно правильные). — *Прим. ред.*) даже без понимания фундаментальных принципов работы положенных в основу такого анализа алгоритмов. Прежде всего необходимо вручную проверять сделанные программой выравнивания, поскольку только от их качества зависит точность построения филогенетического древа. Важно также проверять достоверность и самого древа, основной метод для этого — бутстрэп-анализ [36]. Иногда полезно строить деревья при помощи различных программных пакетов и различных алгоритмов, после чего сравнивать получаемые результаты. Полный и детальный обзор филогенетического анализа представлен в литературе [37, 38].

Хотя чаще всего филогенетический анализ используется в вирусологии для простого установления родства между различными ви-

русами, филогенетические методы не сводятся только к построению деревьев. Филогенетический анализ дает мощный инструмент для выявления происхождения возбудителя вирусной инфекции и изучения его эволюции [33]. Такие программы, как HyPhy [39], доступная на сайте DataMonkey ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)), и BEAST [33], позволяют рассчитывать скорости положительного, нейтрального или отрицательного отбора по гену, вычисляя количество возможных синонимичных и несинонимичных мутаций. Эти данные позволяют обнаружить области генома, находящиеся под давлением отбора, что может быть полезно при разработке вакцин. Изучение эпитопов полиовируса позволило выявить, что эпитопы, находящиеся под давлением отрицательного отбора, предпочтительнее в качестве мишеней вакцины, поскольку мутации в них чаще приводят к нежизнеспособным фенотипам и с меньшей вероятностью могут привести к возникновению вируса, резистентного к вакцине [40].

## МЕТОДОЛОГИЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ. ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДИКИ

Генотипирование чаще всего основано на той или иной форме анализа генома. Оно может включать полное секвенирование генома, анализ определенного его участка или идентификацию отдельных нуклеотидов. Для геномов малого и среднего размера золотым стандартом являются полногеномное секвенирование и последующий филогенетический анализ. В некоторых случаях секвенирование и анализ отдельных генов предоставляют достаточно данных для генотипирования. Это зависит от степени консервативности последовательности и размера самого гена. Для поиска в GenBank последовательностей с высоким уровнем гомологии полезно использовать программы сравнения последовательностей, такие как BLAST, однако генотип вируса указан отнюдь не для всех последовательностей в GenBank. Анализ геномов может быть неудобен для определения генотипов, поэтому разработаны специальные методы для упрощения процесса и повышения производительности (табл. 4.2). Тем не менее многие из подобных методик в той или иной степени опираются на анализ последовательностей геномов.

Таблица 4.2

### Преимущества и недостатки различных методик генотипирования

Методы генотипирования	Преимущества	Недостатки
Секвенирование и филогенетический анализ	На сегодняшний день считается золотым стандартом. Предоставляет наибольший объем информации, позволяющей классифицировать генотипы и идентифицировать рекомбинантов	Требует больших времени и трудозатрат, знания программ анализа последовательностей, сведений о геномах родственных видов

Окончание табл. 4.2

Методы генотипирования	Преимущества	Недостатки
Полиморфизм длины рестриционных фрагментов	Обработка рестриктазами продуктов ПЦР — это дешево, технически просто и быстро. Осуществляется простая идентификация известных генотипических паттернов	Требует информации о последовательности генома для выбора рестриктаз. Однонуклеотидные полиморфизмы в сайтах узнавания рестриктаз могут затруднить анализ результатов. Даже единичная мутация может привести к неверному типированию
Типоспецифичная ПЦР	Простая процедура. Позволяет идентифицировать генотипы в случае смешанных инфекций несколькими генотипами	Требует информации о последовательности генома для разработки ПЦР-праймеров. Мутации или однонуклеотидные полиморфизмы в сайтах связывания праймеров могут снизить эффективность ПЦР. На результаты могут влиять перекрестные реакции праймеров. Инфекции смешанных генотипов иногда не идентифицируются
Обращенно-фазная гибридизация ( <i>reverse phase hybridization</i> )	Существуют коммерческие наборы, позволяющие улучшить контроль качества и воспроизводимость. Анализы подходят для лабораторий, не имеющих опыта в генотипировании	Дорого. Результаты не всегда соответствуют рекомендациям производителя
Анализ подвижности гетеродуплекса	Используются консенсусные ПЦР-праймеры. Не требуется дальнейшего секвенирования. Простая и недорогая процедура	Возможны затруднения при интерпретации результатов. Требуются данные о геномах родственных организмов
Полиморфизм массы рестриционных фрагментов	Подходит для генотипирования большого количества образцов. Очень чувствителен к наличию минорных видов в пробе	Дорогое оборудование. Для подбора начальных условий требуются специалисты
Микрочипы	Доступно множество специфичных праймеров, гибкая конструкция, высокая воспроизводимость	Требуются знание последовательности, оборудование дорогое, обычно один образец на микрочип
Масс-секвенирование	Позволяет осуществлять полногеномное секвенирование. Очень чувствителен	Высокая стоимость оборудования и установочных работ. Недорогих биоинформатических программ, пригодных для анализа получаемых объемов данных, не существует

## Традиционные методы секвенирования

Несмотря на то что существует большое количество методов секвенирования, наиболее распространенным методом до настоящего времени остается дидезокси-секвенирование, известное также как секвенирование по Сенгеру [9]. Метод использует дидезокси-аналоги четырех природных нуклеотидов, которые терминируют синтез растущей цепи ДНК немедленно после своего включения в нее. Визуализации продуктов реакции можно добиться введением радиоактивной метки в праймер или дидезокси-нуклеотиды, а разделить продукты — гель-электрофорезом. Авторадиограмма продуктов реакции позволяет установить нуклеотидную последовательность секвенируемого фрагмента. К сожалению, этот метод весьма трудоемок и позволяет секвенировать не более 200–300 нуклеотидов за прогон. В 1990-е гг. метод был усовершенствован при помощи объединения с ПЦР и использования дидезокси-нуклеотидов, меченных различными флуоресцентными красителями. При помощи гель-электрофореза или капиллярного электрофореза меченые полинуклеотиды протягиваются через лазерный детектор, считывающий флуоресцентные метки на дидезокси-нуклеотидах и определяющий последовательность. Длина секвенируемого фрагмента может достигать 1000 нуклеотидов, чего в большинстве случаев достаточно для генотипирования вирусов.

При прямом секвенировании продуктов ПЦР не нужно проводить клонирование, однако получаемые в этом случае результаты будут представлять наиболее доминантный генотип в популяции (квазивиде). Технологии автоматизированного секвенирования и ПЦР привели к взрывообразному увеличению количества полностью и частично секвенированных геномов в открытых базах данных. По данным GenBank, начиная с 1982 г. размер этой базы удваивается каждые 18 мес. и сейчас содержит около 235 млрд нуклеотидов в более чем 201 млн геномов. Методики высокопроизводительного секвенирования дали возможность проведения широкомасштабного филогенетического и эволюционного анализа. В настоящий момент возможны амплификация и секвенирование вирусных геномов из различных географических областей, различных хозяев или собранных в разные периоды времени, а сравнивать последовательности можно с использованием одной из множества программ анализа, доступных в Интернете.

## Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, RFLP, от англ. *restriction fragment length polymorphism*) — один из основных методов генетического фингерпринтинга, который можно применять для генотипирования вирусов. Для осуществления такого анализа вирусный геном предварительно амплифицируют при помощи ПЦР, после чего обрабатывают продукт ПЦР эндонуклеазами рестрикции. В итоге получают характерную для того или иного генотипа картину гель-электрофореза фрагментов. Подбор рестриктаз

осуществляют на основании анализа геномных последовательностей. Недостаток такого метода — влияние замены нуклеотида внутри сайта рестрикции на работу рестриктазы, а следовательно, и на генотипирование вирусов с высокой изменчивостью. Тем не менее этот метод успешно применяется для генотипирования многих вирусов, включая HCV [42].

## ПЦР И СПЕЦИФИЧНЫЕ К ГЕНОТИПУ ПРАЙМЕРЫ

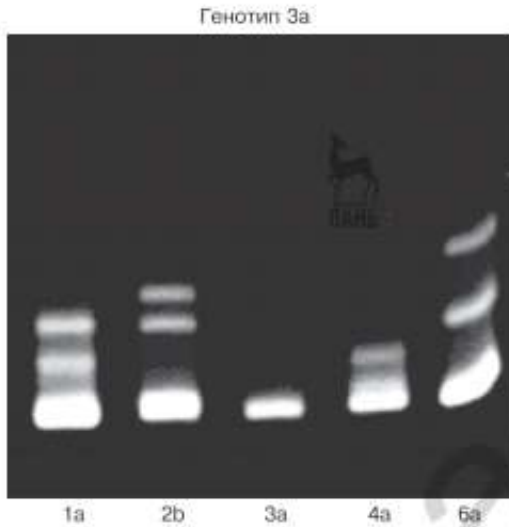
В большинстве случаев возможно разработать специфичные генотипу праймеры на основании различия нуклеотидной последовательности между генотипами или фрагментов геномов с низкой гомологией. Но при этом праймеры должны быть комплементарны достаточно консервативным областям генома. Большинство основанных на ПЦР методов используют метод мультиплексной ПЦР с праймерами, подобранными для амплификации фрагментов различной длины для разных генотипов. После электрофореза генотип можно легко определить по размеру амплифицированных фрагментов. Так, в клинической диагностике для обнаружения HCV практически всегда используется высококонсервативная 5'-нетранслируемая область HCV. Кроме того, 5'-UTR обладает полиморфизмом между типами и подтипами, что позволяет однозначно классифицировать все шесть генотипов, но не все подтипы [43]. Более точные методы генотипирования HCV, использующие типоспецифичную ПЦР, включают праймеры к области NS5b [44] или области корового белка [45].

## Обращенно-фазная гибридизация

Для генотипирования HBV и HCV традиционно используют коммерческий набор с линейным зондом (LiPA), разработанный InnoGenetics (Бельгия). В LiPA используется обращенно-фазная гибридизация, при которой денатурированные продукты ПЦР гибридизуют со специфичными по генотипу олигонуклеотидами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной пленке [46, 47]. Благодаря биотинилированным праймерам далее можно применять методы окрашивания, сходные с применяемыми в иммунологических тестах. Профиль окрашивания сравнивается с референсными образцами для определения генотипа.

## Анализ подвижности гетеродуплексов

Анализ электрофоретической подвижности гетеродуплексов (HMA, от англ. *heteroduplex mobility analysis*) был успешно применен для генотипирования ВИЧ [48], HCV [49] и других вирусов. Метод основан на возникновении ошибок спаривания при смешивании двух разных молекул ДНК (чаще всего продуктов ПЦР), их денатурации и последующем отжиге. Эта процедура приводит к образованию гомодуплексов и гетеродуплексов, обладающих разной электрофоретической подвижностью. Ошибки спаривания уменьшают подвижность пропор-



**Рис. 4.1.** Полиакриламидный гель, использованный для генотипирования методом НМА, окрашенный бромистым этидием. Внизу указан набор использованных генотипов; тестируемый образец принадлежит к генотипу 3а. Гетеродуплексы наблюдаются во всех дорожках, кроме 3а, который и является генотипом образца.

ционально количеству несовпадений в образовавшейся дцДНК. Неспаренные нуклеотиды влияют на подвижность сильнее, чем неверно спаренные [40, 42]. Генотипирование при помощи этого метода проводят путем смешивания амплификата генома вируса с неизвестным генотипом с панелью амплификатов известных генотипов с последующим разделением продуктов отжига при помощи гель-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 4.1). Желательно использовать для анализа референсные образцы, максимально близкие к консенсусной последовательности своего генотипа. Определение генотипа производят исключением гетерологичных генотипов на дорожках, содержащих гетеродуплексы со сниженной подвижностью [40, 43].

## НОВЫЕ МЕТОДЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

### Масс-спектрометрия

Раньше биологи использовали масс-спектрометрию практически только для исследования белков, но недавно метод был адаптирован для генотипирования вирусов. Полученная методика позволяет не только анализировать генотипы, но и выявлять присутствующие в популяции варианты последовательности в пределах квазивида и мутации, влияющие на устойчивость вируса к терапии (см. ниже).

Kim и соавт. использовали масс-спектрометрический метод для идентификации генотипов HCV [50]. Ими была разработана чувствительная методика, названная полиморфизмом массы рестрикционных

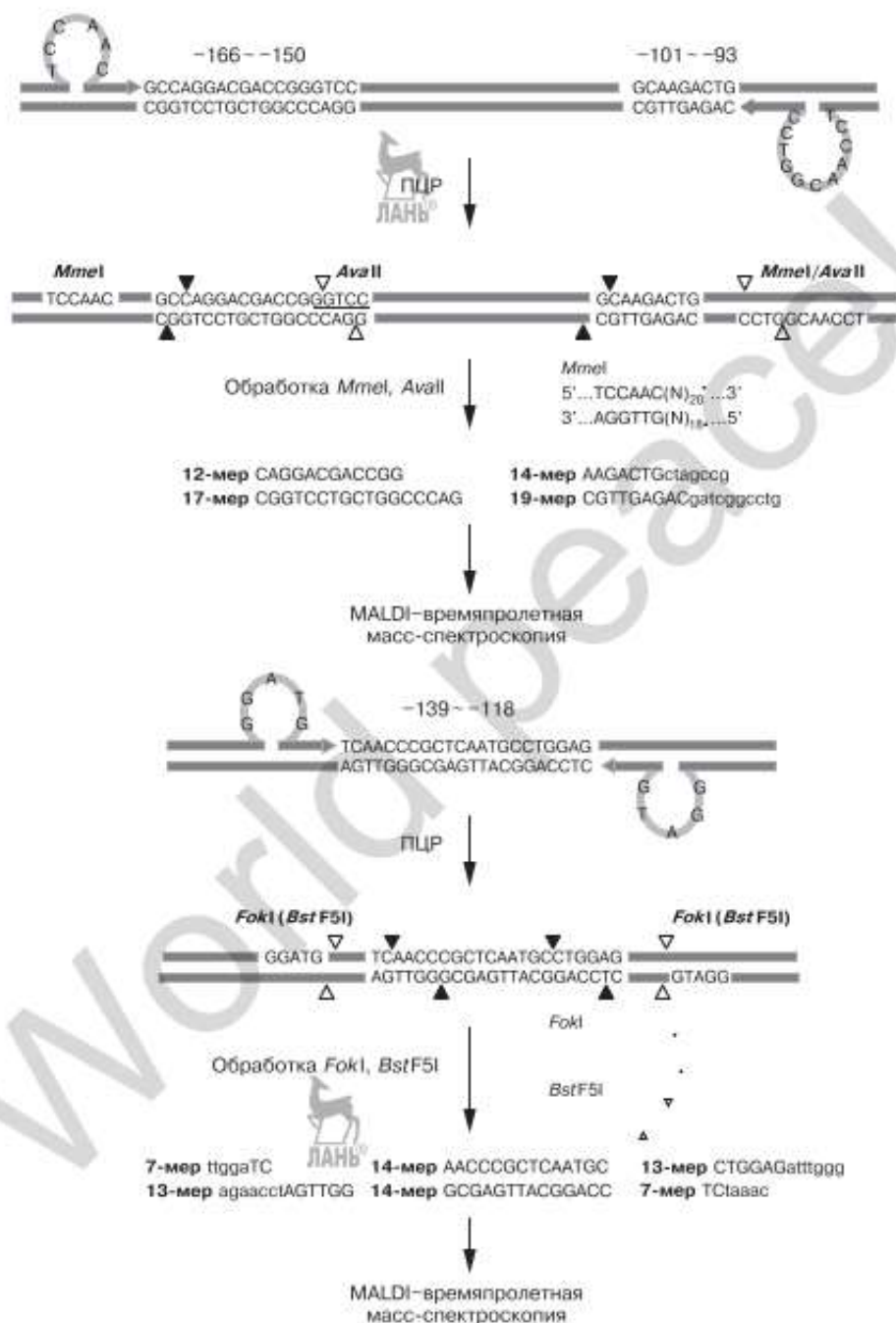
фрагментов, которая основана на ПЦР-амплификации 5'-нетранслируемой области HCV с использованием праймеров, вносящих в продукт сайты узнавания рестриктаз типа PIS. Важно, что рестриктазы этого типа делают разрез за пределами сайта узнавания, и это приводит к получению большого набора коротких ампликонов определенной длины, а метод оказывается нечувствительным к наличию сайтов узнавания эндонуклеаз внутри анализируемых последовательностей (рис. 4.2). Для анализа брали три переменные области в составе 5'-UTR, которые затем обрабатывали рестриктазами типа PIS, получая фрагменты заданной длины в 7–19 нуклеотидов (в зависимости от анализируемой области). Для выявления вариантов в пуле амплифицированных последовательностей применяли времяпролетную масс-спектропию, испарение образца в которой проводили по методу твердофазной лазерной десорбции (MALDI). Используя такой подход, Kim и соавт. [50] идентифицировали 6 основных генотипов и 27 подтипов. Хотя изначальные результаты не совпали с известными последовательностями примерно в 12% случаев (38 из 318 образцов), последующий анализ позволил верно классифицировать еще 21 образец. Дальнейшего повышения точности можно достичь, исследуя другие области генома. Важно отметить, что метод способен распознавать минорные генотипы, присутствовавшие в количестве всего около 0,5% пула квазивида [50], что намного превышает чувствительность стандартных методов генотипирования. Такие показатели чувствительности позволяют ожидать, что метод полиморфизма массы рестрикционных фрагментов займет достойное место среди инструментов генотипирования.

### Микрочипы

Еще один полезный инструмент генотипирования вирусов — олигонуклеотидные микрочипы. Чаще всего используют меченые продукты ПЦР-амплификации вирусных геномов. Их отжигают на микрочип, после чего считывают с него данные. Существует множество способов введения метки в последовательность вирусного генома; так, Jaaskelainen и соавт. транскрибировали РНК с продуктов ПЦР, гибридизовали ее на микрочипе, после чего использовали обратную транскрипцию для добавления флуоресцентных нуклеотидов к гибридизовавшейся РНК [51], а Sengupta и соавт. использовали для этих целей цианиновые метки. Микрочипы дают возможность использовать большое число зондов без увеличения трудоемкости и затрат. Особенно они удобны для выявления и генотипирования вирусов на основе различий между ними. Микрочипы уже были использованы для обнаружения и генотипирования ротавируса [53], астровируса и NoV [51], HBV [53], вируса гриппа [52] и многих других.

### Массовое высокопроизводительное секвенирование

Новейшие методы высокопроизводительного секвенирования предоставляют большие возможности по генотипированию вирусов. Они



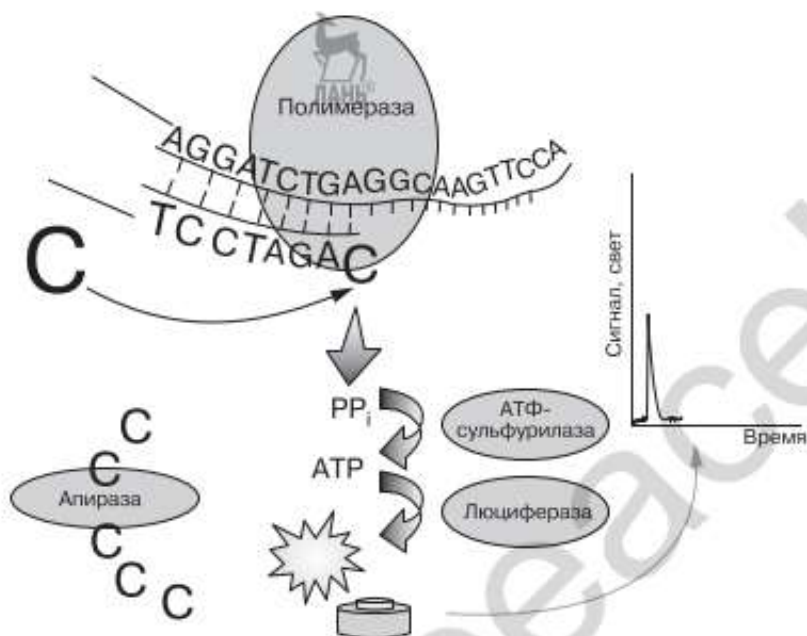
**Рис. 4.2.** Метод, который применили Kim и соавт. [50] для получения продуктов ПЦР с последующим их анализом масс-спектрометрией



дают разрешение, еще несколько лет назад считавшееся недостижимым. Крупномасштабное полногеномное секвенирование позволяет распознавать связанные с давлением отбора изменения в геноме так детально, как ни один другой метод. На сегодняшний день наиболее распространены две платформы высокопроизводительного секвенирования — GS20™ (Roche 454 Life Sciences) и Illumina Genome Analyzer System. Обе системы используют методику «секвенирования синтезом», позволяющую секвенировать непосредственно из одной единственной молекулы ДНК, избегая этапа клонирования целевой последовательности в бактериях. Также обе эти системы позволяют выявлять редкие изменения в последовательностях, хотя для секвенирования они используют разные подходы. Система GS20 основана на методе пиросеквенирования, тогда как система Illumina использует дидезокси-метод Сенгера. Обе представленные платформы позволяют производить тщательный анализ квазивидов вирусов с разрешением, недостижимым при использовании других методик, что может быть важно для лечения хронических вирусных заболеваний, а также эволюционных и эпидемиологических исследований вирусных инфекций.

### *Пиросеквенирование*

Пиросеквенирование представляет собой метод секвенирования синтезом в реальном времени [54]. Он основан на непрямой билюцинометрии, определяющей появление в растворе пирофосфата (PP<sub>i</sub>) при включении каждого нуклеотида (dNTP) в растущую цепь ДНК [54, 55]. К комплексу матричной цепи ДНК с праймером последовательно добавляют четыре dNTP в присутствии фрагмента Клёнова (полимеразы, не имеющей экзонуклеазной активности) (рис. 4.3). Вместо dATP используется dATP $\alpha$ S, позволяющий избежать генерации фонового сигнала. Если нуклеотид подходит для элонгации, он включается в растущую цепь, что приводит к высвобождению неорганического пирофосфата, который вместе с аденозин-5'-фосфосульфатом является субстратом АТФ-сульфуриказы, в результате чего синтезируется АТФ. Затем при помощи новосинтезированного АТФ люцифераза окисляет люциферин до гидроксиллюциферина с генерацией квантов света, которые фиксируют люцинометром или иным подобным прибором. Интенсивность вспышки при этом пропорциональна количеству включившихся в цепь нуклеотидов. Перед добавлением следующего нуклеотида избыток оставшегося разлагается апиразой, присутствующей в реакционной смеси. Дальнейшее совершенствование метода привело к повышению его надежности и длины считываемого участка, например с помощью использования белка SSB, связывающего одноцепочечную ДНК и препятствующего образованию в ней вторичных структур [56], или очищенной Sp-изомерной формы dATP $\alpha$ S, что позволяет увеличить длину прочитываемого участка [57].



**Рис. 4.3** (см. цветную вклейку). Пиросеквенирование, в ходе которого высвобождается один остаток пирофосфата (PP<sub>i</sub>) на каждый включившийся нуклеотид. Это приводит к синтезу АТФ, используемого люциферазой для генерации светового сигнала

До недавнего времени пиросеквенирование применяли в основном для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в геноме человека [58, 59]. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов с помощью пиросеквенирования использовалось также и для генотипирования вирусов. Хотя принципиально методика пиросеквенирования для выявления SNP не отличается от таковой для высокопроизводительного секвенирования, но в ней участвуют специальные праймеры для предварительной амплификации анализируемого фрагмента. Технология анализа SNP при помощи пиросеквенирования была использована шведской фирмой Biotage AB для создания коммерческого набора, позволяющего анализировать до 96 образцов в твердой фазе. Чаще всего для выявления однонуклеотидных полиморфизмов используется пиросеквенирование не более чем 10 нуклеотидов, что дает возможность обрабатывать 96 образцов менее чем за 10 мин. Эта система также может выявить мутации по различным положениям, регистрировать множественные полиморфизмы, анализировать инсерции и делеции, подсчитывать частоты аллелей, а также секвенировать короткие фрагменты ДНК длиной 20–40 нуклеотидов.

## Высокопроизводительное пиросеквенирование

Высокопроизводительное секвенирование на платформе Roche GS20 основано на эмульсионном пиросеквенировании. Геномную ДНК режут на фрагменты примерно по 2,5 т. п. н., метилируют и тупят концы, после чего к обоим концам пришивают адапторные олигонуклеотиды. После этого фрагменты обрабатывают рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI* и лигируют для образования кольцевых молекул. Поскольку адаптор содержит два сайта узнавания *MmeI*, обработка этой эндонуклеазой вызывает линейризацию кольцевых молекул с адаптором посередине и примерно 20 нуклеотидами геномной ДНК на концах. Эти фрагменты ДНК называют фрагментами с парными концами, и после их биотинилирования их можно выделить из геномной ДНК при помощи покрытых стрептавидином бусинок.

Клональная амплификация достигается присоединением одного фрагмента на бусинку, которую затем помещают в микрореактор, образованный каплей воды в масляной эмульсии. Этот микрореактор содержит все необходимые для амплификации ДНК компоненты. Один фрагмент амплифицируется в миллионы раз, причем все копии оказываются связанными с бусинкой. Этот процесс носит название эмульсионной ПЦР. Бусинки с клонально амплифицированными молекулами ДНК извлекают из масла, отбирают из них только несущие ДНК и помещают в микропланшет PicoTiterPlate для секвенирования. В каждую ячейку планшета помещается одна бусинка, секвенирование клона осуществляется при этом с каждой содержащей ДНК бусинки (одна бусинка — один клон). За один прогон можно секвенировать до 16 образцов благодаря использованию праймеров с разными последовательностями («штрих-кодами») для каждого образца. Эта система дает возможность секвенировать как продукты ПЦР (ампликоны), так и вирусную ДНК. Целевые молекулы присоединяются в количестве двух копий (парные концы) на бусинку. Количество образцов, исследуемых за прогон, определяется необходимой точностью и глубиной покрытия. Достижения в области этой технологии позволяют прочитывать до 500 п. н. на пробу и анализировать до 1 млн чтений за один запуск прибора. (В последние годы технология Roche развивалась гораздо медленнее, чем технология Illumina (см. ниже). В результате в конце 2013 г. платформа Roche была признана неконкурентоспособной и ее поддержка производителем прекращена. — *Прим. ред.*).

### *Illumina Genome Analyser*

Альтернативный метод секвенирования синтезом лег в основу платформы Illumina (Solexa) Genome Analyzer System, использующей проточные ячейки. Целевая молекула тоже лигируется на адаптор (один или два в зависимости от выбора однонаправленного или двунаправленного секвенирования), после чего пришивается к поверхности проточной ячейки. Каждая молекула занимает отдельное положение

в ячейке. Затем для получения копий каждой отдельной молекулы используется ПЦР *in situ*. Реакция секвенирования синтезом может быть осуществлена непосредственно на поверхности ячейки при использовании флуоресцентно меченных нуклеотидов (обратимых терминаторов) и регистрации сигнала с занятой каждой матрицей позиции ячейки. За один прогон возможно проанализировать до восьми образцов и секвенировать свыше 1 млрд нуклеотидов. Теоретически система также способна непосредственно секвенировать целевую кДНК. На сегодняшний момент система считывает до 500 оснований и может одновременно секвенировать до 2 млрд молекул, прочитывая таким образом до триллиона нуклеотидов за прогон.

Существует предположение, что массовое высокопроизводительное секвенирование со временем заменит анализ при помощи микрочипов в его нынешнем виде. Появление описанных выше систем, а также других методов, таких как платформы ABI SOLID и Ion Torrent, означает, что исследователи более не ограничены при определении мРНК и ДНК набором стандартных последовательностей. Теперь появилась возможность предпринимать масштабные исследования без предварительной информации о последовательностях геномов исследуемых организмов.

### Приложения генотипирования

Генотипы одних вирусов могут не различаться фенотипически, но генотипы других различаются по патогенезу, инфекционности, особенностям передачи и ответу на противовирусную терапию.

### Патогенез вирусных заболеваний



Генотипические различия могут играть заметную роль в вирусном патогенезе. Тяжесть вызванных HBV нарушений функции печени как минимум частично зависит от генотипа вируса. Как правило, в более тяжелой форме протекает заболевание, вызванное генотипом С по сравнению с В в азиатских странах [61–68] и генотипом D по сравнению с генотипом А в странах Запада [69, 70]. Точно определить влияние генотипа сложно из-за наличия подтипов, притом некоторые из них способны к межгенотипической рекомбинации. Подтип А генотипа В (Va) представляет собой рекомбиант генотипа С, хуже отвечающий на лечение ламивудином и вызывающий более остро протекающее заболевание, чем нерекомбиантный генотип В (Vj) [71, 72]. В составе генотипа А также было выявлено три подтипа, среди которых А1 (Aa) оказался наиболее распространен в Южной Азии и Северной Африке, А2 (Ae) — в США и Европе, а А3 — в Западной Африке [73–75]. Африканский подтип А1 вызывает более стремительное развитие заболевания и сопровождается повышенным риском возникновения гепатоцеллюлярной карциномы [76]. Причины неодинаковой патогенности различных вариантов вирусов остаются невыясненными, хотя есть сведения, что с тяжестью заболевания связаны мутации в промотор-

ной области и в кодирующей последовательности гена, кодирующего прекодовый белок HBV, превращающийся впоследствии в секретлируемый антиген HBeAg. Так, африканский генотип A1 несет мутацию в области, кодирующей N-концевую сигнальную последовательность прекодового белка, опосредующую удержание HBeAg внутри клетки [77]. Остается неясным, связано ли это свойство вирусного белка с более быстрым развитием гепатоцеллюлярной карциномы.

Генотипы HCV, по всей видимости, не оказывают заметного влияния на переход заболевания в хроническую фазу и тяжесть его протекания. Тем не менее инфекция HCV связана с целым рядом клинических проявлений, среди которых нарушения метаболизма. При хронической инфекции вирусом гепатита С часто наблюдается стеатоз — накопление жира внутри гепатоцитов. Особенности течения заболевания у пациентов, инфицированных вирусом генотипа 3, позволяют предположить, что развитие стеатоза при гепатите зависит от генотипа вируса [78]. Это может означать, что один из белков, экспрессируемых вирусом генотипа 3, опосредует развитие стеатоза, тогда как тот же самый белок, экспрессируемый вирусами других генотипов, нет.

## Ответ на лечение

Наиболее явно прослеживается связь генотипа HCV с ответом на терапию интерферонами [79, 80]. После недавнего усовершенствования противовирусного лечения до 50% пациентов, инфицированных HCV генотипа 1, и до 80% пациентов с инфекцией HCV генотипов 2 и 3 показывают устойчивый ответ на лечение в течение шести месяцев после его окончания [81]. Рекомендованная для пациентов с инфекцией вирусами генотипов 1 и 4 продолжительность лечения составляет обычно 48 недель, а для инфицированных вирусами генотипов 2 и 3 — 24 недели.

Стоит также отметить различия в ответе на интерферон разных генотипов HBV. Генотип А более чувствителен и начинает отвечать на интерферон раньше, чем любой другой генотип, однако причины этого неизвестны [82, 83]. Различия в ответе на интерферон также выявлены и для других генотипов HBV: генотип В отвечает на интерферон лучше, чем генотип С [84].

## Анализ квазивидов вирусов

Чувствительные методы секвенирования чрезвычайно полезны при анализе вирусных квазивидов. Этот подход позволяет выявить минорные популяции инфекционного агента, которые другими методами не выявляются. Таким образом, инфекция, вызванная двумя штаммами вируса одного и того же вида, будет обнаружена с большей вероятностью, что позволит изучить свойственные такой двойной инфекции особенности. Для определения распространенности мутантных геномов внутри вирусных популяций были использованы такие

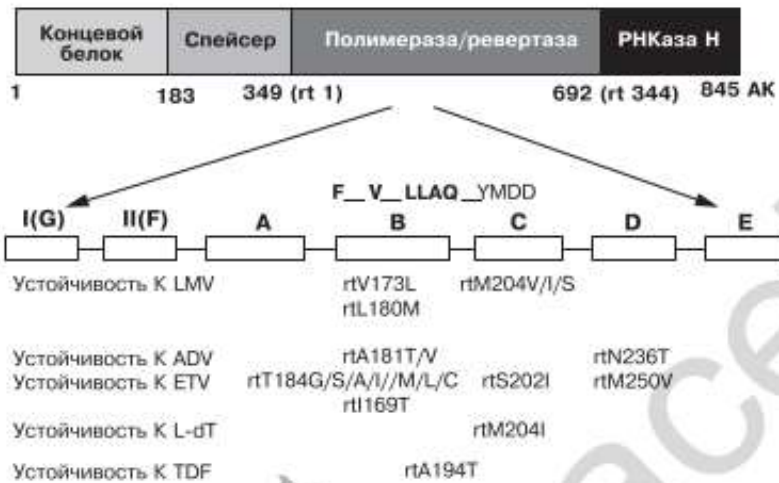
методы, как ПЦР в реальном времени [85], высокопроизводительное пиросеквенирование [86] и пиросеквенирование, выявляющее однонуклеотидные полиморфизмы [87]. Эти методы позволили избежать ранее необходимого для такого анализа этапа клонирования большого количества вирусных геномов в бактериальные плазмиды. Несмотря на большую трудоемкость клонирования, полученные с его помощью данные все еще актуальны, что было продемонстрировано недавним исследованием, в котором ПЦР и клонирование были использованы для выявления большого разнообразия квазивидов непосредственно перед сероконверсией у инфицированных HBV [88]. Тем не менее крупномасштабные исследования с использованием клонирования неизбежно уйдут в прошлое по мере разработки новых, более быстрых и точных методов высокопроизводительного секвенирования.

### Выявление устойчивости к терапии

Одна из важных областей, в которых на сегодняшний день нашли применение высокопроизводительное секвенирование и анализ последовательностей, — выявление устойчивости ВИЧ к терапии. Для лечения ВИЧ-инфекции применяют широкий спектр противовирусных препаратов, и при планировании лечения существенную роль играют пробы на устойчивость к ним [89]. Но у ВИЧ изменения, обеспечивающие развитие устойчивости к противовирусным препаратам, настолько сложны, что к ним оказываются неприменимы многие методы определения маркеров устойчивости вирусов. Сейчас маркеры устойчивости ВИЧ чаще всего выявляют прямым секвенированием продуктов ПЦР; в лабораториях, владеющих этим методом, он обеспечивает высокую точность результатов. При определении маркеров устойчивости ВИЧ возникает множество трудностей. Помимо сложности самого секвенирования, интерпретация сложных изменений в геноме может неизбежно носить субъективный характер. Для облегчения интерпретации результатов создано несколько баз данных, таких как база данных Стэнфорда [90] и алгоритм CREST [91].

Поскольку вариабельность результатов возможна как внутри, так и между лабораториями, несколько стран ввели схемы внешнего контроля качества для улучшения точности и надежности получаемых результатов [92]. Коммерческие наборы для анализа, основанные на ПЦР и секвенировании, такие как система генотипирования Viroseq HIV-1 (Celera Diagnostics) и набор для генотипирования TruGene HIV-1 (Bayer HealthCare), состоят из реагентов и программного обеспечения, позволяющих распознать связанные с устойчивостью изменения в доменах протеазы и ревертазы генома ВИЧ. Система Viroseq продемонстрировала высокую чувствительность и специфичность даже в случае использования образцов с низкой вирусной нагрузкой [93].

Вирусы HCV, HBV и ВИЧ существуют в форме квазивидов. Отсутствие корректирующей активности у РНК-полимеразы HCV и ревертаз HBV и HCV способствует внесению множества ошибок в геном



**Рис. 4.4** (см. цветную вклейку). Основные мутации полимеразы HBV (домены с A по G), ассоциированные с устойчивостью к противовирусным препаратам при хронической инфекции HBV. LMV — ламивудин, ADV — адефовир, ETV — энтекавир, L-dT — телбивудин, TDF — тенофовир. Мотив YMDD, ассоциированный с устойчивостью к ламивудину и телбивудину, включает остатки с 203 по 206

на каждом цикле репликации. В результате в начале лечения быстро появляются и размножаются геномы, устойчивые к применяемому препарату. И хотя большинство мутантов менее жизнеспособны, чем вирус дикого типа, большая их часть способна с некоторой эффективностью реплицироваться, а под давлением отбора они становятся доминантными. Исходно существующие мутации в геноме полимеразы HBV дают устойчивость к аналогам нуклеотидов, например к ламивудину [94–101], адефовиру [102, 103] и энтекавиру [97–99] (рис. 4.4). Определение распространенности таких геномов до начала лечения позволит эффективнее подбирать лекарства и улучшить прогноз. Разработано несколько методов выявления мутаций в геноме HBV, связанных с устойчивостью к лекарствам. В их числе ПЦР в реальном времени [85], LiPA [100, 101], секвенирование ампликонов [102, 103], масс-спектрометрия [100, 104–106], анализ однонуклеотидных полиморфизмов пиросеквенированием [87] и высокопроизводительное пиросеквенирование [86].

Вероятно, в ближайшем будущем возрастет значение методов, пригодных для автоматизации с использованием микротитровочных планшетов. В этом отношении особенно выделяются масс-спектрометрия, ПЦР в реальном времени и пиросеквенирование. Kim и соавт. [104] использовали анализ полиморфизма массы рестрикционных фрагментов, проводимый на 384-луночном планшете, для генотипирования вариантов генома HCV из сыворотки пациента. Этот метод был также применен для выявления относительной распространенности устойчивых к ламивудину [100, 104, 105] и адефовиру [105] мутантов HBV.

Он позволял обнаруживать мутанты, устойчивые к ламивудину, даже в количестве 1% на популяцию, тогда как метод LiPA — только 4% [104]. Hong и соавт. [106] показали, что в условиях моноинфекции HBV масс-спектрометрия позволяет выявить уже 100 копий генома HBV на 1 мл пробы.

Высокопроизводительное пиросеквенирование не так давно начали использовать для определения мутаций, связанных с устойчивостью к лекарственным препаратам, у ВИЧ [86] и HBV. Shafer и соавт. использовали платформу высокопроизводительного секвенирования, производимую Roche, для определения с повышенной по сравнению с методом секвенирования ампликонов чувствительностью мутантов, связанных с лекарственной устойчивостью (из личной переписки с R. Schafer, сентябрь 2008 г.)<sup>1</sup>. В пробах пациентов, получивших лечение нуклеозидами, чувствительность выявления мутаций составляла 2% или выше, что было подтверждено клонированием. Хотя существует ряд сложностей при отделении истинных мутантов от шума, такого как ошибки при ПЦР или гипермутация G в A [107], потенциал высокопроизводительного секвенирования и других чувствительных методов анализа для выявления мутантов, устойчивых к лечению нуклеозидами, должен быть реализован.

Для анализа мутаций, ответственных за устойчивость к лекарственным препаратам, используется также метод анализа одонуклеотидных полиморфизмов при помощи пиросеквенирования. Показано [87], что пиросеквенирование точнее и быстрее, чем прямое секвенирование продуктов ПЦР-амплификации, и лучше масштабируется. Также пиросеквенирование делает возможным более точный, чем традиционное секвенирование, количественный анализ присутствия в пробе вирусов дикого и мутантного генотипов. Yang и соавт. [85] провели сравнение методов секвенирования ампликонов, пиросеквенирования и ПЦР в реальном времени для обнаружения мутантов YMDD (тирозин-метионин-аспартат-аспартат), ассоциированных с устойчивостью к ламивудину, в анализах пациентов с хронической инфекцией HBV. Они пришли к выводу, что ПЦР в реальном времени обладает в этом случае наибольшей точностью при наименьшей стоимости. Высокопроизводительное пиросеквенирование в этой работе не анализировалось, а потому вопрос о том, будет ли ПЦР в реальном времени чувствительнее него при прямом сравнении результатов, остается открытым.

Лечение хронической инфекции HCV с использованием интерферона направлено на усиление иммунного ответа на вирус, и для такого лечения случаев возникновения у вируса устойчивости не выявлено. Но нежелательные побочные эффекты применения интерферона

<sup>1</sup> Margeridon-Thermet S, Shulman N, Ahmed A, Shahriar R, Liu T, Wang C, Holmes S, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Hanczaruk B, Simen B, Egholm M, and Shafer R. 2009. Ultra-Deep Pyrosequencing of Hepatitis B Virus Quasispecies from Nucleoside and Nucleotide Reverse-Transcriptase Inhibitor (NRTI) — Treated Patients and NRTI-Naive Patients. *Journal of Infectious Diseases*, 199:1275–85.



и слабый ответ вируса генотипа 1 на это лечение обусловили необходимость разработки специфической терапии инфекции HCV, основанной на ингибировании сериновой протеазы и РНК-полимеразы вируса. Предварительные клинические испытания этой системы показали обнадеживающие результаты — заметно снизилась вирусная нагрузка; однако при использовании этой системы как единственного метода лечения быстро появляются устойчивые варианты вируса [108]. Для HCV выявление маркеров устойчивости обычно производят при помощи типоспецифичных праймеров и последующего секвенирования. Появление высокопроизводительных методов с высокой чувствительностью означает, что в скором времени некоторые из них будут применяться для отслеживания развития устойчивости у вирусов.

### Описание новых вирусов

Традиционные методы описания новых вирусов чаще всего требуют больших затрат времени и включают этапы изначального обнаружения при помощи электронной микроскопии, выделения из культуры, очистки вирусной нуклеиновой кислоты, клонирования и, наконец, секвенирования. Тем не менее несмотря на успехи, достигнутые при помощи этих методов, некоторые вирусы избежали обнаружения при помощи как электронно-микроскопических, так и вирусологических методов, не были очищены и охарактеризованы. Новые стратегии, основанные на использовании систем высокопроизводительного секвенирования, позволяют получать и анализировать полногеномные последовательности неизвестных вирусов, минуя этап выделения из культуры и клонирования. Внедрение таких методов позволяет надеяться на быстрый рост количества обнаруженных и охарактеризованных вирусов.

Возможности методов, использующих секвенирование синтезом, были продемонстрированы для автоматизированного пиросеквенирования при идентификации смертельно опасного аренавируса в пробах трех реципиентов трансплантатов [109]. Все три пациента получили трансплантаты от человека, скончавшегося от лихорадки неизвестной этиологии, и умерли в течение шести недель после трансплантации. Культуральный и серологический анализы, ПЦР широкого спектра и анализ с помощью микрочипов не дали информации о возбудителе, тогда как анализ более 103 000 последовательностей, полученных при помощи высокопроизводительного пиросеквенирования, позволил выявить 14 последовательностей, имеющих на аминокислотном уровне сходство с аренавирусами Старого Света. ПЦР с праймерами на основе этих последовательностей привела к амплификации всего вирусного генома. Этот случай наглядно продемонстрировал возможности высокопроизводительных методов секвенирования для выявления неизвестных прежде вирусных патогенов. Ни одна из существующих на сегодняшний день коммерческих платформ высокопроизводительного секвенирования не требует предварительных знаний о по-

следовательностях секвенируемых геномов. Но несмотря на все свои преимущества, эти платформы все же имеют известные ограничения применимости. Упомянутый выше аренавирус был идентифицирован только лишь по той причине, что имел сходство с уже известными. Если бы данные секвенирования геномов аренавирусов не содержались в GenBank, 14 последовательностей, выделенных Palacios с соавт. [109] остались бы, скорее всего, незамеченными. Важно, что сами по себе нуклеотидные последовательности не имели сходства с содержащимися в GenBank. Выявить сходство с аренавирусами Старого Света стало возможно только после трансляции последовательностей при помощи инструмента BlastX, доступного на сайте NCBI [110]. Тем не менее не существует никаких способов идентификации этим методом генома вируса, неродственного известным, если данные секвенирования — это все, что мы о нем знаем.

### Молекулярная эпидемиология

Молекулярно-эпидемиологические приемы показали себя ценным новым подходом к изучению передачи вирусов и часто используются как дополнение к традиционным эпидемиологическим исследованиям. Так, для находящихся в крови вирусов ВИЧ и HCV молекулярные методики оказались полезны при изучении эволюции вирусов [9, 111, 112], описании эпидемий [113–115], изучении распространения по миру [116, 117] и расследовании вспышек [118, 119], а также отслеживании путей передачи [120–123]. Позднее, в эпоху противовирусной терапии, молекулярно-эпидемиологические приемы стали использовать для отслеживания распространения устойчивых к лекарственным препаратам ВИЧ [124, 125] и HBV [126].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы являемся свидетелями начала новой эры в генотипировании вирусов и описании их геномов, и это, несомненно, оказывает большое влияние на все современные вирусологические исследования. Такие методы, как масс-спектрометрия и высокопроизводительное секвенирование, произвели революцию в секвенировании ДНК и РНК и стали инструментом обнаружения вирусов, которые не удавалось выделить традиционными способами. Основная задача на сегодняшний день — выработать простые и эффективные инструменты работы с огромными массивами данных, получаемых при помощи этих многообещающих методик.



### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Soo Ok Kim (Genematrix), предоставившего рис. 4.2, Phillip Hudson (Millenium Science Pty Ltd) и Nigel Tooke (Biotope), предоставивших рис. 4.3 и фрагмент текста по пиросеквенированию, и Tim Harkins и Roche Applied Sciences за сведения по высо-

копроизводительному пиросеквенированию. Мы благодарим Stephen Locarini, Lilly Yuen и Anna Ayers, предоставивших рис. 4.4, и Robert Shafer и Nancy Shulman за доступ к их результатам до их публикации. Мы также признательны Doris Chibo и Yi-Mo Deng за информацию по ВИЧ и вирусу гриппа соответственно.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Holland J, Spindler K, Horodyski F, et al. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982; 215:1577.
2. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(9):4171–4175.
3. Domingo E. Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(2–3):97–101.
4. Manrubia SC, Escarmis C, Domingo E, et al. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* 2005; 347(2):273–282.
5. Cheung TK, Poon LL. Biology of influenza A virus. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1102:1–25.
6. Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 2005; 437(7062):1162–1166.
7. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, et al. Influenza: Emergence and control. *J Virol* 2004; 78(17):8951–8959.
8. Kimura M. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genet Res* 1968; 11(3):247–269.
9. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus — 15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 11):3173–3188.
10. Zagury JF, Franchini G, Reitz M, et al. Genetic variability between isolates of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 is comparable to the variability among HIV type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:5941–5945.
11. Spira S, Wainberg MA, Loemba H, et al. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:229–240.
12. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; 299:225–239.
13. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47(6):289–309.
14. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83 (Pt 8):2059–2073.
15. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States: Results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003; 125(2):444–451.
16. Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 12):3141–3145.
17. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10):2575–2583.

18. Kramvis A, Weitzmann L, Owiredo WK, et al. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83 (Pt 4):835–839.
19. Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 5):1211–1220.
20. Mbayed VA, Barbini L, Lopez JL, et al. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol* 2001; 146(9):1803–1810.
21. Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, et al. Two subtypes of genotype B (Ba and Bj) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9):1222–1228.
22. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, et al. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80(1):27–46.
23. Yuen LK, Ayres A, Littlejohn M, et al. SeqHepB: A sequence analysis program and relational database system for chronic hepatitis B. *Antiviral Res* 2007; 75(1):64–74.
24. Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 1999; 80:2535–2543.
25. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007; 88 (Pt 12):3347–3359.
26. Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76(12):5985–5992.
27. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008; 82(11):5657–5663.
28. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, et al. When should «I» consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 2008; 82(16):8241–8242.
29. Carr JK, Salminen MO, Koch C, et al. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* 1996; 70(9):5935–5943.
30. Gao F, Robertson DL, Morrison SG, et al. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996; 70(10):7013–7029.
31. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, et al. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008; 358(15):1590–1602.
32. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, et al. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002; 76(8):4034–4043.
33. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007; 7:214–221.
34. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(24):4876–4882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396791>.
35. Page RD. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996; 12(4):357–358. [https://www.researchgate.net/publication/14305392\\_TREEVIEW\\_An\\_application\\_to\\_display\\_phylogenetic\\_trees\\_on\\_personal\\_computers](https://www.researchgate.net/publication/14305392_TREEVIEW_An_application_to_display_phylogenetic_trees_on_personal_computers).
36. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1989; 39:783–791.

37. Hall BG. *Phylogenetic Trees Made Easy — A How-To Manual for Molecular Biologists*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2001.
38. Salemi M, A-M Vandamme. *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press, 2003.
39. Pond SL, Frost SD, Muse SV. HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 2005; 21(5):676–679.
40. Suzuki Y. Negative selection on neutralization epitopes of poliovirus surface proteins: Implications for prediction of candidate epitopes for immunization. *Gene* 2004; 328:127–133.
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. Accessed August 2008.
42. Pohjanpelto P, Lappalainen M, Widell A, et al. Hepatitis C genotypes in Finland determined by RFLP. *Clin Diagn Virol* 1996; 7(1):7–16.
43. Smith DB, Davidson F, Simmonds P. Hepatitis C virus variants and the role of genotyping. *J Hepatol* 1995; 23 (Suppl 2):26–31.
44. Chayama K, Tsubota A, Arase Y, et al. Genotypic subtyping of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8(2):150–156.
45. Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, et al. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10):2372–2378.
46. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 6):1093–1102.
47. Teles SA, Martins RM, Vanderborght B, et al. Hepatitis B virus: Genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 1999; 23(12):1074–1078.
48. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *Genome Res* 1995; 4(5):S202 — S216.
49. White PA, Li Z, Zhai X, et al. Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* 2000; 271(2):382–389.
50. Kim YJ, Kim SO, Chung HJ, et al. Population genotyping of hepatitis C virus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of short DNA fragments. *Clin Chem* 2005; 51(7):1123–1131.
51. Jaaskelainen AJ, Maunula L. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *J Virol Methods* 2006; 136(1–2):210–216.
52. Sengupta S, Onodera K, Lai A, et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10):4542–4550.
53. Pas SD, Tran N, de Man RA, et al. Comparison of reverse hybridization, microarray, and sequence analysis for genotyping hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4):1268–1273.
54. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998; 281(5375):363, 365.
55. Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* 2000; 10(8):1249–1258.
56. Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem* 2000; 286(2):282–288.

57. Gharizadeh B, Nordstrom T, Ahmadian A, et al. Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer. *Anal Biochem* 2002; 301(1):82-90.
58. Neve B, Froguel P, Corset L, et al. Rapid SNP allele frequency determination in genomic DNA pools by pyrosequencing. *Biotechniques* 2002; 32(5):1138-1142.
59. Gruber JD, Colligan PB, Wolford JK. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum Genet* 2002; 110(5):395-401.
60. <http://www.biotagebio.com>. Accessed July 2008.
61. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118(3):554-559.
62. Lee CM, Chen CH, Lu SN, et al. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(1):95-101.
63. Ding X, Mizokami M, Ge X, et al. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002; 22(1):37-44.
64. Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, et al. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Gastroenterol* 2002; 37(1):35-39.
65. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, et al. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000; 7(4):258-267.
66. Orito E, Ichida T, Sakugawa H, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001; 34(3):590-594.
67. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, et al. Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol* 2002; 67(4):484-489.
68. Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(6):671-676.
69. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomised trial. *Lancet* 2005; 365(9454):123-129.
70. Thakur V, Gupta RC, Kazim SN, et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(2):165-170.
71. Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(2):139-142.
72. Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003; 124(4):925-932.
73. Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, et al. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 7):1719-1729.
74. Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, et al. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 4):811-820.

75. Hannoun C, Soderstrom A, Norkrans G, et al. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol* 2005; 86 (Pt 8):2163–2167.
76. Kew MC, Kramvis A, Yu MC, et al. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J Med Virol* 2005; 75(4):513–521.
77. Chen CY, Crowther C, Kew MC, et al. A valine to phenylalanine mutation in the precore region of hepatitis B virus causes intracellular retention and impaired secretion of HBe-antigen. *Hepatol Res* 2008; 38(6):580–592.
78. Koike K, Moriya K. Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: Steatohepatitis resembling but distinct from NASH. *J Gastroenterol* 2005; 40(4):329–336.
79. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339(21):1485–1492.
80. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352(9138):1426–1432.
81. Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1):S121 – S127.
82. Erhardt A, Blondin D, Hauck K, et al. Response to interferon alfa in hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54(7):1009–1013.
83. Hou J, Schilling R, Janssen HL, et al. Genetic characteristics of hepatitis B virus genotypes as a factor for interferon-induced HBeAg clearance. *J Med Virol* 2007; 79(8):1055–1063.
84. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, et al. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36(6):1425–1430.
85. Yang ZJ, Tu MZ, Liu J, et al. Comparison of amplicon-sequencing, pyrosequencing and real-time PCR for detection of YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12(44):7192–7196.
86. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, et al. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 2007; 17(8):1195–1201.
87. Lindstrom A, Odeberg J, Albert J. Pyrosequencing for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4788–4795.
88. Lim SG, Cheng Y, Guindon S, et al. Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion. *Gastroenterology* 2007; 133(3):951–958.
89. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):247–277.
90. <http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>. Accessed August 2008.
91. Birch C, Middleton T, Hales G, et al. Limited evolution of HIV antiretroviral drug resistance-associated mutations during the performance of drug resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32(1):57–61.

92. Sayer DC, Land S, Gizzarelli L, et al. Quality assessment program for genotypic antiretroviral testing improves detection of drug resistance mutations. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):227-236.
93. Eshleman SH, Crutcher G, Petruskane O, et al. Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):813-817.
94. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27(6):1670-1677.
95. Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, et al. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997; 349(9044):20-22.
96. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998; 27(6):1711-1716.
97. Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, et al. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 1997; 26(6):1393-1395.
98. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24(3):711-713.
99. Ogata N, Fujii K, Takigawa S, et al. Novel patterns of amino acid mutations in the hepatitis B virus polymerase in association with resistance to lamivudine therapy in Japanese patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1999; 59(3):270-276.
100. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24(3):714-717.
101. Yeh CT, Chien RN, Chu CM, et al. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 31(6):1318-1326.
102. Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003; 125(2):292-297.
103. Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J Hepatol* 2008; 48(5):747-755.
104. Kim HS, Han KH, Ahn SH, et al. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther* 2005; 10(3):441-449.
105. Yeon JE, Yoo W, Hong SP, et al. Resistance to adefovir dipivoxil in lamivudine resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil. *Gut* 2006; 55(10):1488-1495.
106. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 2004; 40(5):837-844.
107. Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, et al. G to A hypermutation of hepatitis B virus. *Hepatology* 2005; 41(3):626-633.



108. Harrison SA. Small molecule and novel treatments for chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(10):2332–2338.
109. Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 2008; 358(10):991–998.
110. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed August 2008.
111. Ndjomou J, Pybus OG, Matz B. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *J Gen Virol* 2003; 84 (Pt 9):2333–2341.
112. Paraskevis D, Lemey P, Salemi M, et al. Analysis of the evolutionary relationships of HIV-1 and SIVcpz sequences using bayesian inference: implications for the origin of HIV-1. *Mol Biol Evol* 2003; 20(12):1986–1996.
113. Kim YB, Cho YK. Monophyletic clade of HIV-1 subtype B in Korea: evolutionary pressure or single introduction? *AIDS Res Human Retroviruses* 2003; 19:619–623.
114. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, et al. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; 5(2):131–139.
115. Yoshii E, Shinzawa H, Saito T, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in an area endemic for community-acquired acute hepatitis C. *Tohoku J Exp Med* 1999; 188(4):311–316.
116. Baskar P, Narayan O, McClure HM, et al. Simian immunodeficiency virus SIV<sub>ammPBj</sub> 1.9 induces multinucleated giant cell formation in human peripheral blood monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(1):73–80.
117. Cochrane A, Searle B, Hardie A, et al. A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *J Infect Dis* 2002; 186(9):1212–1221.
118. Smith DB, Simmonds P. Review: Molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12(7):522–527.
119. Visco-Comandini U, Cappiello G, Liuzzi G, et al. Monophyletic HIV type 1 CRF02-AG in a nosocomial outbreak in Benghazi, Libya. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(10):727–732.
120. Allander T, Gruber A, Naghavi M, et al. Frequent patient-to-patient transmission of hepatitis C virus in a haematology ward. *Lancet* 1995; 345(8950):603–607.
121. Birch CJ, McCaw RF, Bulach DM, et al. Molecular analysis of human immunodeficiency virus strains associated with a case of criminal transmission of the virus. *J Infect Dis* 2000; 182(3):941–944.
122. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 1992; 256(5060):1165–1171.
123. Tallis GF, Ryan GM, Lambert SB, et al. Evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis C virus through contaminated intravenous anaesthetic ampoules. *J Viral Hepat* 2003; 10(3):234–239.
124. Briones C, Perez-Olmeda M, Rodriguez C, et al. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26(2):145–150.
125. Kaye M, Chibo D, Birch C. Phylogenetic investigation of transmission pathways of drug-resistant HIV-1 utilizing Pol sequences derived from resistance genotyping. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 49(1):9–16.
126. Besisik F, Karaca C, Akyuz F, et al. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003; 38(4):506–510.

# 5 РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Н. Гоффман, М. Рошал

Noah Hoffman and Misha Roshal, Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Роль молекулярных методов непрерывно возрастает во многих областях клинической диагностики. Несмотря на значительное их упрощение, применение в клинической вирусологии диагностических методов, включающих секвенирование, амплификацию или гибридизацию, все еще требует решения целого ряда задач. Основная трудность на пути применения таких методов — потенциально крайне высокая гетерогенность вирусов, причем не только возбудителей одного и того же заболевания в разных точках Земли, но даже и в популяции возбудителя из проб одного и того же пациента. В этой главе кратко описаны биологические основы такой вариабельности, показана важность подбора верного метода для достижения конкретной диагностической задачи, освещены основные способы использования последовательностей вирусных геномов для разработки методов диагностики и рассмотрены стратегии учета в методике неизбежной вариабельности последовательностей вирусов.

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ ВАРИАЦИИ ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Многие вирусы отлично адаптированы к большому числу мутаций, по крайней мере в некоторых областях генома, и при этом практически не изменяют своего фенотипа. Относительно высокая частота ошибок вирусных полимераз, большая скорость репликации и рекомбинации способствуют быстрому накоплению геномного разнообразия, что можно наблюдать даже в доступном человеку масштабе времени. Генетическая гетерогенность циркулирующих вирусов регулируется такими факторами, как дрейф генов, естественный отбор и, с недавнего времени, искусственный отбор, вызванный противовирусной терапией. В прошлом сравнительная изолированность человеческих популяций приводила к генотипическим различиям между циркулировавшими в них вирусами, обусловленным как дрейфом генов, так и отдельными случаями передачи вирусов от человека к животным и обратно [1–3]. Под действием естественного отбора — как положительного, направленного на увеличение распространенности вирусов, так и отрицательного, устраняющего нежизнеспособные вирусные мутанты — существовавшие вирусы непрерывно изменялись. В результате снижения роли географической изоляции и из-за изменений в демографии населения поменялась

и картина распределения вирусов, а также появились рекомбинантные штаммы и новые случаи передачи вирусов от животных к человеку и наоборот [1, 4–6]. Недавнее внедрение противовирусных препаратов привело к отбору на наличие придающих устойчивость мутаций.

При повсеместной доступности методик секвенирования классификация, основанная на анализе геномных последовательностей, для целей разделения штаммов вирусов по эпидемиологическим группам во многом заменила серотипирование. Раньше выделение внутривидовых подгрупп вирусов (традиционно обозначаются как «штаммы», «генотипы», «подтипы» и «клады») имело ключевое значение при эпидемиологическом надзоре. В последнее время была показана связь генотипов некоторых вирусов, таких как HCV [7, 8] и HBV [9–11], с естественной динамикой инфекции и/или ответом на лечение. В результате генотипирование вирусов стало одной из задач клинических лабораторий.

Исторически сложилось, что схемы классификации разных вирусов различаются. Так, ВИЧ-1 был изначально разделен на группы (M, N, O), в составе которых впоследствии выделили подтипы и подгенотипы [12]. Вирусы HCV [2] и HBV [13, 14] подразделяют на генотипы и подгенотипы. Классификация вирусных штаммов неоднозначна, поэтому регулярно происходит пересмотр состава и организации групп после появления новой информации по последовательностям. Более того, сами генотипы не являются жесткими биологическими категориями. Смещение вирусов, различных по территориальному происхождению, привело к появлению множества рекомбинантов между генотипами у многих вирусов, среди которых HCV [2, 15], HBV [16] и ВИЧ-1 [17]. Еще один пример нестабильности вирусных геномов — непрерывное перемешивание сегментов генов гематоглинина и нейраминидазы (а также других сегментов генома) вируса гриппа.

В основе большей части учитываемых систематикой различий в последовательностях многих вирусов лежит генотипическое разнообразие (различия между вирусами разного происхождения). Так, вирус гепатита В подразделяют на восемь генотипических групп, отличающихся друг от друга более чем на 8%, но демонстрирующих менее 4% различий внутри отдельного генотипа [18, 19]. При этом другие вирусы, например ВИЧ-1, показывают значительные различия даже в близкородственных группах — 25–35% между подтипами и 15–20% внутри подтипа [20]. Даже в организме одного зараженного пациента популяция вируса продолжает эволюционировать в ходе инфекции. Доказательством продолжающейся эволюции могут служить появление вирусов, тропных к рецептору CXCR4, в ходе ВИЧ-инфекции и возникновение устойчивых к противовирусным препаратам вариантов вирусов в ходе хронической инфекции HBV или ВИЧ. Как эволюционные изменения, так и коинфекция различными штаммами могут привести к возникновению

в организме одного пациента нескольких клинически важных вирусных субпопуляций.

Широкое внедрение противовирусной терапии привело к появлению нового фактора отбора — на устойчивость к лекарственным препаратам. Обретение устойчивости часто проходит в несколько стадий: сначала вирус приобретает способность к непрерывной репликации в присутствии противовирусного препарата ценой снижения активности или стабильности фермента — мишени лекарства, а затем благодаря вторичным мутациям снижаются отрицательные последствия первичной мутации, дающей устойчивость [21–23]. Накопление вторичных мутаций ведет к непрерывному росту уровня устойчивости (понижению эффективности ингибирования репликации), что делает обнаружение мутаций клинически важной задачей. По мере разработки новых препаратов и накопления информации о маркерах устойчивости количество известных мутаций, ведущих к развитию устойчивости будет, вне всякого сомнения, увеличиваться.

## ЦЕЛИ И МЕТОДОЛОГИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ

За последние два десятилетия молекулярное тестирование стало важным инструментом клинической диагностики, прогнозирования развития заболеваний и эпидемиологического надзора за большинством вирусных заболеваний человека [24, 25]. Сфера применения молекулярно-биологических методов непрерывно расширяется. В табл. 5.1 приведены наиболее распространенные вопросы клинической вирусологии, для получения ответов на которые используют молекулярно-биологические методы, а также применимость получаемых данных и предъявляемые к ним требования. Существует ряд доказательств того, что применение молекулярно-биологических методик для диагностики имеет существенные ограничения. Некоторые из тестов, особенно основанные на количественной ПЦР и обратной ПЦР, предъявляют очень высокие требования к консервативности последовательностей, комплементарных праймерам и зондам. Для других, таких как определение генотипов, нужно установить области геномов с достаточно высокой степенью вариабельности для определения таксономической принадлежности возбудителей. Изучение приемов разработки конкретных диагностических тестов находится далеко за пределами рассмотрения этой главы. Потому, вместо подробного описания отдельного метода или теста, здесь подробно освещены методы биоинформатики, используемые для определения гетерогенности важных с медицинской точки зрения вирусов, и применение этой информации для разработки тестов, а также набор молекулярно-биологических методик для решения конкретных диагностических задач с учетом разнообразия генетических последовательностей — мишеней молекулярных тестов.

Таблица 5.1

**Примеры вопросов, связанных с молекулярно-биологическими тестами и их клиническим применением**

Практический вопрос	Пример методики тестирования	Требования к результатам теста	Пример использования в клинической практике
Инфицирован ли пациент?	Качественная ПЦР/ПЦР с обратной транскрипцией, мультиплексная ПЦР, другие методики амплификации, олигонуклеотидный микрочип	Очень высокая чувствительность и специфичность к исследуемым штаммам вируса	Тестирование компонентов крови, диагностика вирусного менингита и энцефалита, диагностика респираторных вирусных инфекций, статус инфекции HCV у пациентов с антителами к коровому белку HCV
Какова вирусная нагрузка пробы?	Количественная ПЦР/ПЦР с обратной транскрипцией и методики на их основе	Чувствительность, позволяющая принимать клинические решения. Высокая точность и одинаковая эффективность амплификации для всех вариантов вирусов, для которых проводится тестирование. Отсутствие нежелательных перекрестных реакций	Принятие решения о назначении противовирусной терапии и оценка ответа на препарат. Отслеживание течения заболевания и эффективности лечения
Каков генотип возбудителя инфекции?	Линейные зонды, генотипспецифичная мультиплексная ПЦР, полиморфизм длины рестриционных фрагментов, ПЦР с последующим секвенированием	Достаточный объем информации о геноме для уверенного определения генотипа. Способность определять смешанные генотипы и рекомбинанты	Прогноз течения заболевания и ответа на лечение. Эпидемиологический надзор
Устойчив ли данный вирус к препарату; есть ли у него клинически значимые мутации?	Амплификация и последующее секвенирование интересующей области генома. Методы на основе линейных зондов. Специфичные к мутациям ПЦР-зонды. Методы, основанные на лигировании олигонуклеотидов	Способность определять все известные первичные и компенсаторные мутации в исследуемом гене-мишени. Способность определять мутировавшие субпопуляции	Определение маркеров устойчивости, определение статуса мутации у HBV

## ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ТЕСТОВ

Большинство клинических молекулярно-генетических приемов, независимо от платформы, диагностической задачи или последующей обработки данных, требуют специфической амплификации ДНК или РНК с использованием ПЦР или другой подобной методики. Для проведения ПЦР необходимы как минимум два олигонуклеотида-праймера, комплементарные участкам вирусного генома. Во многих методиках также используются один или несколько флуоресцентных зондов. Вариабельность вирусов в сайтах связывания праймеров и зондов серьезно затрудняет разработку тестов, поскольку для работы тестов нужна полная или почти полная их комплементарность мишени. Эта проблема особенно актуальна для нескольких распространенных патогенов человека с крайне высокой частотой мутаций. У некоторых ДНК-содержащих вирусов, таких как VZV [26], HSV-1 [27] и парвовирус В19 [28], средняя консервативность генома составляет 98% и более. Другие, особенно РНК-содержащие вирусы и ретровирусы, среди которых такие известные патогены, как ВИЧ-1 [20], HCV и норовирус [29], демонстрируют крайне высокую вариабельность последовательностей геномов, с различием между штаммами до 40% в среднем по геному и до 70% в генах белков оболочки. Большую частоту мутаций этих вирусов можно объяснить высокой частотой ошибок их полимераз.

Такое большое разнообразие последовательностей требует тщательного подбора праймеров для обеспечения как достаточной чувствительности, так и селективности теста. Чаще всего задача подбора двух праймеров и зонда между ними, позволяющих идентифицировать весь спектр различных штаммов, отнюдь не проста. Задачу можно облегчить, если учесть, что скорость накопления мутаций различается в разных областях генома, что определяет разную генетическую вариабельность. Так, вирусные гены, которые кодируют находящиеся под сильным положительным отбором продукты, например белки оболочки, скорее всего будут весьма разнообразны у разных штаммов. А области генома, находящиеся под давлением отрицательного отбора, с большой вероятностью будут высококонсервативны. В качестве примеров можно привести гены ферментов, особенно области их активных или субстратсвязывающих центров, сайты связывания нуклеиновых кислот регуляторных белков или структурных компонентов вирусов, рибозимы или просто высоко структурированные области РНК.

Помимо тщательного подбора праймеров с учетом вариабельности разных областей генома, исследования по генотипированию и изучению лекарственной устойчивости предъявляют ряд дополнительных требований. Чтобы получить идеально разработанный генотипический тест, необходимо верно подобрать области генома для исследования и обеспечить возможность отличать рекомбинантные вирусы и смеси субпопуляций. Тест на лекарственную устойчивость должен выявлять первичные и вторичные компенсаторные мутации и позво-

Таблица 5.2

## Применение различных методик тестирования

Тип теста	Целевые последовательности в геноме	Технические требования
Качественный тест на вирусную инфекцию	Консервативные области вирусного генома	Необходима высококонсервативная область для эффективного связывания праймера или зонда, которая должна существенно отличаться от остальных областей генома как вируса, так и человека. Требуется высокой чувствительности для любого генотипа вируса и отсутствия перекрестных реакций с родственными видами. Более короткие ампликоны способствуют увеличению скорости и точности анализа. Использование мультиплексных праймеров повышает сложность
Количественный тест на вирусную нагрузку	Консервативные области вирусного генома	То же, что и выше, но с более строгими требованиями к сайтам связывания праймеров или зондов по консервативности для обеспечения чувствительности ко всем известным генотипам. Для анализов в реальном времени необходимо использовать возможно более короткие ампликоны. Требуется наличия оборудования для регистрации сигнала в реальном времени и флуоресцентных зондов
Определение генотипов	Различающиеся у разных генотипов области, позволяющие определить генотип. При использовании метода линейных зондов и секвенирования требуются фланкирующие высококонсервативные последовательности для связывания праймеров. Для генотипспецифичной ПЦР требуется набор праймеров для каждого известного генотипа	Для определения генотипа и амплификации необходимых геномных областей может понадобиться ампликон большой длины. Требуется учета возможности совместной инфекции вирусами разных генотипов или рекомбинантами. Для методик на основе секвенирования нужна сложная обработка данных. При анализе на точечные мутации требуется достаточное число анализируемых областей для установления генотипа
Тесты на устойчивость к лекарствам или на присутствие клинически значимых мутаций	Геномные области, содержащие интересующую последовательность. Может потребоваться анализ фланкирующих областей, позволяющий охарактеризовать дополнительные мутации, вызывающие устойчивость	То же, что и для генотипирования. Для анализа как первичных, так и компенсаторных мутаций может потребоваться ампликон большой длины. Сайты связывания праймеров должны обладать достаточной для амплификации консервативностью. Требуется подбора метода с достаточной чувствительностью. Так, секвенирование продукта ПЦР не выявит небольшую мутировавшую субпопуляцию

лать различать субпопуляции с устойчивостью к разным препаратам. Для распознавания и описания профиля устойчивости может потребоваться сложное программное обеспечение. При выборе платформы для генотипирования или изучения мутаций следует, помимо прочего, учитывать необходимость быстрой адаптации методики к постоянно меняющимся филогенетическим данным. Это подразумевает способность метода получать требуемую согласно новой номенклатуре информацию об анализируемых образцах и верно ее интерпретировать. В некоторых случаях приспособляемость метода может идти вразрез с требованиями повышения чувствительности. Так, простым секвенированием области генома, кодирующего полимеразу, можно установить все мутации, приводящие к развитию ее устойчивости к противовирусным препаратам, хотя метод не будет обладать чувствительностью, достаточной для выявления таких мутантов при их доле в общей вирусной нагрузке менее 20%. Основанный на лигазной реакции метод определения точечных мутаций, напротив, обеспечивает высокую чувствительность, однако будет требовать длительной перенастройки и отладки при выявлении новых функционально значимых мутаций. В табл. 5.2 приведен краткий обзор некоторых требований к выбору метода и возникающих при этом неизбежных затруднений.

Кроме того, при выборе методики для создания теста на ее основе следует учитывать, что законодательство по охране интеллектуальной собственности может запрещать использовать в качестве мишеней метода отдельные области генома или последовательности. Это особенно важно для клинических лабораторий, взимающих плату за анализы. Некоторые патенты сильно ограничивают набор последовательностей, которые можно выбрать в качестве мишени без разрешения правообладателя. Другие патенты намного более конкретны и не создают подобных затруднений. В целом широкие патентные права на метод или последовательность становится получить все труднее. К несчастью, для тщательного исследования патентов в интересующей области чаще всего требуются услуги специалистов по патентному праву.

## **СТРАТЕГИИ ОТБОРА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЦЕЛЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Некоторые факторы, учитываемые при разработке методики, специфичны для данного теста, другие не различаются значительно между вирусологическими и прочими тестами, применяемыми в молекулярной генетике или молекулярной микробиологии. Как говорилось выше, требования, характерные для молекулярной вирусологии, обусловлены главным образом высокой гетерогенностью потенциальных целевых последовательностей, а пригодность последовательности в качестве сайта связывания праймера зависит от назначения метода: обнаружение и количественное определение вирусов основано на вы-



сококонсервативных последовательностях, тогда как при генотипировании исследуют в первую очередь области с высокой изменчивостью (притом от фланкирующих областей часто требуется достаточная консервативность, чтобы использовать их в качестве сайтов связывания праймеров). По этим причинам мы сосредоточимся на рассмотрении основных подходов к оценке гетерогенности последовательностей.

Есть две основные стратегии выбора целевой последовательности. Первая исходит из функции потенциальной целевой последовательности. Вторая опирается на прямое изучение данных секвенирования. Относительную гетерогенность последовательности в различных вирусных геномах можно оценить и без знания биологических функций этой области (наоборот, знание о вариабельности последовательности у различных штаммов может послужить для определения ее биологической функции). На практике две эти стратегии часто используются совместно. Так, при выборе высококонсервативной области возможные целевые последовательности ищут среди участков, находящихся под сильным давлением отрицательного отбора.

## **ИСТОЧНИКИ ДАННЫХ О СЕКВЕНИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ГЕНОМАХ**

Как правило, исследователю доступны данные секвенирования вирусных геномов; чаще всего таких данных оказывается достаточно для подбора целевой последовательности праймера или зонда, поскольку в открытых базах данных находится большой и постоянно расширяющийся объем информации. Иногда требуются дополнительные сведения, получаемые в ходе экспериментов. В любом случае, как об этом сказано ниже, сбор необходимых данных — важнейший этап разработки эффективного метода анализа.

### **Курируемые базы данных нуклеотидных последовательностей вирусов**

Специализированные открытые курируемые экспертами базы данных вирусных геномов, часто снабженные для облегчения доступа интерфейсом в форме интернет-сайта, стали одним из ключевых инструментов изучения биологии вирусов, их эволюции и эпидемиологии (табл. 5.3). Именно такие базы данных должны быть отправной точкой при поиске данных о геномных последовательностях в случае, если для интересующего исследователя вируса существует такая информация. Последовательности, собранные в специализированные коллекции, как правило можно также взять из базы данных GenBank (см. ниже), однако рекомендуется такие последовательности проверять на достоверность и полноту, сравнивая данные из разных источников.

Базы данных обычно предоставляют важную сопутствующую информацию, такую как генотип, клинические данные, к примеру вирусную нагрузку или историю болезни пациента с указанием приме-

нявшихся противовирусных препаратов, места происхождения или фенотип вируса. Также на сайтах баз данных часто доступны сложные программы отбора, визуализации и анализа последовательностей. Один из примеров подобных баз данных — база последовательностей ВИЧ (<http://www.hiv.lanl.gov>). Этот сайт имеет интерфейс, позволяющий загружать выровненные последовательности генома ВИЧ в соответствии с выбранной пользователем областью генома, удовлетворяющей описанным выше критериям. Эта база данных располагает практически полным набором инструментов и инструкций по их освоению. В табл. 5.3 представлены некоторые из доступных в Интернете открытых баз данных вирусных последовательностей.

### Прочие открытые базы данных нуклеотидных последовательностей

Крупнейшая на сегодняшний день база данных нуклеотидных последовательностей — Международная объединенная база данных нуклеотидных последовательностей (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), в составе которой — DNA DataBank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) и GenBank в составе NCBI. У исследователей из США наиболее востребованный ресурс — это интернет-портал NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Важность и полноту этой объединенной базы данных трудно переоценить, однако такое количество информации может обескуражить исследователя. Какими подходами следует пользоваться, выбирая последовательности для сравнения в отсутствие специализированного ресурса, посвященного конкретному вирусу?

Для решения этой задачи можно применить несколько различных стратегий. При исчерпывающем поиске можно использовать их все.


1. Поиск можно производить с использованием таксономического идентификатора NCBI. База данных по таксономии (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) позволяет идентифицировать и получать наборы последовательностей в соответствии с их организацией в таксономической иерархии. В качестве альтернативы можно использовать прямой поиск по нуклеотидной базе данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) с использованием идентификатора таксономической группы. Так, по поисковому запросу «txid11102 [Organism: hcr]» можно получить все доступные последовательности генома HCV. Классификация осуществляется либо на основе данных, предоставленных автором записи, либо по решению поддерживающего базу данных персонала. Как правило, один этот подход дает вполне исчерпывающие результаты, однако в силу возможного неверного аннотирования последовательностей получаемые результаты могут быть неполными.

2. Запрос с использованием текста или ключевого слова в полной базе данных тоже может служить хорошей отправной точкой. Этот подход дает наилучшие результаты при тщательном подборе запроса и поиске только в определенных разделах базы данных ([Данная книга в списке рекомендаций к покупке и прочтению форума сайта <https://meduniver.com/>](http://www.</a></p></div><div data-bbox=)

Таблица 5.3

## Некоторые общедоступные базы данных вирусных нуклеотидных последовательностей

Название базы данных	Вирусы	URL	Поддерживающая организация	Дополнительные сведения
База данных последовательностей ВИЧ	ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV	<a href="http://www.hiv.lanl.gov">http://www.hiv.lanl.gov</a>	Лос-Аламосская национальная лаборатория (LANL; Los Alamos National Laboratory)	Сайт содержит также множество литературы, руководств и программных инструментов
База данных последовательностей HPV	HPV	<a href="http://pave.nsl.d.nih.gov/lanl-archives/">http://pave.nsl.d.nih.gov/lanl-archives/</a>	LANL	
VBRC	Arenaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Poxviridae, Togaviridae (см. прим.)	<a href="http://www.vbrc.org">http://www.vbrc.org</a>	Ресурсный центр биоинформатики вирусов (VBRC; Viral Bioinformatics Resource Center) <sup>a</sup>	Курлируемые данные о последовательностях, указанных в перечне семейств вирусов, наряду с большим числом инструментов биоинформатики и ссылок на смежные ресурсы; VBRC также поддерживает несколько специализированных вирусных баз данных, пополняемых независимо друг от друга
База данных по вирусу гепатита С (HCVdb)	HCV	<a href="https://omictools.com/hcv-sequence-database-tool">https://omictools.com/hcv-sequence-database-tool</a>	VBRC	Имеет общие ресурсы и данные с базой данных LANL HCV ( <a href="http://hcv.lanl.gov">http://hcv.lanl.gov</a> )
База данных по вирусу денге (DengueDB)	Вирус денге	<a href="https://www.vibrbc.org/vbrcCuratedDataDetail.spg?vbrcGeneId=35666&amp;decorator=flavi">https://www.vibrbc.org/vbrcCuratedDataDetail.spg?vbrcGeneId=35666&amp;decorator=flavi</a>	VBRC	

Название базы данных	Вирусы	URL	Поддерживающая организация	Дополнительные сведения
Биоинформатический ресурсный центр по поксвирусам	Поксвирусы	<a href="https://virology.liv.ac.uk/organisms/dsln-a-viruses/poxviridae/">https://virology.liv.ac.uk/organisms/dsln-a-viruses/poxviridae/</a>	VBRC	
База данных по вирусу гриппа BioHealthBase	Вирус гриппа	<a href="http://www.biohealthbase.org">http://www.biohealthbase.org</a> 	Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID; National Institute of Allergy and Infectious Diseases)	Содержит инструменты для построения множественного выравнивания и визуализации
База изменений вирусов NCBI virus variation	Вирусы гриппа и денге	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/</a>	NCBI	Добавлена информация о вирусах гриппа других организмов ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html</a> ) а также о других вирусах

\* Совместный проект университета Алабамы в Бирмингеме и университета Виктории, США

ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/samplerecord.htm). Более прямолинейный подход может привести к включению в результат неподходящих записей, содержащих текст из запроса (например, последовательность человеческого гена-рецептора искомого вируса. — *Прим. ред.*) или к пропуску записей, в которых использовано альтернативное обозначение организма. Так, результаты поиска по таксономии по запросам «BK polyomavirus» (таксономический ID 10629) содержат результаты как минимум семи вариантов запроса, таких как «BK virus BKV», «BK polyomavirus», «Human polyomavirus BK», «Human BK virus», «Papovavirus BKV», «Human polyomavirus (BKV)» и «Human papovavirus BK». Для получения всех возможных результатов при таком поиске, очевидно, требуется достаточно сложный подход.

3. Поиск последовательностей по сходству, обычно осуществляемый при помощи алгоритма BLAST; может быть полезен для быстрого отбора последовательностей, сходных с интересующей исследователя. Чтобы исключить лишь отдаленно похожие последовательности или слишком короткие совпадения, варьируют параметры сходства и длины сравниваемых участков. Этот подход следует использовать с осторожностью, поскольку таким образом можно потерять отдаленно похожие по последовательности, но тем не менее родственные по происхождению генотипы.

4. База данных GenBank PopSet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset>) содержит предварительно созданные наборы записей, собранных для анализа эволюционных взаимоотношений внутри популяций. Эти наборы последовательностей часто оказываются полезными, однако набор может содержать последовательности, относящиеся к более чем одному виду или иному таксону.

5. База данных вирусных геномов GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi>) содержит аннотированные вирусные геномы.

Успешные стратегии поиска следует тщательно документировать, чтобы после появления новых сведений иметь возможность воспроизвести поиск. Вне зависимости от выбранной стратегии результаты могут быть представлены по желанию пользователя в нескольких различных формах. Последовательности в формате FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/fasta.shtml>) распознаются практически любой программой для анализа последовательностей, однако содержат крайне мало дополнительной информации.

## АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Задача, требующая абсолютно исчерпывающего поиска, на практике встречается редко, поскольку во всех наборах данных, кроме самых небольших, добавление новой последовательности дает лишь незначительную прибавку к уже полученной информации. Намного более актуальна задача исключения низкокачественных последовательностей, не принадлежащих к интересующей исследователя группе вирусов,

последовательностей вирусов, многократно пассированных в лаборатории и накопивших не встречающиеся в естественных условиях мутации, а также близкородственных групп последовательностей. Кроме того, важно удостовериться, что клинически важные субпопуляции представлены в наборе исследуемых данных в достаточной и пропорциональной форме. Стратегии решения этих задач представлены ниже.

### Оценка качества определения последовательности

В отсутствие первичных данных секвенирования (таких, как данные нуклеотидного электрофореза при секвенировании по Сенгеру) исследователь вынужден полагаться на косвенную оценку качества данных секвенирования. Наиболее явно на низкое качество данных секвенирования указывает большое число непрочитанных или неоднозначно прочитанных нуклеотидов, обычно обозначаемых буквой N или другими символами, принятыми ИЮПАК для обозначения неоднозначностей (Y, R, W, S и т. д.). Присутствие непрочитанных нуклеотидов далеко не всегда оказывается следствием небрежного отношения авторов записи к своей работе, оно может отражать ограничения, накладываемые использованным для секвенирования методом, например совместное секвенирование смеси гетерогенных вирусных популяций. Возможно также, что получение очень точных данных секвенирования просто не было целью исследования, для которого это секвенирование производили. Установление лимита неоднозначно прочитанных нуклеотидов может стать эффективной защитой от включения в перечень анализируемых последовательностей низкокачественных данных. Еще один подход, актуальный для данных GenBank, однако отличающийся повышенной консервативностью, заключается в отбрасывании последовательностей, не сопровождающих публикацию (так называемые «прямые подачи» — *direct submissions*). Наконец, выравнивание с достоверно правильно прочитанными последовательностями может помочь выявить инсерции и делеции, которые с большой вероятностью являются артефактами секвенирования, например нонсенс-мутации в генах, необходимых для репликации вируса. (В некоторых случаях, если обнаружены многочисленные очевидно ошибочные последовательности, поданные конкретной группой ученых, целесообразно исключить из анализа все последовательности, поданные этой группой. — Прим. ред.)

### Построение множественных выравниваний

Множественное выравнивание представляет собой сопоставление позиций в наборе родственных биологических последовательностей. Самый простой метод — выравнивание набора последовательностей одинаковой длины, начинающихся и заканчивающихся в одинаковых положениях; его можно произвести вручную без специализированного программного обеспечения. Однако в большинстве случаев длины последовательностей различаются или содержат инсерции и делеции,

в результате чего в некоторые из них для построения верного выравнивания следует внести разрывы. Положение разрывов становится все менее однозначным по мере увеличения гетерогенности анализируемых последовательностей.

При множественном выравнивании подразумевается, что нуклеотиды или аминокислоты, находящиеся в одном столбце, имеют общее эволюционное происхождение; добавление разрывов подразумевает, что в этом месте в определенный момент эволюционной истории произошла делеция или инсерция. Таким образом, инструменты множественного выравнивания используют эволюционные модели для создания выравнивания, наиболее правдоподобного с биологической точки зрения.

Выбор и применение алгоритмов множественного выравнивания подробно описаны в литературе [30]. Эти алгоритмы претерпели значительные изменения со времени их внедрения в практику. Тем не менее для большинства задач, связанных с разработкой методик исследования вирусов, наиболее важными критериями при подборе программы выравнивания остаются простота использования, скорость проведения вычислений, способность работать с требуемым количеством последовательностей нужной длины и совместимость с доступным аппаратным обеспечением. Поскольку чаще всего множественное выравнивание при выборе целевых последовательностей используют для сравнения областей с высоким сходством, в которых инсерции и делеции относительно редки, выравнивание по этим областям должно быть одинаковым при разных алгоритмах выравнивания. Для большинства задач достаточно широко используемой программы ClustalW, запускаемой при помощи командной строки (Clustal Omega — более современная версия программы), или ClustalX, имеющей графический интерфейс (доступны на сайте <http://www.clustal.org>) [31]. Сравнение ClustalW с другими программами при помощи предварительно выровненных наборов последовательностей показало, что, хотя некоторые другие программы справились с задачей лучше, их преимущества оказались весьма специфическими, а увеличение качества выравнивания достигалось ценой увеличения расчетного времени [32]. Таким образом, исследование дополнительных параметров и пакетов программ для выравнивания остается целиком на усмотрение пользователя. Построение выравниваний очень длинных последовательностей или большого числа последовательностей при использовании программ, не оптимизированных для таких задач (например, ClustalW), требует много вычислительного времени и может быть неприемлемо медленным. База данных последовательностей ВИЧ, принадлежащая LANL, использует программный пакет HMMER для построения выравнивания десятков тысяч последовательностей ВИЧ с использованием скрытых марковских моделей, созданных на основании менее объемных выравниваний. Полезные сведения, облегчающие выбор программного пакета для множественного выравнивания, приведены в литературе [34].

Множественное выравнивание, построенное при помощи компьютера, совершенно не обязательно будет оптимальным и может потребовать ручной корректировки. Чаще всего для этого пользуются обычными текстовыми редакторами, что отнимает много времени и служит источником трудноустраняемых ошибок. Мы настоятельно рекомендуем использовать для этой цели один из бесплатных или коммерческих программных пакетов для редактирования выравниваний. Поскольку сфера программного обеспечения для биоинформатики развивается крайне динамично, любые приведенные здесь прямые ссылки на подобные продукты очень быстро устареют; обновляющиеся списки программного обеспечения для построения выравниваний доступны во множестве источников, например в Википедии ([http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_sequence\\_alignment\\_software](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_sequence_alignment_software)).

### Создание репрезентативного набора последовательностей

Большинство методов молекулярной вирусологии направлено на выявление с высокой чувствительностью и точностью одного вируса или группы вирусов, на различение вирусов разных видов или генотипов или на выявление полиморфизмов, обладающих функциональной значимостью. В любом из этих случаев при отсутствии данных о фоновой генетической вариабельности в субпопуляциях разработка метода может оказаться неудачной. После подбора и выравнивания возможных целевых последовательностей требуются дополнительные меры для обеспечения чувствительности метода вне зависимости от гетерогенности целевых генов в изучаемых популяциях.

#### *Выпадающие значения*

Выпадающие значения (варианты последовательности, которые не нужны и даже затрудняют разработку теста) в простейшем случае могут быть следствием неверной аннотации или использования неверной стратегии поиска; иногда их можно выявить и исключить при просмотре аннотаций отобранных последовательностей. Выпадающие значения, труднее поддающиеся устранению, можно обозначить также как «биологические», и они чаще всего представляют собой последовательности штаммов, отличающихся от большей части известных. Лабораторные штаммы, претерпевшие множество пересевов, очень часто дают выпадающие значения, особенно в случае использования их в качестве эталонных последовательностей: нередко такие вирусы накапливают целый ряд мутаций различного характера и не соответствуют более клиническим штаммам. Хорошо известным примером подобного служит эталонный штамм HXB2 вируса ВИЧ-1 (GenBank K03455), который считается стандартным ВИЧ-1, несмотря на нестандартный характер инсерций и делеций в функционально важной области Env. Обнаружение выпадающих значений с использованием филогенетического анализа описано ниже.



### *Точное представление структуры популяции*

Возможно наиболее сложная и затратная по времени задача при сборке набора вирусных последовательностей — обеспечить адекватную представленность субпопуляций и избежать чрезмерного количества последовательностей близкородственных штаммов. Подгруппы вирусов могут коррелировать с географическими, эпидемиологическими и этнографическими особенностями пациента, из проб которого они были выделены, и по этой причине исследователь должен быть уверен в том, что анализируемые последовательности отражают структуру циркулирующих в целевой группе населения вирусов. Важно понимать, что геномные базы данных не показывают должным образом структуру и гетерогенность вирусов в природе. Так, штаммы или подтипы, доминирующие в Европе или Северной Америке, чаще всего представлены в большем объеме, чем штаммы из других областей. Еще один распространенный пример выборки, содержащей артефакты, — коллекции последовательностей штаммов, выделенных у одного пациента или группы пациентов. Необоснованное включение в выборку набора близкородственных последовательностей может привести к серьезным ошибкам.

Оценка различных субпопуляций может стать непростой задачей при анализе данных первичного секвенирования или при использовании источника, не указывающего групповой принадлежности последовательностей [35]. Еще большие затруднения возникают при изучении недавно открытых патогенов, для которых структура популяции пока не охарактеризована, а последовательности не распределены по подгруппам. В последнем случае, прежде чем начинать разработку теста для клинической практики, необходимо экспериментально установить степень гетерогенности, а для этого провести секвенирование геномов штаммов из репрезентативных популяций.

Иногда структуру популяции можно визуализировать непосредственно по данным множественного выравнивания. Этот процесс сильно облегчают специальные программы, выделяющие неконсенсусные нуклеотидные замены (как правило, это можно сделать с помощью программного обеспечения для построения множественных выравниваний, например ClustalX, но есть и целый ряд доступных в Интернете программ: Sequence Alignment Publishing Tool (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/SeqPublish/seqpublish.html>), Highlighter Tool (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIGHLIGHT/highlighter.html>) и Jalview [36] (<http://www.jalview.org>). С практической точки зрения полезно подписывать эталонные последовательности подтипа, что облегчит отнесение к этому подтипу последовательностей при изучении данных множественного выравнивания.

Наглядно представить структуру популяции часто помогает построение филогенетического древа. В частности, при таком подходе хорошо заметны выпадающие значения. Построение филогенетических деревьев — тема еще более сложная, чем построение множественных

выравниваний; для выполнения этой задачи также есть большое количество специализированных программ. Однако для нужд разработки вирусологических тестов требуется относительно небольшая часть возможностей этого метода, поскольку даже самый примитивный филогенетический анализ помогает выявить выпадающие значения и определить макроструктуру популяции.

Удобно начинать филогенетический анализ с алгоритма присоединения соседей в программах ClustalW и ClustalX. Более сложные вычисления, такие как определение эволюционной дистанции или скорости накопления замен по сайтам, требуют большей тщательности (как на уровне построения выравниваний, так и при филогенетическом анализе) и лежат далеко за пределами нашего обсуждения. Визуализацию филогенетического древа можно произвести при помощи инструмента TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), а также ряда других программ. Обширный список программ и ресурсов поддерживается Joe Felsenstein (автором популярного филогенетического программного пакета PHYLIP) на сайте Вашингтонского университета (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>).

Если не все подгруппы представлены в необходимой степени, первый вопрос заключается в том, насколько консервативен в них интересующий исследователя участок. Так, если во всех известных группах участок высококонсервативен, чаще всего можно продолжать разработку метода без сбора дополнительной информации. В любом другом случае сложно предсказать работоспособность метода при исследовании вариантов вирусов, недостаточно представленных в базе данных при разработке теста. В случае если недостаточно представленные в наборе последовательностей группы доминируют в регионе, в котором предполагается использовать метод, может возникнуть необходимость перед внедрением метода секвенировать дополнительные штаммы.

Таким образом, если предположить, что подгруппы (генотипы и т. д.) были верно определены, а набор последовательностей репрезентативен, процесс добавления новых последовательностей в набор и выделение репрезентативного набора данных выглядит следующим образом.

1. Выделяют набор референсных эталонных последовательностей, содержащих интересующую область из базы данных референсных последовательностей или из литературы. Удобно, когда таксономическое положение каждой последовательности отражено в ее названии.

2. При необходимости добавления дополнительных последовательностей производят поиск по открытым базам данных.

3. Анализируют последовательности по длине, качеству прочтения (например, по количеству неоднозначно прочитанных оснований) и представленности интересующей области генома. Изучают аннотации к последовательностям для установления их близкого родства (например, выделенных из проб одного пациента) и исключают все, кроме нескольких репрезентативных.

4. Строят множественное выравнивание.
5. Распределяют неклассифицированные последовательности по подгруппам, вручную или при помощи филогенетического анализа сопоставляя их с референсными последовательностями.
6. Определяют, достаточно ли верно представлены субпопуляции. Рассматривают возможность удаления последовательностей из чрезмерно представленных подгрупп или кластеров близкородственных штаммов.

### *Интерпретация гетерогенности последовательностей*

Основная задача длительного и сложного процесса сбора данных о последовательностях — создание зондов или праймеров для исследования интересующей области генома. Поскольку подход к разработке тестов определяется конкретной методикой, строение праймера почти никогда не будет полностью учитывать всю гетерогенность целевой последовательности. Возможность прямого использования множественного выравнивания при подборе праймеров для ПЦР весьма ограничена. Программы *Primaclade* [37] и *PriFi* [38], доступные в Интернете, способны распознавать консервативные области и подбирать праймеры с заданными характеристиками длины, температуры плавления, содержания пар G—C и т. д. Однако большая часть программ подбора праймеров использует в качестве исходных данных единственную последовательность. Например, так действует *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net>) — популярная программа подбора праймеров, разработанная Институтом Уайтхеда и Медицинским институтом Говарда Хьюза. В этом случае подбор целевых последовательностей основан на консервативности (определяемой по множественному выравниванию) и на характеристиках конкретной последовательности и проходит в несколько повторяющихся итераций. Первоначальный поиск производится в областях, определенных как высококонсервативные. Полученные праймеры можно затем сравнить с множественным выравниванием (или другой формой представления изменчивости последовательности, обсуждаемой ниже) для удаления тех, которые будут чувствительны к отдельным положениям со множественными полиморфизмами.

Успешным может оказаться подход, при котором в качестве целевой последовательности праймера используют усредненную «консенсусную» последовательность из целевой области. Такая последовательность рассчитывается по данным множественного выравнивания из наиболее часто находящихся в данных позициях нуклеотидов. Положения, не имеющие выраженного консенсусного характера, могут быть представлены кодом неоднозначности (N или коды ИЮПАК). Самое очевидное преимущество такого подхода по сравнению с использованием единственной последовательности в том, что выбранные таким образом праймеры будут подходить для подавляющего большинства штаммов. Есть и менее явное преимущество: положения

такой искусственной консенсусной последовательности в точности соответствуют таковым во множественном выравнивании, что облегчит в дальнейшем картирование сайтов связывания на других последовательностях в выравнивании.

Полиморфизмы нуклеотидов можно разделить на два основных класса. К первой группе принадлежат замены, коррелирующие с подгруппами и ведущие свое начало от одной родительской последовательности. Второй класс объединяет замены, появившиеся после выделения основных подгрупп и не коррелирующие с основными подгруппами. Для разработки методики наиболее важны полиморфизмы первого класса, поскольку несоответствие последовательности праймера или зонда повлияет на возможность определять всех членов подгруппы.

Приемы выделения специфичного для группы полиморфизма основаны на изучении выравнивания консенсусов, принадлежащих только членам выбранной подгруппы. Полезно также включать в выравнивание общую консенсусную последовательность. Возможные праймеры можно быстро проверить на совпадение как с консенсусом интересующей группы, так и общим консенсусом вида, и только прошедшие такой отбор праймеры имеет смысл сравнивать с последовательностями отдельных штаммов.

Можно описать и другие способы представления нуклеотидных полиморфизмов. Многие программы построения множественных выравниваний (такие как ClustalW) способны представить график степени консервативности для каждой позиции. Описано построение матрицы весов, покрывающей полный геном HCV и используемой для подбора праймеров [39]. Создан простой алгоритм, называемый VxV, облегчающий подбор праймеров для амплификации последовательностей HBV [40]. Этот алгоритм отбрасывает области с низкой консервативностью и выдает результат в форме, распознаваемой ClustalX.

## Прочие инструменты биоинформатики

Появление большого числа специализированных биоинформатических инструментов свидетельствует о сложности отдельных шагов анализа, описанных выше. В некоторых случаях сложный анализ эффективнее проводить при помощи настраиваемых программных пакетов с использованием скриптов или программ. Опытные специалисты по анализу последовательностей обычно пользуются инструментами, запускаемыми при помощи командной строки, такими как EMBOSS (<http://emboss.sourceforge.net>), позволяющими автоматизировать при помощи скриптов многоэтапные работы, комбинируя простые однозадачные инструменты. Этот программный пакет доступен в онлайн-режиме (например, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Хотя освоение таких пакетов может сначала показаться трудным, библиотеки, предназначенные для основных языков программирования, таких как Java (<http://biojava.org>), Perl (<http://www.bioperl.org>),

Python (<http://biopython.org>), а также язык R (<http://cran.r-project.org> и <http://bioconductor.org>), позволяют разрабатывать инструменты и решать задачи, которые невозможно решить никаким другим способом (например, анализ десятков тысяч последовательностей).

## РАЗРЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ, СВЯЗАННЫХ С НЕИЗБЕЖНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТЬЮ ЦЕЛЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Во многих ситуациях невозможно или нежелательно использовать зонды или праймеры, полностью комплементарные любому варианту целевой последовательности. Среди причин — отсутствие достаточно консервативных фрагментов в интересующей области или необходимость амплифицировать фрагмент с высокой изменчивостью. В подобном случае можно рассмотреть четыре различных варианта: несовершенное спаривание праймеров, использование вырожденных праймеров, использование универсальных оснований и комбинация этих подходов.

Несовпадения в области 5'-конца праймера чаще всего не слишком отражаются на эффективности амплификации, однако снижают температуру плавления праймера, а следовательно, специфичность. Напротив, даже единичное одиночное несопадение в области 3'-конца (особенно в пределах 3 нуклеотидов от 3'-конца) сильно дестабилизирует комплекс праймера с целевой областью и делает амплификацию практически невозможной [41, 42]. Таким образом, если несопадения неизбежны, то сосредоточение их в 5'-области праймера дает работающее, хотя и неидеальное решение [43, 44]. (Кроме того, следует учитывать, что разные несопадения имеют различный эффект на вероятность отжига (гибридизации) праймера. Так, если в несопадении участвует G, эффект на отжиг праймера минимальный, а, например, несопадения C—C или A—A намного сильнее влияют на отжиг. — *Прим. ред.*). Использование вырожденных праймеров со всеми возможными основаниями по изменчивой позиции или универсальных оснований, с некоторой эффективностью спаривающихся с любым из четырех, может в некоторых случаях увеличить чувствительность теста. Обе стратегии реализованы рядом исследователей как по отдельности, так и в комбинации, хотя зачастую это усложняет разработку методики. Использование вырожденных позиций (например, Y в случае если в мишени может встречаться T или C) позволяет применять только потенциально комплементарные нуклеотиды, давая точное спаривание с целевой последовательностью. Использование универсальных нуклеотидов подразумевает, что по полиморфному положению в праймере будет стоять основание, способное спариваться с любым другим. Теоретически оба этих подхода увеличивают специфичность праймера. С другой стороны, вырожденные позиции во множестве сайтов ведут к появлению очень сложной смеси праймеров (три варианта нуклеотидов в четырех положениях дадут набор из 81 праймера) и снижению концентрации каждого из них, что

сделает амплификацию неэффективной. Более того, каждый из праймеров смеси будет давать разные перекрестные реакции с нецелевой последовательностью и иметь собственную температуру плавления, что может вызывать неспецифичную амплификацию и чрезвычайно усложнить стандартизацию количественных методов. Помимо этого, оптимизация ПЦР со смесью праймеров может быть крайне непростой задачей. Рекомендуется по возможности ограничивать использование вырожденных праймеров.

В качестве универсального основания чаще всего используют дезоксиинозин (I), который способен взаимодействовать с любыми природными основаниями, но с неодинаковой эффективностью: I спаривается с G и T (т. е. подходит для замены в праймере C и A) менее эффективно, чем с A и C [45]. Включение I в последовательность помогает снизить вырожденность праймеров и уменьшить их количество, а также вероятность перекрестных реакций. Наиболее часто дезоксиинозин использовался для изготовления праймеров к областям, кодирующим известную аминокислоту, для которой существует несколько возможных кодонов [46]. Дезоксиинозин также успешно применяли для построения праймеров, для которых невозможно избежать вырожденного положения на 3'-конце [47]. Это предотвращает срыв амплификации при несовпадении на 3'-конце. Такая стратегия довольно рискованна из-за возможности неверного присоединения праймера и сниженной эффективности амплификации [48]. Кроме того, использование инозина приводит к уменьшению специфичности и температуры отжига [49] и недопустимо с некоторыми полимеразы с редактирующей активностью [50, 51]. Самый нежелательный из перечисленных эффектов — понижение температуры отжига.

Сочетание вырожденных праймеров и инозина позволяет избежать недостатков обоих подходов и широко применяется на практике. Именно так с одной пары праймеров успешно амплифицированы геномные последовательности трех разных подгрупп флавивирусов, включающих 65 видов [52]. Тем не менее использование любой из этих стратегий может ухудшить результаты количественных тестов вследствие неодинаковой эффективности связывания [44, 53, 54]. Как и для любого клинического теста, полученные результаты в этом случае требуют тщательной проверки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как и в других областях применения молекулярно-биологических методов в клинической лабораторной диагностике, набор инструментов и методик разработки вирусологических тестов постоянно расширяется. По этой причине некоторые из приведенных в главе подходов и программ скоро устареют. Однако мы считаем, что основные описанные здесь принципы оценки и степени гетерогенности вирусных последовательностей останутся без изменений до внедрения молекулярных методик, менее зависимых от априорного знания последова-

тельность. Помимо литературы отличным источником данных о подходах и программах могут служить базы данных, представленные в табл. 5.3. Поскольку в постгеномную эру клиническая вирусология продолжит пользоваться инструментами, разрабатываемыми в более фундаментальных областях, специалистам в этой области следует быть готовыми воспринимать и осваивать последние достижения молекулярной биологии и биоинформатики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, et al. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* 2000; 287:607–614.
2. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus — 15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85:3173–3188.
3. Bowden R, Sakaoka H, Ward R, et al. Patterns of Eurasian HSV-1 molecular diversity and inferences of human migrations. *Infect Genet Evol* 2006; 6:63–74.
4. Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog* 2007; 3:e75.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2436–2441.
6. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62:71–92.
7. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: A randomised trial. *Lancet* 2001; 358:958–965.
8. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426:186–189.
9. Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 2002; 35:1274–1276.
10. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37:19–26.
11. Tsubota A, Arase Y, Ren F, et al. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol* 2001; 65:257–265.
12. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, et al. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008; 358:1590–1602.
13. Bowyer SM, Sim JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: Footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virol* 2000; 81:379–392.
14. Purdy MA, Gonzales AC, Dimitrova Z, et al. Supragenotypic groups of the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2008; 89:1179–1183.
15. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, et al. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002; 76:4034–4043.
16. Kurbanov F, Tanaka Y, Fujiwara K, et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J Gen Virol* 2005; 86:2047–2056.

17. Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:22–27.
18. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10):2575–2583.
19. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13:14–21.
20. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:W13 — W23.
21. Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, et al. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 1999; 13:2349–2359.
22. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Boucher CA. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: Evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 189:299–320.
23. Canducci F, Sampaolo M, Marinozzi MC, et al. Dynamic patterns of human immunodeficiency virus type 1 integrase gene evolution in patients failing raltegravir-based salvage therapies. *AIDS* 2009; 23:455–460.
24. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: A systematic review. *JAMA* 2007; 297:724–732.
25. Mangia A, Antonucci F, Brunetto M, et al. The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Dig Liver Dis* 2008; 40:395–404.
26. Norberg P, Liljeqvist JA, Bergstrom T, et al. Complete-genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: Genetic divergence and evidence for recombination. *J Virol* 2006; 80:9569–9576.
27. Norberg P, Bergstrom T, Rekadbar E, et al. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol* 2004; 78:10755–10764.
28. Gallinella G, Venturoli S, Manaresi E, et al. B19 virus genome diversity: Epidemiological and clinical correlations. *J Clin Virol* 2003; 28:1–13.
29. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol* 2007; 79:1388–1400.
30. Abecasis A, Vandamme A, Lemey P. Sequence Alignment in HIV Computational Analysis. In: Leitner T, Foley B, Hahn B, et al., eds. *HIV Sequence Compendium 2006/2007: Theoretical Biology and Biophysics Group*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, LA-UR 07-4826, 2007:2–16.
31. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947–2948.
32. Lassmann T, Sonnhammer EL. Quality assessment of multiple alignment programs. *FEBS Lett* 2002; 529:126–130.
33. Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 1998; 14:755–763.
34. Edgar RC, Batzoglou S. Multiple sequence alignment. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16:368–373.
35. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, et al. Marked variability of BK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2671–2680.
36. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, et al. Jalview Version 2 — A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009; 25:1189–1191.



37. Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, et al. PrismaClade — A flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* 2005; 21:1263–1264.
38. Fredslund J, Schausser L, Madsen LH, et al. PriFi: Using a multiple alignment of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:W516 — W520.
39. Qiu P, Cai XY, Wang L, et al. Hepatitis C virus whole genome position weight matrix and robust primer design. *BMC Microbiol* 2002; 2:29.
40. Zhang Q, Wu G, Richards E, et al. Universal primers for HBV genome DNA amplification across subtypes: A case study for designing more effective viral primers. *Viol J* 2007; 4:92.
41. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: Implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:4567–4573.
42. Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ. Discrimination of primer 3-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2000; 284:11–18.
43. Christopherson C, Sninsky J, Kwok S. The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:654–658.
44. Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:1660–1663.
45. Martin FH, Castro MM, Aboul-ela F, et al. Base pairing involving deoxyinosine: Implications for probe design. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:8927–8938.
46. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, et al. Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2990–2996.
47. Ben-Dov E, Shapiro OH, Siboni N, et al. Advantage of using inosine at the 3 termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:6902–6906.
48. Zheng L, Gibbs MJ, Rodoni BC. Quantitative PCR measurements of the effects of introducing inosines into primers provides guidelines for improved degenerate primer design. *J Virol Methods* 2008; 153:97–103.
49. Seela F, Chen Y. Oligonucleotides containing fluorescent 2'-deoxyinosine: Solid-phase synthesis and duplex stability. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:2499–2505.
50. Knittel T, Picard D. PCR with degenerate primers containing deoxyinosine fails with Pfu DNA polymerase. *PCR Methods Appl* 1993; 2:346–347.
51. Fujiwara H, Fujiwara K, Hashimoto K. PCR with deoxyinosine-containing primers using DNA polymerases with proofreading activity. *PCR Methods Appl* 1995; 4:239–240.
52. Maher-Sturgess SL, Forrester NL, Wayper PJ, et al. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. *Viol J* 2008; 5:16.
53. Bracho MA, Garcia-Robles I, Jimenez N, et al. Effect of oligonucleotide primers in determining viral variability within hosts. *Viol J* 2004; 1:13.
54. Whiley DM, Sloots TP. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol* 2005; 34:104–107.

## 6 ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСОВ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОЧИПОВ

**Джулия Фокс**

Julie Fox, Department of Microbiology and Infectious Diseases,  
University of Calgary and Provincial Laboratory for Public Health  
(ProvLab), Calgary, Alberta, Canada

В этой главе рассматривается использование микрочипов для диагностики вирусных инфекций. В большинстве случаев диагноз при использовании подобных методов ставится на основании выявления таксономически близких групп вирусов или вирусов, вызывающих сходные симптомы. Для клинической практики может понадобиться анализ отдельного штамма или генотипа, его тоже можно сделать с помощью микрочипов. Мы на примерах покажем, как извлечь из результатов такого анализа максимум информации (помимо факта наличия вируса в пробе). Кроме использования для постановки диагноза, микрочипы применяют для изучения эффективности вакцин, исследования эпидемиологически связанных случаев и санитарно-эпидемиологического надзора.

Большая часть главы посвящена использованию микрочипов для выявления и анализа нуклеиновых кислот вирусов и их анализа, и метод уже используется в практической работе для ряда подобных задач, в то же время методики, основанные на микрочипах, могут применяться и для определения вирусных антигенов. В этой главе мы не касаемся микрочипов, предназначенных для изучения профилей экспрессии клеток хозяина при вирусной инфекции и экспрессии вирусных генов. Однако исследования, в которых микрочипы используют в таких целях, углубляют наше понимание механизмов вирусного патогенеза и выявляют новые потенциальные мишени для противовирусных препаратов. Важная область применения микрочипов — контроль качества вакцин, тем не менее она тоже лежит за пределами настоящей главы, поскольку метод здесь используется для анализа культуральных препаратов с высокими титрами.

В главе приведен не полный список литературы, а только ссылки на работы, в которых микрочипы успешно использовались для диагностики, или работы с детальным описанием методологии применительно к отдельному вирусу или группе вирусов, не упомянутых в настоящей главе.

### **ВВЕДЕНИЕ В МЕТОД МИКРОЧИПОВ**

Тесты, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, приняты в качестве золотого стандарта при диагностике многих вирусных инфекций и используются в качестве дополнения или замены традиционных методов. Несмотря на все преимущества этих методов, использование даже мультиплексных вариантов методов ампли-

фикации ДНК или РНК для диагностики патогенов, вызывающих сходную симптоматику, затруднено. Выполнение множества амплификаций крайне затратно, а из-за ограниченного объема образца может оказаться просто невозможно. Попытки создать поливалентный тест с использованием наборов праймеров и зондов в режиме реального времени не всегда успешны, так как в такой сложной смеси снижается эффективность амплификации. Один из способов увеличить эффективность метода определения нескольких патогенов в одном образце — разделить этапы амплификации и гибридизации с зондами или обнаружения целевого продукта другим методом. При таком подходе проще проводить диагностику нескольких патогенов без снижения чувствительности теста к каждой конкретной мишени. Это позволяет выявлять несколько патогенов за один анализ. Таким образом, индивидуальные тесты на анализ нуклеиновых кислот в реальном времени все чаще заменяются тестами с отдельными амплификацией и обнаружением продуктов. Микрочипы дают возможность обнаруживать целевые последовательности даже в очень сложных смесях нуклеиновых кислот. В таких тестах можно предусмотреть избыточность, в частности зонды к нескольким генам наиболее опасных (или даже всех) патогенов или зонды, обеспечивающие информацию по генотипам важнейших вирусов, таких как вирус гриппа (IFV), папилломавирус человека (HPV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и других высоковариабельных ДНК- и РНК-вирусов.

В самом начале своего развития микрочипы представляли собой адаптацию Саузерн-блота или дот-блота и были предшественниками методики линейных зондов и других способов высокочувствительной гибридизации. При Саузерн-блоте сложную смесь нуклеиновых кислот (без предварительной амплификации или с таковой) переносят на твердый носитель (нитроцеллюлозу или нейлон), после чего его обрабатывают смесью зондов. В современных микрочипах набор зондов (короткие олигонуклеотиды или кДНК) связан на подложке (на твердой поверхности или на поверхности суспендированных бусинок, как описано ниже), а целевые последовательности (чаще всего в форме продуктов ПЦР) затем наносят на микрочип.

Исходно «нуклеотидный чип» представлял собой анализ с помощью линейных зондов или блота, который в вирусологии использовался для исследования ВИЧ, вирусов гепатита В и С (HBV, HCV) и их генотипирования. Темин «микрочип» применяют, когда используется очень большое количество зондов, однако принципы, на которых основан метод микрочипов, в целом те же.

Микрочипами называют матрицы с расширенными возможностями регистрации или генотипирования большого числа вирусов. Чаще всего их применяют для определения множества вирусов (как в случае респираторных вирусных инфекций) или для детального генотипического анализа группы вирусов (как при выявлении и генотипическом анализе множества штаммов IFV).

## ФОРМАТЫ МИКРОЧИПОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

До самого недавнего времени использование микрочипов в клинической лабораторной диагностике было ограничено сложностью метода, его высокой стоимостью и недостаточной чувствительностью по сравнению с более традиционными тестами на нуклеиновые кислоты или тестами с детекцией в реальном времени. Многие исследователи показывали возможность применения микрочипов для регистрации продуктов амплификации при использовании в качестве исходного материала пробы культивируемых вирусов с высоким титром. Хотя при эпидемиологическом исследовании отдельного вируса или штамма перед амплификацией вирус культивируют, при диагностике пациентов задержка по времени и недостаточная чувствительность делают такой подход совершенно неприемлемым.

За последние несколько лет метод микрочипов претерпел ряд усовершенствований, которые сделали его более доступным; наряду с этим на основе микрочипов появились коммерческие наборы для диагностики и генотипирования. Основным преимуществом стала возможность применения метода непосредственно для анализа продуктов амплификации исходного образца без снижения специфичности или чувствительности по сравнению с другими методами.

Методы выявления и анализа различных вирусов описаны ниже. В табл. 6.1 собраны примеры основанных на микрочипах диагностических методик, а также протоколы и ссылки на литературу.

Для применения микрочипов в диагностике потребовались улучшения процедуры амплификации, методов введения меток, синтеза зондов и протоколов гибридизации.

### Методики амплификации и внесения метки

Целевые нуклеиновые кислоты перед нанесением на микрочип необходимо амплифицировать. В большей части диагностических методов для этой цели используют мультиплексную ПЦР. При анализе одного гена на микрочипах низкой плотности можно использовать обычные праймеры для ПЦР [32]. Методы неспецифичной амплификации дают наиболее широкий спектр целевых последовательностей и используются обычно с микрочипами высокой плотности [48, 51]. Одним из наиболее удачных считается комбинированный подход со случайными праймерами, позволяющими равномерно амплифицировать все нуклеиновые кислоты в пробе, и вирусспецифичными праймерами, делающими возможным насыщение пробы целевыми последовательностями вирусов при низкой вирусной нагрузке образца [56]. Для обеспечения максимальной чувствительности некоторые протоколы включают вложенную ПЦР [31, 32]. Концентрации праймеров можно подобрать так, чтобы смесь продуктов ПЦР обогатить кДНК, гибридизующейся с зондами [8, 41]. На 5'-конце одного из праймеров можно предусмотреть промоторную последовательность для РНК-

Таблица 6.1  
**Форматы анализа при помощи микрочипов и примеры протоколов, используемых для регистрации и анализа вирусов**

Формат микрочипа	Преимущества	Недостатки	Примеры протоколов		
			Целевой вид или группа вирусов	Применение	
Твердо-фазные микрочипы низкой и средней плотности (от десятков до сотен зондов)	Просты для разработки и реализации даже в неподготовленных лабораториях. Не требуют дорогого оборудования. Легко изменить и адаптировать под свои условия. Существуют коммерческие варианты метода, используемые при диагностике. Обычно дешевле тестов на нуклеиновые кислоты в реальном времени при анализе сложных образцов	Сложность стандартизации новых методов и сравнения результатов, полученных в разных лабораториях. Формат ограничивает количество целевых последовательностей в одной реакции	HRV	Выявление и генотипирование	[1–11]
			Вирусы крови	Выявление панели вирусов	[12]
				Анализ HBV	[13–15]
				Анализ HCV	[16, 17]
				Анализ ВИЧ	[17–20]
			Вирусы дыхательных путей	Выявление панели вирусов	[21–23]
				Анализ IFVA	[24–29]
				Анализ IFVB	[27, 28, 30]
				Анализ hCoV	[31]
				Анализ ADV	[32]
				Анализ хантавирусов	[33]
			Пикорнавирусы	Выявление и анализ EУ71 и СА16	[34]
			Патогены ЦНС	Выявление и анализ полиовирусов	[35]
Выявление и анализ панели вирусов	[36]				
Герпесвирусы	Выявление и определение	[37–39]			
	Генотипирование VZV	[40]			
Ортопоксвирусы и герпесвирусы	Выявление и определение	[41]			
Вирус кори	Анализ генотипов	[42]			
Вирусы ЖКТ	Выявление набора вирусов ЖКТ	[43]			
	Анализ норовируса	[43]			

Микроочипы высокой плотности (обычно несколько тысяч зондов, часто с последующим подтверждением секвенированием)	Позволяют анализировать гораздо больше целевых последовательностей. Способны выявлять новые варианты последовательностей. Единственный основной на использовании микрочипов метод. Современным регистрировать практически все возможные целевые последовательности	Чще всего дороги и не позволяют добавлять новые зонды. Требуется сложное программное обеспечение. Микроочипы высокой плотности часто имеют сниженную чувствительность при анализе перичных образцов. Крайне сложен контроль качества результатов метода для первичного диагноза	Широкий спектр вирусов Вирусы, которые возможно использовать для целей биотерроризма Вирусы из крови Респираторные вирусы	Анализ астровирусов Анализ ротавирусов Тестирование на широкий спектр вирусов Выявление широкого спектра вирусов Анализ вируса оспы Анализ ВИЧ Выявление широкого спектра вирусов Анализ IVFA и IVFB Анализ коронавирусов Анализ риновирусов	[43, 44] [45–47] [48–51] [52] [53] [19, 20, 54] [55–58] [50, 55, 56] [51, 59, 60] [51]
Прочные и 3D/4D микроочипы (менее 100 зондов)	Быстрая кинетика гибридизации. Потенциально очень чувствительны при увеличении количества зондов	Требуется специальное оборудование, несовместимого с микрочипами других типов. Не применяются для диагностики	Респираторные вирусы	Выявление и анализ IVFA Выявление и анализ IVFB	[61] [61]
Микроочипы в суспензии (не более 100 зондов)	Гибкая конструкция, упрощено добавление новых зондов	Требуется специального оборудования и программного обеспечения	HRV Респираторные вирусы	Выявление и генотипирование Выявление широкого спектра вирусов Анализ IVFA	[62–66] [67–74] [68, 69]
<p><i>Сокращения:</i> HRV — папилломавирус человека, ЦНС — центральная нервная система, HCV — вирус гепатита С, HBV — вирус гепатита В, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, IFV — вирус гриппа, hCoV — коронавирус человека, ADV — аденовирус, SA16 — коксакивирус А 16, E71 — энтеровирус 71</p>					

полимеразы. Включение такой последовательности позволяет готовить РНК-транскрипты для гибридизации на микрочипе [25, 26, 30]. Амплифицированные кДНК или РНК-транскрипты перед гибридизацией на чипе можно фрагментировать для облегчения связывания с зондами.

Метку можно вводить непосредственно в амплифицированный продукт в виде компонента праймера или при использовании меченого нуклеотидтрифосфата. Можно добавить метку во время вторичной реакции, специфичной к цепи — мишени для последующей гибридизации [68–71, 73], при втором раунде вложенной ПЦР [32] или при помощи химической реакции с РНК-транскриптами [40, 41]. Для повышения специфичности и для контроля количества добавляемой метки можно использовать два зонда: один как компонент микрочипа, служащий для захвата целевой последовательности, а второй — меченый — для выявления связавшейся ДНК на микрочипе [25–27, 30]. На чипе можно провести выявление однонуклеотидных полиморфизмов, иногда называемое мини-секвенированием, присоединяя меченые нуклеотиды в ходе реакции удлинения праймера [47]. Эффективность увеличивается при непрямом методе введения метки, например как в системах GreeneChip [50, 56]. В этом случае в гибридном зонде и целевой молекулы можно включить до 300 молекул метки. Большая часть меток при исследовании вирусов основана на флуоресценции (красители Cy5, Cy3) или хемилюминесценции (см. табл. 6.1), но могут быть использованы и простые колориметрические [24] методы или методы электрохимического определения метки [21].

### Подложки для микрочипов и синтез зондов

В качестве подложки для микрочипа может выступать нейлон, мембрана, стекло, силикон или полистирольные бусинки различного диаметра. Зонды для гибридизации могут представлять собой олигонуклеотиды или более длинные последовательности (такие как кДНК, амплифицированные при помощи ПЦР и клонированные фрагменты ДНК). Олигонуклеотидные зонды могут быть синтезированы на подложке или присоединены к ее поверхности после синтеза. В последнем случае для удержания зондов на поверхности может использоваться как простая адсорбция, так и более сложные электрические или химические методы.

Подбор зондов и условий гибридизации может допускать неполное спаривание, что позволяет обнаружить новые вирусы, варианты последовательностей или патогены, не представленные должным образом в базах данных последовательностей. Если доступны специфичные целевые последовательности, для подбора целевых участков можно использовать соответствующее программное обеспечение. В одном случае была разработана программа выявления ампликонов, позволяющая определять полный набор ампликонов для двух праймеров и заданной последовательности в формате FASTA [32]. Этот подход

использовали для анализа аденовируса при помощи микрочипов низкой плотности, но он может найти и более широкое применение при разработке методик анализа при помощи микрочипов.

### **Выявление нуклеиновых кислот при помощи твердофазных микрочипов**

Твердофазные микрочипы первыми стали доступны для диагностических лабораторий. В простейшем виде они представляют собой методики определения продукта при помощи линейных зондов и гибридизации для генотипирования ВИЧ, HCV, HBV и HPV. На твердый носитель в виде нейлоновой подложки или нитроцеллюлозной мембраны наносят зонды. Количество разных зондов ограничено пористым характером подложки. Твердофазные микрочипы могут быть использованы для диагностики некоторых вирусов, генотипирование которых важно при определении прогноза и стратегии лечения пациента. Необходимое для проведения анализа оборудование несложно, а получаемые результаты можно считать невооруженным глазом, например в случае коммерческих микрочипов для анализа HPV, показанных на рис. 6.1 [6].

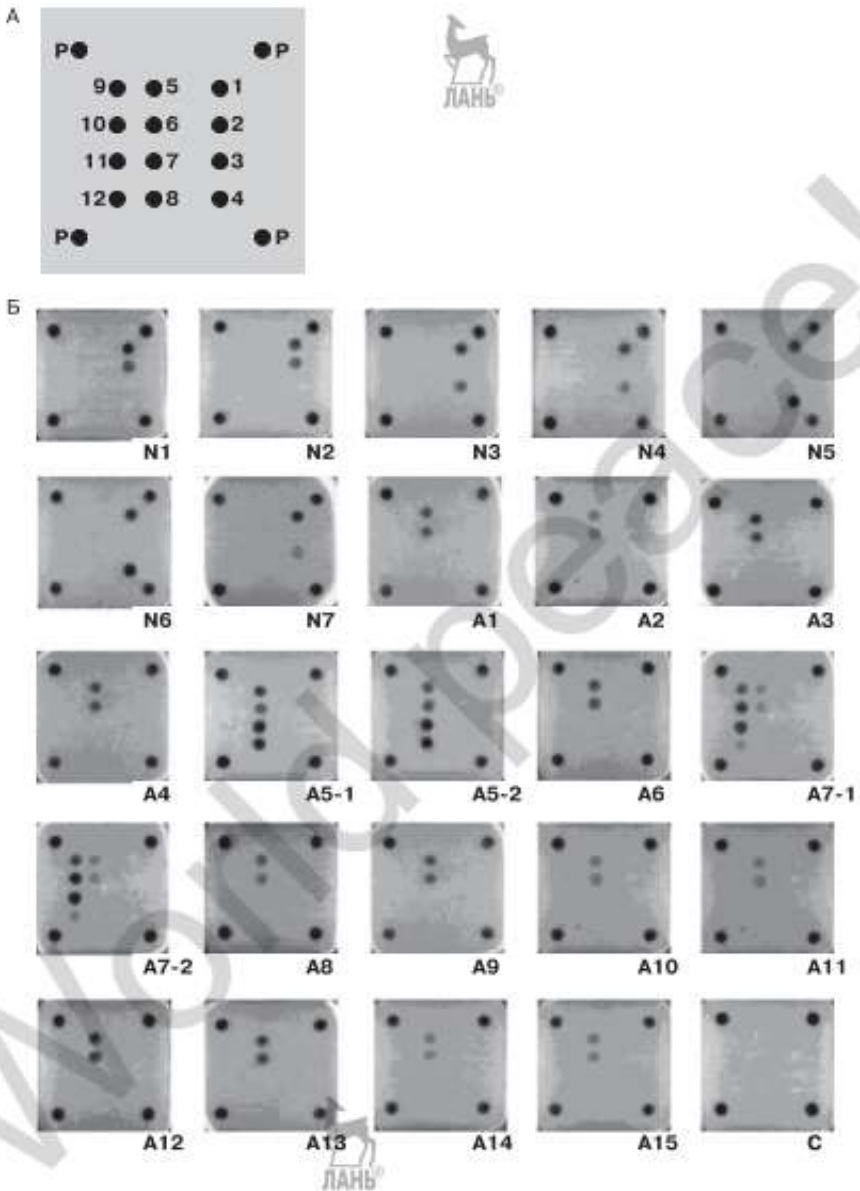
Зонды, связывающиеся со стеклом или любой другой непористой твердой подложкой, могут быть сравнительно большой длины. Возможно нанесение зондов в четкие неперекрывающиеся участки. Большая длина зондов обеспечивает широкий диапазон температуры гибридизации при анализе. В подобных системах в качестве твердого носителя чаще всего используется стекло, поскольку его активация для ковалентного связывания зондов весьма проста, а для гибридизации достаточно пробы небольшого объема. Такие микрочипы могут быть как изготовленными в лаборатории чипами низкой или средней плотности, так и чипами высокой плотности, выпускаемыми промышленно.

На рис. 6.2 показан пример простого твердофазного микрочипа для регистрации и определения двух важных зоонозных вирусов — вируса Ньюкаслской болезни (NDV) и вируса птичьего гриппа (AIV) [24]. В этом микрочипе использованы консервативные праймеры и зонды на основе последовательности гена матрикса (M) AIV и гена гемагглютинина (HA) разных подтипов AIV. Продукты ПЦР биотинилируют, применяя биотинилированные на 5'-конце праймеры. Каждый олигонуклеотидный зонд несет на конце 19 тимидинов, за которые он во время УФ-облучения прикрепляется к субстрату. Реакцию гибридизации производят при помощи коммерческих реагентов и связанной со стрептавидином щелочной фосфатазы для визуализации результатов. Результаты хорошо видны невооруженным глазом и не требуют дополнительного оборудования для выявления, что делает эту простую систему подходящей для обнаружения и типирования нескольких вирусов.

На рис. 6.3, А показан пример методики регистрации биотинилированных продуктов на полупроводниковом микрочипе, который





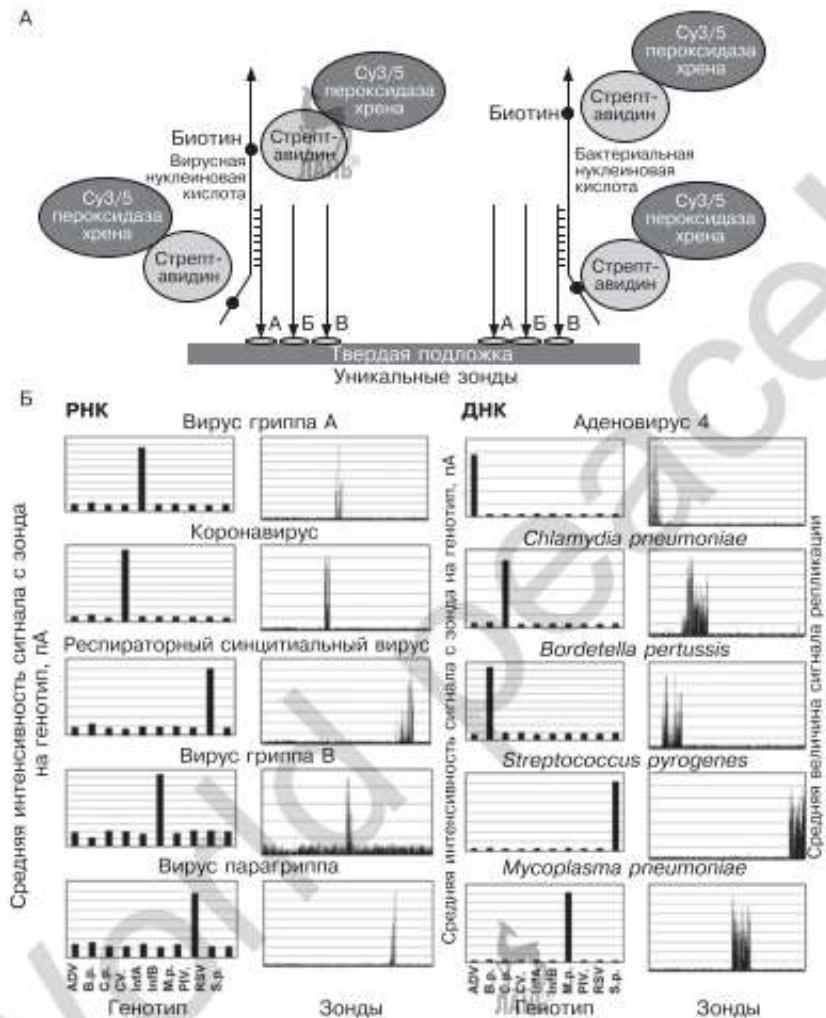


**Рис. 6.2.** Выявление и типирование вирусов Ньюкаслской болезни и птичьего гриппа при помощи олигонуклеотидного микрочипа. **(А)** Карта микрочипа. Каждая точка показывает положение зонда на чипе. Р — положительный контроль. **(Б)** Результаты выявления и типирования вируса Ньюкаслской болезни (NDV) штаммов 1–7. Подтипы агглютининов вируса птичьего гриппа обозначены А1—А15. Штаммы А5-1 и А5-2 — *Influenza/Chicken/Taiwan/1209/03* (H5N2) и *Influenza A/Black duck/New York/184/1988* (H5N2) соответственно. Штаммы А7-1 и А7-2 — *Influenza A/Mallare/Ohio/322/1998* (H7N3) и *DK/TPM/A45/03* (H7N7) соответственно. С — отрицательный контроль. С разрешения из [24]

может быть адаптирован для использования флуоресцентных меток или электрохимической детекции (ECD) [21]. Результаты, полученные для ECD вирусных или бактериальных продуктов на подобном микрочипе, показаны на рис. 6.3, Б [21]. Этот твердофазный микрочип сложнее приведенных на рис. 6.1 и 6.2 и содержит примерно 850 уникальных зондов (каждый представлен множественными репликатами). Система ECD использует ферментативные реакции для генерации электрических сигналов, которые считываются напрямую, без участия оптического оборудования и программ для анализа получаемых изображений. Для считывания результатов с подобных микрочипов используют систему ElectraSense<sup>®</sup> (CombiMatrix Corp.) с более 12 000 программируемых электродов, которая позволяет производить обнаружение и анализ вирусов с высокой производительностью.

Был разработан микрочип, содержащий наиболее консервативные области длиной в 70 нуклеотидов каждого секвенированного вирусного генома из GenBank [48, 49, 51, 59]. В сочетании с процедурой неспецифичной амплификации прототип этого микрочипа позволил выявить прежде не охарактеризованный коронавирус человека (hCoV) после культивации в культуре клеток материала пациента с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS) [59], а также был использован при последующем анализе вариабельности ассоциированного с SARS hCoV [60]. Различные версии этого микрочипа Virochip использовались для выявления всевозможных вирусных последовательностей (особенно респираторных вирусов), в том числе и дивергировавших от исходной последовательности. Чувствительность такого сочетания микрочипов и неспецифичной амплификации ниже, чем у индивидуальных тестов на обнаружение нуклеиновых кислот, однако применимость этого подхода была продемонстрирована при выявлении риновирусов в клинических образцах [51].

Для выявления широкого спектра патогенов был создан микрочип широкого спектра (GreeneChipPm) [50]. Этот микрочип содержал 29 455 60-нуклеотидных зондов к последовательностям вирусов позвоночных, бактерий, грибов и паразитов. В сочетании с процедурой неспецифичной амплификации он оказался мощным инструментом обнаружения широчайшего спектра патогенов. Авторы предлагают алгоритм с использованием сначала мультиплексной ПЦР для обнаружения предполагаемого возбудителя и затем микрочипа для более глубокого анализа. Для каждого семейства или рода было выбрано по меньшей мере три гена-мишени, один из которых был высококонсервативен, а два других — более вариабельны, что позволило идентифицировать как известные, так и мутантные патогены. Чувствительность метода составила около 10 000 копий последовательности ДНК-содержащего вируса (ADV) и 1900 копий генома респираторных РНК-вирусов. В более позд-



**Рис. 6.3.** (А) Методика регистрации олигонуклеотидных микрочипов для обнаружения вирусных и бактериальных последовательностей. Биотинилированная одноцепочечная мишень гибридизуется с комплементарным зондом на микрочипе (А, В или С), с ней соединяется связанная со стрептавидином (SA) пероксидаза хрена (HRP) (при электрохимической детекции) или краситель Су3/Су5 (при флуоресцентной детекции). (Б) Исследование респираторных патогенов с использованием олигонуклеотидного микрочипа с электрохимической детекцией. Показана средняя интенсивность сигнала для РНК-геномов (слева) и ДНК-геномов (справа) 10 патогенов верхних дыхательных путей. Генотип — средняя интенсивность сигнала. Зонды — средняя интенсивность сигнала 12 репликатов с каждого из зондов, положительных и отрицательных образцов. ADV — аденовирус, В. р. — *Bordetella pertussis*, С. р. — *Chlamydia pneumoniae*, CV — коронавирус, InfA — вирус гриппа А, InfB — вирус гриппа В, PIV — вирус парагриппа, RSV — респираторный синцитиальный вирус, S. р. — *Streptococcus pyogenes*. С разрешения из [21]

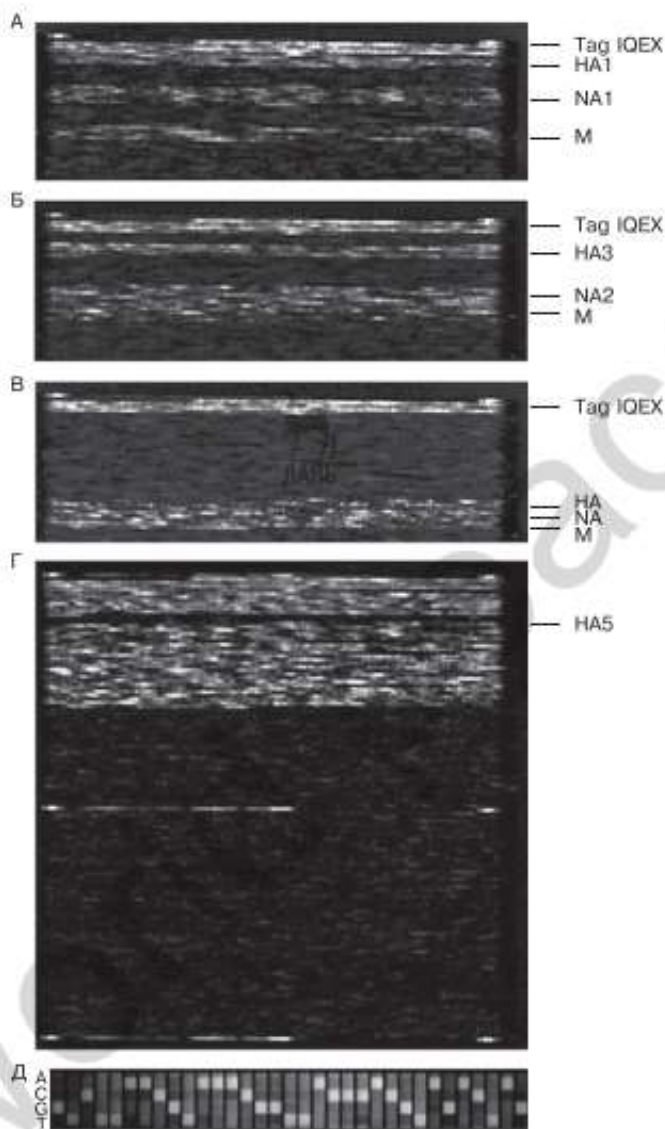
них вариантах системы был создан микрочип с 14 795 зондами для обнаружения респираторных вирусов и вируса гриппа (IFVA), чувствительность которого составила до 1000 копий целевой последовательности [56].

### Секвенирующие микрочипы

Секвенирующие микрочипы изначально были разработаны для высокопроизводительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов и генотипирования бактерий, они позволяют получать высококачественные данные части или всего генома патогена. При использовании для диагностики или эпидемиологических исследований вирусов такие микрочипы обычно входят в состав системы из сканера GeneChip®, блока для отмывки микрочипов (*fluidics station*), компьютера и программного обеспечения для анализа данных (фирмы Affymetrix). В чипах такого типа обычно используют короткие олигонуклеотидные зонды (менее 25 оснований). Потенциально методы с их использованием могут быть мощным инструментом идентификации и анализа патогенов, но при небольшой длине зондов любые вариации целевой последовательности приведут к потере сигнала. Технология секвенирующих матриц используется в вирусологической диагностике как для выявления широкого спектра патогенов, так и для анализа штаммов внутри семейства (см. ниже).

Секвенирующие микрочипы применяются в эпидемиологических исследованиях вспышек инфекций, а также для обнаружения новых вирусов. Этот подход также может быть использован для первичной диагностики, особенно в случаях, когда в качестве возбудителя выступает новый или мутировавший штамм вируса. При диагностике приходится регулярно переделывать чип, чтобы учесть варианты последовательности вируса. Существуют доказательства того, что сочетание секвенирующих микрочипов и неспецифичной амплификации может не обладать достаточной чувствительностью для прямого анализа клинических образцов, несмотря на данные, что чувствительность такого метода составляет от 10 до 1000 копий целевой последовательности [58]. Альтернативным подходом для исследования клинических образцов при помощи секвенирующего микрочипа может быть использование предварительной амплификации путем мультиплексной ПЦР [52, 58].

Примеры результатов, полученных при обнаружении и разделении штаммов IFV на секвенирующих микрочипах, приведены на рис. 6.4 [55]. Показана часть микрочипа, разработанного фирмой Affymetrix для выявления респираторных патогенов [57, 58], на которую нанесли продукты ПЦР с обратной транскрипцией. Помимо идентификации IFVA, с помощью этой процедуры можно получить информацию о последовательностях различных сезонных вирусов.



**Рис. 6.4.** Результаты гибридизации на микрочипе для анализа респираторных патогенов. **(А)** IFVA H1N1, **(Б)** IFVA H3N2, **(В)** IFVB и **(Г)** трехвалентная вакцина FluMist. На **А**, **Б** и **В** показаны только области, специфичные для IFV. Участки гибридизации и положительной идентификации показаны *справа*. На **Г** полностью изображен микрочип, *справа* показано только отсутствие гибридизации для H5. **(Д)** Увеличенный фрагмент приведенного на **Б** микрочипа как пример данных о последовательности, полученных при гибридизации неспецифично амплифицированных мишеней на микрочипе в районе, где были нанесены зонды на HA3. Читать слева направо. HA — гемагглютинин, NA — нейраминидаза, IQEX — внутренний положительный контроль гибридизации (Affymetrix), M — матрикс. С разрешения из [55]

## Проточные и 3D/4D микрочипы

Системы такого типа обладают важным преимуществом по сравнению с твердофазными микрочипами, поскольку позволяют изучать кинетику гибридизации в формате микрочипа и имеют потенциал для увеличения чувствительности, ускорения гибридизации и повышения емкости по зондам.

Высококачественная платформа трехмерных микрочипов Flow-thru Chip™ (Xceed Molecular, ранее MetriGenix) требует меньших количеств пробы и реагентов по сравнению с другими системами. Эта коммерческая платформа успешно применялась для диагностики IFV; была показана возможность применения этой системы для обнаружения и анализа типов, подтипов и штаммов IFVA в ходе одной реакции.

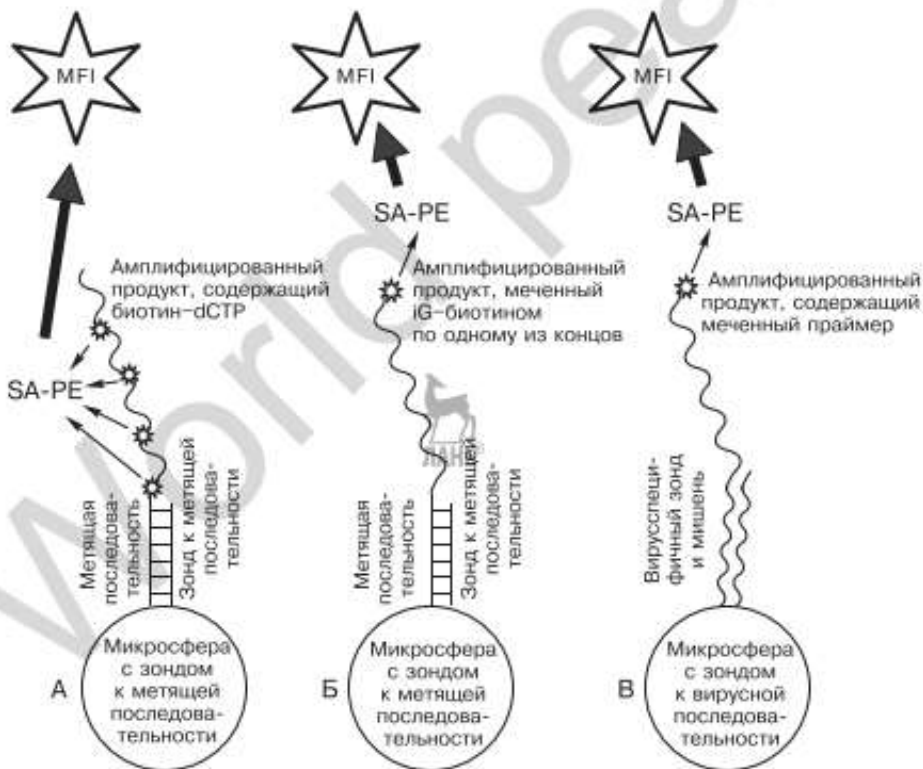
BioFilmChip™ (Autogenomics) представляет собой новый микрочип, построенный на основе пленки, состоящей из нескольких слоев гидрогеля, что дает в результате трехмерную матрицу. При комбинировании этого микрочипа с оборудованием высокой степени автоматизации (INFINITI™ Analyzer) был создан проточный метод со свободным доступом, объединивший обработку образца, гибридизацию и анализ результатов. Установка имеет встроенные конфокальный микроскоп с двумя лазерами и термостат, позволяющий денатурировать гибридизовавшиеся нуклеиновые кислоты для аллель-специфичного удлинения праймеров. У этой технологии высокий потенциал для использования в диагностике в силу высокой степени автоматизации. Методики диагностики вирусов этой системой применяют для обнаружения широкого спектра респираторных вирусов и выявления и генотипирования HPV (пока только для исследовательских целей).

## Суспензионные микрочипы

Микрочипы такого типа используют для регистрации продуктов амплификации технологию Luminex® xMap™, основанную на суспензии конъюгированных с зондами микросфер. Для суспензионных микрочипов характерны быстрая кинетика связывания, гибкость при разработке анализа, а также низкая стоимость. В этом методе используются полистирольные микросферы, меченные флуоресцентными красителями с разными спектральными характеристиками. Изначально было доступно менее 100 различных микросфер, но их количество растет. Систему Luminex® можно использовать для обнаружения самых различных молекул. В случае диагностических тестов с микросферами конъюгированы олигонуклеотидные зонды, а смесь микросфер используется для регистрации и разделения продуктов амплификации. Чтобы установить принадлежность микросфер к тому или иному классу, а также установить наличие связавшихся продуктов, предварительно меченных в ходе реакции амплификации, микросферы в анализаторе Luminex® облучают двумя лазерами. Применяемое при этом оборудование может быть использовано как для

анализа коммерческих суспензионных микрочипов, так и для разработки собственных методик. Технология Luminex<sup>®</sup> отличается высокой пластичностью: для добавления новых микросфер не требуется изготавливать целый новый микрочип (как в случае твердофазных микрочипов высокой плотности). Этот метод также широко применяется для выявления полиморфизмов в геномах человека или различия штаммов многих патогенов.

Микрочип xTAG<sup>™</sup> Respiratory Virus Panel (Luminex Molecular Diagnostics) представляет собой чувствительный инструмент для определения целого ряда штаммов и подтипов респираторных вирусов. Это первый микрочип такого типа, одобренный FDA. Для использования с анализатором Luminex<sup>®</sup> были разработаны еще две коммерческие системы анализа респираторных вирусов (см. ниже раздел, посвященный респираторным вирусам). Сравнение методик, использующих систему суспензионных микрочипов Luminex, приведено на рис. 6.5. Способы введения и выявления метки для этих методик



**Рис. 6.5.** Пример схемы детекции в суспензионных микрочипах для диагностики респираторных вирусов. **(А)** xTAG<sup>™</sup> (Luminex Molecular Diagnostics). **(Б)** MultiCode<sup>®</sup> PLx (EraGen). **(В)** ResPlex I и II (Qulagen Molecular Diagnostics). MFI — средняя интенсивность флуоресценции, SA-PE — стрептавидин—фикоэритрин



различаются, однако основные принципы в целом одни и те же. Амплификация высокомультиплексная, и в ходе ее цель биотинилируют (ResPlex, Quiagen) [67, 72, 74], либо же это происходит на следующей стадии специфичного удлинения цепи (Luminex RVP [68, 69] и EraGen RMA/MultiCodePLx [70, 71, 73]). Специфичность введения метки обеспечивается либо удлинением со второго праймера (Luminex RVP [68, 69] и EraGen RMA/MultiCodePLx [70, 71, 73]), либо наличием специфичного зонда на микросфере (ResPlex, Quiagen) [67, 72, 74]. Принципы этих методов, вне всякого сомнения, лягут в основу анализа других мишеней или обнаружения широкого спектра патогенов различных групп. В частности, уже был разработан и внедрен в практику метод генотипирования HPV с использованием суспензионных микрочипов [62–66].

### Универсальные микрочипы

Создание новых зондов для микрочипов, учитывающих изменившиеся задачи или новые научные данные, дорого и трудно. Универсальные микрочипы используют стандартные последовательности, комплементарные включаемым в целевой продукт в ходе реакций амплификации — неспецифичным к мишени участкам последовательности (например, на 5'-конце) одного из праймеров. Преимущества такого метода заключаются также в возможности точного подбора условий гибридизации и в отсутствии необходимости учета вариабельности целевых последовательностей при разработке зондов. Также использование универсального микрочипа позволяет детектировать разные целевые последовательности без замены зонда. Универсальные микрочипы были использованы в суспензионных микрочипах для обнаружения респираторных вирусов [68–71, 73]. При анализе мутаций и изменений последовательности РНК-вирусов они при меньшей стоимости более эффективны, чем секвенирующие микрочипы.

### ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ПРИМЕНЕНИИ МИКРОЧИПОВ

Некоторые тесты для определения нуклеиновых кислот, основанные на использовании микрочипов, уже прошли сертификацию регулирующими органами (FDA, Health Canada, CE Mark). Необходимо дальнейшее совершенствование методик оценки результатов, получаемых при помощи микрочипов, поскольку диагностические тесты на их основе появляются все чаще. Для упрощения интерпретации результатов клинических исследований следует сравнивать результаты, полученные с помощью микрочипов, с диагностическими тестами, основанными на других принципах (особенно индивидуальные и мультиплексные тесты для всех мишеней), по параметрам чувствительности и специфичности. Большое количество разработанных форматов теста означает, что каждая лаборатория может выбрать среди них подходя-

ций по таким параметрам, как чувствительность, степень автоматизации, продолжительность анализа, производительность и выявляемые патогенные организмы. Регулирование применения диагностических тестов соответствующими структурами вполне возможно приведет к дальнейшему расширению возможности их использования. Основными конкурентами микрочипов выступают высокопроизводительное секвенирование и амплификация, совмещенная с определением множества продуктов путем, к примеру, капиллярного электрофореза.

## **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И ПРОВЕРКА ПОЛУЧАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ множества различных целевых последовательностей при помощи микрочипов особенно сложен для контроля качества и проверки результатов. Если микрочип изготовлен промышленным способом, следует контролировать наличие и положение зондов. Контроль качества микрочипов должен осуществляться тестовой лабораторией, поскольку для любого микрочипа, за исключением простейших, эта процедура крайне трудоемка. Для обеспечения воспроизводимости необходимо контролировать процедуры отбора и хранения проб, амплификации целевых последовательностей и введения меток. Ранее во многих диагностических лабораториях каждую целевую последовательность в каждом раунде теста сопровождали контролем. Для микрочипов это трудно реализовать, поэтому был разработан компромиссный вариант. В различные коммерческие тесты производители включают внутренний контроль, позволяющий оценить эффективность подготовки и амплификации образцов. Для контроля чувствительности возможно тестирование нескольких чипов из партии с панелью выявляемых патогенов. После этой проверки диагностические лаборатории разрабатывают индивидуальные стратегии применения достаточного количества контролей для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов. Для облегчения выполнения внутрилабораторного контроля качества вирусных микрочипов высокой сложности рядом организаций были разработаны специальные рекомендации (Diagnostic Nucleic Acids Microarrays: Approved Guideline MM12-A, Clinical and Laboratory Standards Institute).

## **ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ**

В большинстве случаев при применении микрочипов в вирусологической диагностике решается задача, требующая обнаружения широкого спектра целевых последовательностей. Тесты на нуклеиновые кислоты становятся неотъемлемой частью скрининга донорской крови и трансплантируемых органов; в этой области и микрочипы могут найти самое широкое применение. Изначально большая часть работ, посвященных использованию микрочипов для обнаружения вирусов,

была проведена на респираторных вирусах, поскольку именно дыхательная система подвержена различным бактериальным и вирусным инфекциям со сходной симптоматикой. Аналогичная ситуация наблюдается и для патогенов центральной нервной и пищеварительной систем — при применении методик, способных регистрировать широкий спектр целевых последовательностей стратегия диагностики вызываемых ими заболеваний значительно упростится. Приведенные ниже примеры включают в себя как полностью коммерческие методы, так и методы, адаптированные непосредственно в лаборатории для обнаружения возбудителей вирусных заболеваний.

### **Скрининг вирусов в крови**

Микрочипы могут применяться для скрининга крови и отдельных ее составляющих на наличие вирусов. Чтобы показать возможность использования методики, был разработан твердофазный олигонуклеотидный микрочип, предназначенный для обнаружения продуктов амплификации геномов ВИЧ, HBV и HCV [12]. Методика оказалась очень чувствительной и продемонстрировала способность обнаруживать 1–20 международных единиц каждой целевой последовательности даже в сложных смесях.

### **Обнаружение респираторных вирусов**

Микрочипы использовали для обнаружения различных респираторных вирусов (иногда наряду с бактериями). Такие микрочипы должны позволять введение дополнительных мишеней по мере идентификации новых патогенов. Некоторые недавно открытые вирусы еще не вошли в коммерческие микрочипы, например человеческие полиомавирусы WU и KI.

#### *Методики, основанные на твердофазных микрочипах*

Изначально для обнаружения респираторных патогенов было предложено использовать мультиплексную ПЦР совместно с микрочипами. Матрицы низкой плотности дали прекрасные результаты при обнаружении 14 респираторных вирусов с чувствительностью, сопоставимой с таковой для каскадной ПЦР [23]. На рис. 6.3, А показан пример методики обнаружения респираторных патогенов с использованием микрочипов средней плотности, выполненной на основе полупроводников, которую можно совместить с введением флуоресцентной метки или с электрохимическим детектором. Эффективность такого подхода была продемонстрирована на примере патогенов верхних дыхательных путей (девять видов вирусов и четыре вида бактерий) [21].

Гибридизация на твердофазном микрочипе высокой плотности неспецифично амплифицированных фрагментов из культивированных агентов или образцов, взятых из респираторного тракта, также показала хорошие результаты [48, 50, 56]. Эти сообщения свидетельствуют

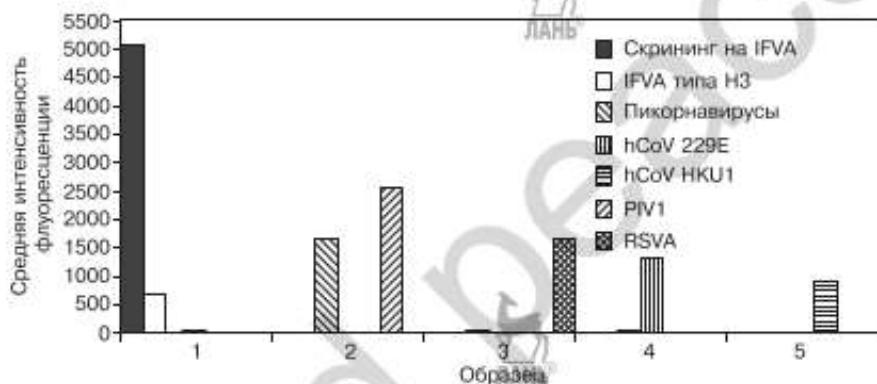
о том, что при синдромном подходе к диагностике заболеваний методики, основанные на использовании микрочипов, могут быть весьма полезны и способны приблизить создание подходов, регистрирующих подавляющее большинство патогенов за один цикл анализа. Чувствительность таких чипов (GreenChip и VeroChip) в сочетании с неспецифичной ПЦР-амплификацией достаточна для прямого обнаружения некоторых вирусов в клинических образцах, но она ниже, чем у индивидуальных тестов [56]. Обнаружение широкого спектра вирусов при помощи микрочипов высокой плотности прекрасно подходит для выделения новых вирусов (особенно из вирусных культур), однако не может быть основным методом диагностики в силу непрекращающихся споров вокруг чувствительности, а также высокой стоимости анализа.

Оригинальные методики с применением секвенирующих матриц тоже включают стадию неспецифичной амплификации. Однако было доказано, что наибольшей чувствительностью обнаружения патогенов в клинических образцах обладает сочетание секвенирующего микрочипа и специфичной мультиплексной ПЦР [57, 58]. Этим методом при помощи чипа, несущего зонды к 57 генам 26 респираторных патогенов, удалось идентифицировать вирусы до штамма. Секвенирующие матрицы применяют также для более детального анализа респираторных вирусов, как описано ниже.

#### *Методики, основанные на суспензионных микрочипах*

В коммерческих методиках выявления респираторных вирусов используется мультиплексная амплификация в сочетании с суспензионным микрочипом Lumiplex® [67–74]. В одном из предложенных протоколов продукты мультиплексной ПЦР различают при помощи зондов, связанных с различными микросферами [67, 72, 74]. Альтернативный подход включает мультиплексную ПЦР с последующим специфичным удлинением праймера и введением метки. Каждый специфичный праймер, используемый на стадии введения метки, несет специфическую последовательность. Именно эти последовательности используются в определении продуктов амплификации в универсальных суспензионных микрочипах [68–71, 73]. Таким образом, одно из главных различий между этими двумя методами заключается в использовании в одном случае специфичной гибридизации [67, 72, 74], а в другом — меток, полученных при удлинении праймера [68–71, 73]. Набор MultiCode-PLx (EraGen) основан на новом подходе, упрощающем этапы амплификации и введения метки [70, 71, 73]. Исследование всех трех видов методик с применением суспензионных микрочипов показало, что они имеют хорошую специфичность и чувствительность, сопоставимую с таковыми для иммунологических и культуральных методов. Самая быстрая на сегодняшний день — методика MultiCode PLx производства EraGen для выявления респираторных вирусов производства EraGen, однако любая из них позволяет получить результат за 8-часовую рабочую смену (включая

выделение нуклеиновых кислот). Большая часть опубликованных на сегодняшний день сообщений о клиническом применении была получена для чипа xTAG™ для респираторных вирусов, использующего формат Lumindex. Этот диагностический набор прошел сертификацию FDA и Health Canada и имеет маркировку CE. Методику довольно просто освоить и сделать стандартной процедурой для диагностической лаборатории. Примеры результатов, полученных при помощи некоторых основанных на микрочипах методов, приведены на рис. 6.6 (исходные данные и их интерпретация показаны в табл. 6.2). Точно различить положительные и отрицательные результаты можно по средней интенсивности флуоресценции (MFI). Методика включает также упрощающий анализ программный пакет.



**Рис. 6.6.** Результаты, полученные для проб из дыхательных путей, анализированных при помощи системы Lumindex xTAG™ для респираторных вирусов. Показаны результаты для пяти образцов. За пороговое значение принято значение средней интенсивности флуоресценции, равное 150; все превышающие пороговое значение результаты трактовали как положительные, все ниже его — как отрицательные. Исходные данные и их интерпретация приведены в табл. 6.2. IFV — вирус гриппа, hCoV — коронавирус человека, PIV — вирус парагриппа, RSV — респираторный синцитиальный вирус

### *Интерпретация результатов, полученных при использовании микрочипов при регистрации респираторных вирусов*

Возможность анализировать образцы на присутствие нескольких респираторных вирусов позволила более детально исследовать частоту смешанных вирусных инфекций [72]. Большинство лабораторий предпочитает сообщать обо всех выявленных вирусных инфекциях, однако при увеличении числа целевых вирусов в микрочипах становится все более очевидным, что множественные инфекции очень распространены. Неясно, ведут ли множественные инфекции к более тяжелым последствиям или же просто отражают состояние исследуемого пациента.

Таблица 6.2

Результаты анализа полученных из дыхательных путей образцов с помощью системы Lumiplex xTAG™ для респираторных вирусов

Образец	Средняя интенсивность флуоресценции							Интерпретация результата
	hCoV 229E	hCoV HKU1	Пикорна-вирусы	IFVA типа H3	Скрининг на IFVA	PIV3	RSVA	
1	41,0	20,0	0,0	715,0	5083,0	8,0	7,0	IFVA типа H3
2	18,5	1,0	1675,0	5,5	14,0	2544,0	1,0	Пикорнавирус/PIV3
3	18,0	18,0	50,0	0,5	25,0	22,0	1690,0	RSVA
4	1324,5	0,0	44,0	27,0	13,0	6,0	12,0	hCoV 229E
5	13,5	906,0	0,0	29,0	3,0	23,0	21,0	hCoV HKU1

Приведены исходные данные и интерпретация результатов для пяти образцов с рис. 6.6. Средняя интенсивность флуоресценции для каждой цели в каждом из образцов однозначно лежала выше или ниже порогового значения (150), что позволяло легко интерпретировать результаты. Сокращения, как на рис. 6.6

## Вирусные инфекции центральной нервной системы

Несмотря на то что в диагностике все чаще используют микрочипы, позволяющие выявлять возбудителей вирусного менингита, энцефалита и других заболеваний ЦНС, большая часть вирусных инфекций ЦНС остается неизвестной. Как предполагается, это связано с тем, что многие патогены вызывают сходные симптомы, а также с ограниченным количеством спинномозговой жидкости, доступной для анализа на отдельные возбудители. Многие лаборатории перешли на выявление множества вирусов в одиночном тесте, что неизбежно ведет к использованию мультиплексных методик. В одном из исследований использование твердофазного микрочипа низкой плотности для выявления 13 возбудителей энцефалитов и менингитов показало хорошие результаты в сравнении с полученными при помощи одиночной ПЦР [36].

## Выявление и дифференциация герпесвирусов

Герпесвирусы — важная причина заболеваний ЦНС и прочих осложнений у пациентов с ослабленным иммунитетом. Для выявления и дифференциации герпесвирусов человека применялись технологии на основе микрочипов. Олигонуклеотидные микрочипы низкой плотности использовали для выявления семи герпесвирусов после предварительной амплификации с помощью мультиплексной ПЦР. Метод был успешно применен для спинномозговой жидкости и крови [37–39].

## **Выявление и дифференциация поксвирусов и герпесвирусов**

В качестве мер по предотвращению биотерроризма были разработаны методы распознавания возбудителей инфекций, среди которых вирус натуральной оспы. Сконструирован твердофазный микрочип низкой плотности, позволяющий дифференцировать ортопоксвирусы, а также отличать инфекции, вызванные поксвирусами, от инфекций, вызванных вирусом простого герпеса типов 1 и 2 или вирусом ветряной оспы [41]. Амплификацию производили при помощи мультиплексной асимметричной ПЦР, что позволяет увеличить количество целевой ДНК. Перед гибридизацией на микрочипе в одноцепочечную ДНК вводили метку  $Cy3$  или  $Cy5$ .

## **Вирусные инфекции желудочно-кишечного тракта**

Огромное разнообразие циркулирующих норовирусов и астровирусов делает необходимым мультиплексный подход при их детекции и анализе. Был разработан метод на основе микрочипов, позволяющий выявлять астровирусы и норовирусы [43]. Дальнейшее совершенствование анализов широкого спектра для диагностики вирусных гастроэнтеритов будет, судя по всему, включать разработку методов выявления ротавирусов, саповирусов и различных серотипов ADV, вызывающих желудочно-кишечную симптоматику.

## **АНАЛИЗ СЕРОТИПОВ, ВАРИАНТОВ И ГЕНОТИПОВ ВИРУСОВ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОЧИПОВ**

Олигонуклеотидные микрочипы имеют большой потенциал в идентификации неизвестных ранее вирусов и анализе разнообразия различных вирусов на уровне штаммов и кластеров. Для многих вирусных инфекций дополнительная информация, получаемая при типировании, играет важную роль при определении состояния пациента и разработке стратегий терапии.

## **Дифференциация типов папилломавируса человека**

Папилломавирусная инфекция связана с повышенным риском развития злокачественных изменений эпителия цервикального канала. Несмотря на то что методы на основе микрочипов не являются необходимыми при скрининге HPV, они могут потребоваться для оценки риска развития карциномы шейки матки у отдельной пациентки на основании генотипических и эпидемиологических исследований. В связи со все более широким внедрением вакцин против HPV необходим непрерывный мониторинг соотношения циркулирующих типов вируса, это позволит быстро реагировать на смену доминирующего варианта инфекции.

Для типирования HPV были разработаны микрочипы разного формата. Среди них коммерческие линейные микрочипы, на которых оли-

гонуклеотидные зонды для детекции продуктов ПЦР-амплификации различных серотипов располагаются друг за другом (см. рис. 6.1) [1–6]. Число типов HPV, которое позволяет анализировать этот чип, постоянно возрастает. Была продемонстрирована применимость для этой цели чипа PathogenMip, несущего 24 зонда против наиболее значимых генотипов HPV, связанных с развитием рака шейки матки; для сравнения использовали микрочип низкой плотности [7]. Разработанные в отдельных лабораториях микрочипы низкой плотности показали себя эффективными для выявления одиночных и множественных инфекций HPV [8–10]. Определение различных типов HPV при помощи твердофазных микрочипов было построено на основе интегрального фотодиодного чипа, позволяющего регистрировать биотинилированные продукты амплификации с использованием проявления серебра, опосредованного наночастицами золота [11]. Микрочип оказался эффективным и потенциально может снизить стоимость анализов, поскольку напрямую регистрирует гибридизацию по сигналу каждого фотодиода, что позволяет отказаться от использования дорогостоящих сканеров.

Для практикующего врача важно правильно и быстро диагностировать HPV, поэтому были разработаны и другие методы генотипирования этого вируса при помощи микрочипов. Среди них автоматизированные твердофазные (Autogenomics) и суспензионные (основанные на системе Lumiplex<sup>®</sup>) микрочипы [62–66]. Тесты на выявление нуклеиновых кислот остаются единственным инструментом регистрации и анализа HPV. В связи с этим требуются дополнительные исследования для обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов, получаемых различными лабораториями с применением различных микрочипов. Поскольку коммерческие наборы должны проходить сертификацию, микрочипы могут облегчить стандартизацию методов генотипирования HPV при проведении эпидемиологических исследований.

### **Анализ гематогенных вирусов при помощи микрочипов**

При разработке стратегии лечения пациентов, инфицированных HBV, HCV и ВИЧ, важна информация о генотипе возбудителя и наличия мутаций, связанных с устойчивостью к противовирусным препаратам. Наиболее распространенным методом идентификации генотипов и различий в геномных последовательностях гематогенных вирусов остаются линейные матрицы. По мере расширения спектра известных механизмов лекарственной устойчивости может возникнуть необходимость пересмотра формата микрочипов.

#### *Анализ HBV*

Линейные матрицы остаются наиболее распространенным методом анализа мутаций HBV [13, 14]. Недавно показана применимость модифицированного формата линейных микрочипов для регистра-



ции расширенного набора мутаций, ассоциированных с устойчивостью вируса, по 11 положениям области RT гена полимеразы (Innogenetics). Несмотря на то что результаты, полученные этим методом, в целом совпали с результатами прямого секвенирования, чувствительность для некоторых позиций оказалась недостаточной [15].

### Анализ HCV

Генотипирование HCV играет важную роль в выборе стратегии лечения и предсказании исхода заболевания. Такое генотипирование чаще всего осуществляется диагностическими лабораториями при помощи линейных матриц или процедур на основе секвенирования: (различные методики, основанные на ПЦР, например типоспецифичная ПЦР, распространены не меньше. — *Прим. ред.*) Наиболее распространенной мишенью служит 5'-некодирующая область, именно этот ампликон чаще всего анализируют в различных диагностических тестах [16]. Хотя эта область удобна при определении генотипа методом линейных микрочипов, для точного определения подтипов требуются данные и о других областях генома [16, 17]. Однако для анализа нескольких генов HCV микрочипы не получили пока широкого применения.

### Анализ ВИЧ

Анализ мутаций, ответственных за развитие антиретровирусной устойчивости, важен при планировании лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. В настоящее время большинство лабораторий решают эту задачу прямым секвенированием, хотя существуют линейные матрицы, определяющие мутации в генах ревертазы и протеазы [18–20] и разрабатываются микрочипы, позволяющие определять широкий спектр детерминант устойчивости [17, 19].

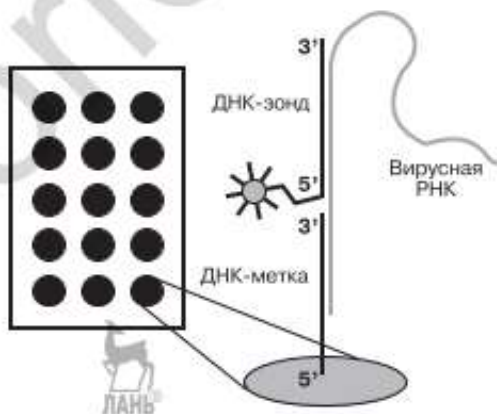
Одним из первых коммерческих микрочипов стал чип Affymetrix GeneChip HIV высокой плотности, доступный для клинических и исследовательских лабораторий [54]. Метод основан на секвенирующей матрице с 16 000 уникальных зондов, комплементарных генам ревертазы и протеазы. В одном исследовании проведено сравнение эффективности линейного чипа (Innogenetics) и секвенирующего чипа GeneChip при генотипировании образцов вируса из плазмы крови пациентов, не получавших лечения, и пациентов, подвергавшихся противовирусной терапии [20]. Методики дали хорошее совпадение результатов по анализируемым кодонам. Несмотря на то что у каждого пациента результаты немного варьировали, оба метода оказались способны выявлять клинически значимые мутации в анализируемых генах. Тем не менее для обеспечения точного типирования отдельных штаммов вируса типа В требуется дальнейшее повышение чувствительности и проверка результатов, получаемых при помощи GeneChip.

## Анализ и надзор за респираторными вирусами при помощи микрочипов

### Определение подтипов и штаммов IFV

Микрочипы использовали для детального типирования IFV, определения подтипов и штаммов, что может быть важно для прогноза эпидемиологических событий и появления новых вирусов человека. Был разработан микрочип низкой плотности с зондами на четыре различных гена гемагглютинина, три гена нейраминидазы и два гена М вирусов гриппа А и В. Клоны кДНК длиной 500 п. н. присоединяли к стеклянной подложке при помощи ковалентного связывания с 5'-амино-меткой; продукты ПЦР, предназначенные для гибридизации на микрочипе, метили красителями Cy3 и Cy5. Этот метод относится к тем ранним методам, на примере которых была показана применимость подобного подхода для обнаружения и анализа IFV [28]. На рис. 6.2 показан удачный вариант твердофазного микрочипа низкой плотности, использованного для регистрации и разделения подтипов AIV [24]. Этот чип нашел широкое распространение в скрининговых исследованиях, однако применялся в основном для анализа вирусов, предварительно культивированных на куриных эмбрионах.

Чаще всего генотипирование IFVA включает прямой анализ генов гемагглютинина и нейраминидазы; такой анализ производят независимо от неспецифического выявления всех вариантов IFVA на основании консервативных участков генома. Один из вариантов микрочипа низкой плотности, распознающей ген М, был использован для надзора за вирусами и определения их подтипа [25]. Пример использования этого метода для обнаружения фрагментированной вирусной РНК по-



**Рис. 6.7.** Метод гибридизации, использованный для выявления и определения IFV. Не несущая метки вирусная РНК гибридизуется с ДНК-зондом на микрочипе; успешность гибридизации регистрируют на второй стадии с применением красителя Quasar Q570, связанного с ДНК-меткой. Пример получаемых таким способом результатов показан на рис. 6.8. С разрешения из [30]

казан на рис. 6.7. Для интерпретации результатов была разработана нейронная сеть [25]. Несмотря на то, что MChip может быть неоптимальным методом распознавания новых рекомбинантных вирусов, он полезен для упрощенного надзора в сочетании с предложенными этой же группой микрочипами для мониторинга дрейфа генов гемагглютинина и нейраминидазы [27]. Микрочипы при совмещении с методами амплификации и регистрации продуктов могут применяться для мониторинга устойчивости к противовирусным препаратам. Этот подход был реализован для двух наиболее распространенных мутаций в гене M2, ассоциированных с устойчивостью к адамантанам: V27A и S31N [29].

Секвенирующие матрицы показали высокую специфичность при регистрации и анализе культивированного IFVA, в том числе и при определении подтипов. Тем не менее вполне очевидно, что чувствительность методов амплификации, совмещенной с микрочипами, недостаточна для прямого анализа клинических образцов и необходимы дальнейшие модификации методики. Секвенирующие микрочипы успешно применяются для отслеживания генетической изменчивости вируса гриппа и могут быть полезны для унификации методов разработки вакцин [55].

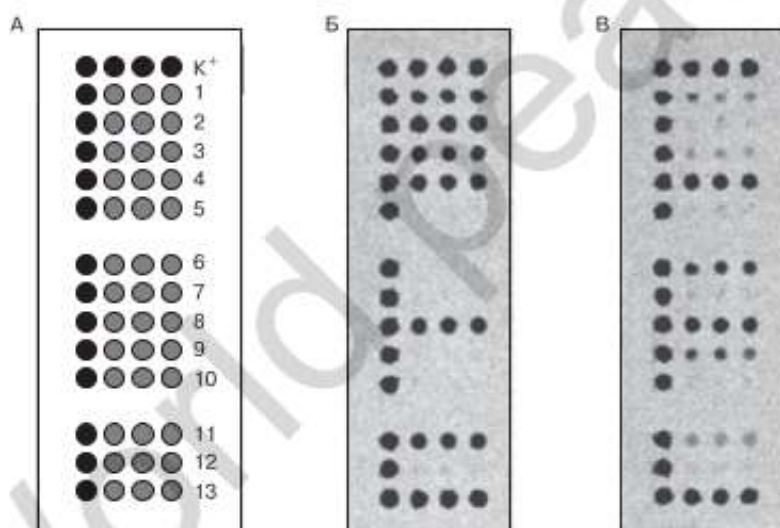
Совмещение олигонуклеотидного микрочипа высокой плотности GreeneChipResp с амплификацией облегчило разделение IFVB и IFVA и подтипов IFVA по генам гемагглютинина типов 1–16 и генов нейраминидазы типов 1–9 [56]. Использование модифицированных праймеров позволило повысить чувствительность метода при определении и типировании IFV в клинических образцах по сравнению с неспецифичной амплификацией и приблизить ее к показателям индивидуальных тестов в реальном времени. Треть из 14 795 нуклеотидов на этом микрочипе предназначена для определения подтипов IFVA, что позволяет ему быть наиболее полезным на сегодняшний день микрочипом для определения нового (потенциально пандемического) варианта вируса. Чувствительность метода составила 1000 копий вирусного генома на образец.

Для определения типов и подтипов IFV был разработан микрочип Flow-Thru Chip (Xceed molecular, ранее MetriGenix) [61]. Олигонуклеотидные зонды здесь иммобилизованы в капиллярах силиконового чипа. Зонды предназначены для регистрации последовательностей гена M и подтипов H1, H3, H5 и N1 и N2 генов гемагглютинина и нейраминидазы. Биотинилированные ампликоны, полученные при помощи неспецифичной или мультиплексной ПЦР гибридизуются с иммобилизованными зондами и обнаруживаются системой регистрации, использующей хемилюминесценцию.

## Идентификация штаммов вируса гриппа B

Множество методик, направленных на выявление вируса IFVA, применимо и к обнаружению IFVB. Тем не менее лишь немногие методи-

ки позволяют получить информацию относительно штаммов и вариантов IFVB; в числе этих методик — микрочипы низкой и высокой плотности и секвенирующие микрочипы. Поскольку только часть вариантов IFVB в настоящее время включена в состав сезонной трехвалентной инактивированной вакцины, данные о происхождении IFVB могут быть важны для изучения эффективности такой вакцины. Одна из частей микрочипа низкой плотности, предназначенного для определения IFV, позволяет различать клинически значимые варианты IFVB. Микрочип основан на методике, показанной на рис. 6.7. На рис. 6.8 продемонстрированы результаты, полученные при помощи этой методики при разделении вариантов Yam88 и Vic87 с применением зондов к последовательностям гена гемагглютинина [30]. Несмотря на то что сигнал с такого микрочипа различим визуально, для увеличения воспроизводимости и автоматизации распознавания результатов была разработана нейронная сеть.



**Рис. 6.8.** Идентификация двух основных линий IFVB при помощи гемагглютининовых зондов матрицы BChip. (А) Расположение зондов на микрочипе. (Б) Образец B/Johannesburg/5/99 (Yam-88-подобный). (В) Образец B/South Carolina/4/2003 (Vic-87-подобный). Темные участки соответствуют высокой интенсивности флуоресценции. С разрешения из [30]

#### Анализ «серотипов» респираторных вирусов при помощи микрочипов

Процедуры серотипирования вирусных изолятов, основанные на культуральных методах, занимают много времени и требуют больших трудозатрат. Преимущества тестов на определение нуклеиновых кислот привели к отказу во многих лабораториях от культуральных методик, предназначенных для определения различных вирусов, таких

как ADV, энтеровирусы и риновирусы, что позволило получать более надежные результаты за меньшее время. Тем не менее отсутствие информации о серотипах вируса затрудняет проведение эпидемиологических исследований и предсказание возможных вспышек. Микрочипы большого объема позволяют определить «серотип» вируса на основании данных о гибридизации амплифицированных фрагментов его генома. Такой подход позволяет получить надежные результаты и, как правило, более прост в проведении, чем стандартные реакции секвенирования. Некоторые примеры определения «серотипов» при помощи гибридизации на микрочипах приведены ниже.

### Серотипирование пикорнавирусов

Пикорнавирусы характеризуются значительным разнообразием как по наличию однонуклеотидных полиморфизмов, так и по числу вариантов рекомбинации. Были разработаны микрочипы низкой плотности, позволяющие выявлять и различать вирус Коксаки A16 и энтеровирус 71, ассоциированные с ящуроподобным заболеванием, иногда протекающим с неврологической симптоматикой [34]. В одном из исследований был предпринят анализ полиовирусов при помощи подобного метода. Полученные результаты позволяют говорить о применимости метода для отслеживания различных вариантов вируса. По данным авторов, этот микрочип показал хорошие результаты при определении в смеси минорных последовательностей, которые трудно обнаружить другими методами [35].

Микрочип высокой плотности ViroChip показал хорошие результаты при выявлении RV по сравнению с культуральным методом. Его чувствительность составила 97%, а селективность — 98% относительно соответствующих показателей для ПЦП [51]. Гибридизация на ViroChip позволила выявить 16 серотипов RVA, 8 серотипов RVB и 5 разных RV, неизвестных ранее. Микрочипы высокой плотности, такие как ViroChip, могут в перспективе расширить наше понимание разнообразия вирусов, поскольку позволяют получить более детальную информацию о серотипах вирусов, чем прочие методы серотипирования.

### Серотипирование ADV

Определение серотипов ADV основано на методе торможения геммагглютинации, мишенью которого служит белок фибрилл, или на реакции нейтрализации инфекционности, мишенью которой является белок гексон; на сегодняшний день таким способом определено 57 серотипов. Серотип ADV может отражать тяжесть заболевания и быть полезен при эпидемиологическом сопоставлении случаев, между которыми может быть связь. Для получения информации относительно типа ADV в клинических образцах был разработан достаточно простой микрочип низкой плотности [32]. Этот микрочип, а также программное обеспечение, облегчающее разработку зондов, были разработаны

для выявления и идентификации серотипов ADV, ассоциированных с респираторными инфекциями у детей и взрослых (серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 и 21).

### *Анализ вируса атипичной пневмонии и других hCoV*

Для выявления всех hCoV был разработан микрочип низкой плотности [31]. На чипе присутствовали зонды для каждой группы hCoV, а также для индивидуальных вирусов, разработанные по технологии Chipron. При непосредственном анализе клинических образцов из дыхательных путей чип оказался недостаточно чувствительным для определения hCoV штаммов 229E, NL63, OC43 и HKU1. Это затруднение удалось преодолеть, заменив амплификацию на каскадную ПЦР, что позволило достичь качества результатов, сопоставимого с таковым для ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени [31].

Неспецифичная амплификация с последующей гибридизацией на микрочипе Virochip [48] позволила выявить hCoV, не определяемые культуральными методами [51]. Авторы данной работы тем не менее не провели параллельные анализы с использованием ПЦР с обратной транскрипцией, что позволило бы оценить чувствительность предложенной ими методики.

Секвенирующий микрочип GeneChip производства Affymetrix был создан для анализа 29 724 нуклеотидных позиций генома вируса атипичной пневмонии за одну гибридизацию. Микрочип несет по восемь 25-нуклеотидных зондов на каждую позицию, что позволяет выявлять как известные, так и новые однонуклеотидные полиморфизмы. Этот подход показал применимость для отслеживания различных изменений в геноме и может быть принят за образец при разработке методик анализа изменчивости вирусов во времени или в разных географических областях [60]. Несмотря на то что подобный подход показал себя мощным аналитическим инструментом, для него требуется предварительная культивация вируса, что мешает его внедрению в качестве диагностической методики.

### *Выявление и анализ хантавирусов*

Выявление и анализ хантавирусов производили с использованием 500-нуклеотидных перекрывающихся и 250-нуклеотидных неперекрывающихся фрагментов. Метод позволил выявлять и различать штаммы вирусов даже при 90%-й гомологии последовательностей [33].

## **Анализ вирусов желудочно-кишечного тракта при помощи микрочипов**

### *Астровирусы*

Астровирусы человека — одни из важнейших возбудителей гастроэнтеритов у маленьких детей. При определении серотипа и дальнейших

эпидемиологических исследованиях для анализа результатов ПЦР могут быть использованы микрочипы. В ходе одного исследования продукты ПЦР с обратной транскрипцией, полученные при помощи вырожденных праймеров, были гибридизованы на твердофазном микрочипе, несущем короткие олигонуклеотидные пробы [44].

### *Ротавирусы*

Ротавирусы группы А — распространенная причина диарей у новорожденных и маленьких детей. На сегодняшний день лицензированы две вакцины против ротавирусов; важно отслеживать их эффективность и изменения в эпидемиологии вируса. Отсутствие возможности серотипирования определило актуальность анализа генома в качестве основного серологического признака. Классификация ротавирусов по тесту на нуклеиновые кислоты основана в первую очередь на анализе генов бекков VP7 и VP4, а сложность и вариабельность этих областей делает микрочипы идеальным инструментом такого анализа. В одном из ранних исследований анализ генотипов G1–G4 и G9 по гену VP4 производили при помощи олигонуклеотидного микрочипа низкой плотности [46]. В расширенной версии этого микрочипа появились зонды к дополнительным целевым последовательностям, что сделало возможным регистрацию четырех генотипов по гену VP4, а также пяти дополнительных генотипов по гену VP7 (G5, G6, G8, G10 и G12) [45]. Этот новый микрочип способен специфично выявлять и различать генотипы ротавирусов из образцов фекалий. Метод позволил выявлять смешанные ротавирусные инфекции и может использоваться для более детального анализа полиморфизма генов VP4 и VP7. Авторы сравнили свои результаты с полученными ранее при помощи метода генотипирования ротавирусов на основе мультиплексного олигонуклеотидного микрочипа низкой плотности, совмещенного с типоспецифичным удлинением праймера [47]. В последнем методе метка Cy5 включается только в те гибриды, где продукт ПЦР комплементарен 3'-концу целевого олигонуклеотида. Такая комплементарность приводит к элонгации праймера, и включение метки на чипе можно видеть невооруженным глазом.

### **Генотипирование вируса кори**

Был разработан микрочип для выявления и идентификации генотипов вируса кори из клинических образцов [42]. Этот микрочип низкой плотности включает 71 пару зондов, имеющих в качестве целевой последовательности участки гена нуклеопротеина (N). В исследовании доказана хорошая чувствительность (90,7%), специфичность (100,0%) и точность определения генотипа (91,8%) по сравнению с прямым секвенированием. Также показана способность микрочипа обнаруживать новые генотипы на основании сопоставления полученного результата с эталонными для известных генотипов.

## Генотипирование VZV

Для разделения основных циркулирующих генотипов VZV был использован быстрый и чувствительный метод, основанный на микрочипах. Пары коротких олигонуклеотидных зондов, имеющих в качестве целевых последовательностей известные области однонуклеотидных полиморфизмов в открытой рамке считывания 22, использовались для выявления меченых РНК-транскриптов, полученных при помощи ПЦР с праймерами, добавлявшими к ПЦР-продукту последовательность промотора РНК-полимеразы Т7, и последующей *in vitro* транскрипции [40].

## Анализ вируса оспы

Для анализа генома 24 штаммов вируса натуральной оспы был использован секвенирующий микрочип [53]. Двадцать два перекрывающихся фрагмента генома амплифицировали при помощи ПЦР и гибридизовали на семи матрицах GeneChip, что позволило получить информацию о последовательности генома 14 различных штаммов натуральной оспы. Этот метод дает возможность быстро анализировать полный геном вируса оспы при угрозе использования его в качестве орудия биотерроризма.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индивидуальные тесты на обнаружение нуклеиновых кислот в реальном времени идеальны для диагностических целей, если нужно подтвердить, что инфекция вызвана конкретным вирусом. В ряде случаев для верной интерпретации результатов или определения способа лечения полезно знать не только видовую принадлежность вируса. Открытие новых клинически значимых вирусов означает, что диагностика становится все более сложной в силу повышения трудоемкости и стоимости применения индивидуальных или слабо мультиплексных тестов. Технологии на основе микрочипов начинают приобретать все большее значение в сфере диагностики вирусов, особенно в случаях, когда используется «синдромный» подход. Микрочипы для выявления респираторных вирусов в настоящее время доступны во множестве форматов, а некоторые из них даже прошли сертификацию. Те, что получили распространение в повседневной диагностической практике, подтвердили свою пользу как для индивидуальной диагностики, так и для эпидемиологического изучения вспышек респираторных инфекций.

В последующие несколько лет можно ожидать расширения применения микрочипов высокой плотности в качестве инструмента для выявления «всех возможных» вирусов, хотя их высокая стоимость позволяет предположить, что использоваться они будут только в том случае, если не удастся определить патоген при помощи индивидуальных тестов и микрочипов низкой плотности. С течением времени



методики, основанные на микрочипах, будут становиться все менее дорогостоящими. Это позволит оснастить вирусологические лаборатории мощным инструментом выявления и анализа вирусов, способным облегчить как эпидемиологические исследования, направленные на создание и отслеживание эффективности новых методов вакцинации и противовирусной терапии, так и планирование лечения отдельных пациентов. (Необходимо отметить, что бурное развитие и удешевление методов высокопроизводительного секвенирования, универсальных и не требующих адаптации к отдельным патогенам, в последние годы отодвинуло микрочипы на второй план. В России микрочипы практически не получили распространения в диагностике инфекционных заболеваний, что объясняется дешевизной индивидуальных тестов и универсальностью методик, основанных на прямом секвенировании, которые не требуют специфического оборудования и навыков для выявления каждого вируса. — Прим. ред.).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Castle PE, Gravitt PE, Solomon D, et al. Comparison of linear array and line blot assay for detection of human papillomavirus and diagnosis of cervical precancer and cancer in the atypical squamous cell of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):109–117.
2. Castle PE, Porras C, Quint WG, et al. Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10):3437–3445.
3. Koidl C, Bozic M, Hadzisejdic I, et al. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(2):144–146.
4. Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, et al. Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: Prevalence and distribution of different genotypes. *J Med Virol* 2009; 81(2):271–277.
5. Stevens MP, Garland SM, Tabrizi SN. Validation of an automated detection platform for use with the roche linear array human papillomavirus genotyping test. *J Clin Microbiol* 2008; 46(11):3813–3816.
6. Woo YL, Damay I, Stanley M, et al. The use of HPV Linear Array Assay for multiple HPV typing on archival frozen tissue and DNA specimens. *J Virol Methods* 2007; 142(1–2):226–230.
7. Akhras MS, Thiyagarajan S, Villablanca AC, et al. PathogenMip assay: A multiplex pathogen detection assay. *PLoS One* 2007; 2(2):e223.
8. Albrecht V, Chevallier A, Magnone V, et al. Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *J Virol Methods* 2006; 137(2):236–244.
9. Lee HS, Kim KM, Kim SM, et al. Human papillomavirus genotyping using HPV DNA chip analysis in Korean women. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17(2):497–501.
10. Choi BS, Kim O, Park MS, et al. Genital human papillomavirus genotyping by HPV oligonucleotide microarray in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 2003; 71(3):440–445.

11. Baek TJ, Park PY, Han KN, et al. Development of a photodiode array biochip using a bipolar semiconductor and its application to detection of human papilloma virus. *Anal Bioanal Chem* 2008; 390(5):1373–1378.
12. Hsia CC, Chizhikov VE, Yang AX, et al. Microarray multiplex assay for the simultaneous detection and discrimination of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency type-1 viruses in human blood samples. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356(4):1017–1023.
13. Libbrecht E, Doutreloigne J, Van De Velde H, et al. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a line probe assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12):3935–3941.
14. Olivero A, Ciancio A, Abate ML, et al. Performance of sequence analysis, INNO-LiPA line probe assays and AFFIGENE assays in the detection of hepatitis B virus polymerase and precore/core promoter mutations. *J Viral Hepat* 2006; 13(6):355–362.
15. Degertekin B, Hussain M, Tan J, et al. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v. 3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol* 2009; 50(1):42–48.
16. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1558–1564.
17. Domiati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta* 2006; 363(1–2):197–205.
18. Jlizi A, Ben Ammar El GA, Slim A, et al. Profile of drug resistance mutations among HIV-1-infected Tunisian subjects failing antiretroviral therapy. *Arch Virol* 2008; 153(6):1103–1108.
19. Sen S, Tripathy SP, Paranjape RS. Antiretroviral drug resistance testing. *J Postgrad Med* 2006; 52(3):187–193.
20. Wilson JW, Bean P, Robins T, et al. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: The HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):3022–3028.
21. Lodes MJ, Suci D, Wilmoth JL, et al. Identification of upper respiratory tract pathogens using electrochemical detection on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2007; 2(9):e924.
22. Causse M, Garcia-Mayorgas AD, Gutierrez JB, et al. Preliminary evaluation of a multiplex reverse transcription-PCR assay combined with a new DNA chip hybridization assay for detecting respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 2007; 45(11):3811–3813.
23. Coiras MT, Lopez-Huertas MR, Lopez-Campos G, et al. Oligonucleotide array for simultaneous detection of respiratory viruses using a reverse-line blot hybridization assay. *J Med Virol* 2005; 76(2):256–264.
24. Wang LC, Pan CH, Severinghaus LL, et al. Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays. *Vet Microbiol* 2008; 127(3–4):217–226.
25. Dawson ED, Moore CL, Smagala JA, et al. MChip: A tool for influenza surveillance. *Anal Chem* 2006; 78(22):7610–7615.
26. Dawson ED, Moore CL, Dankbar DM, et al. Identification of A/H5N1 influenza viruses using a single gene diagnostic microarray. *Anal Chem* 2007; 79(1):378–384.
27. Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, et al. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2863–2871.

28. Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):696-704.
29. Townsend MB, Smagala JA, Dawson ED, et al. Detection of adamantane-resistant influenza on a microarray. *J Clin Virol* 2008; 42(2):117-123.
30. Dankbar DM, Dawson ED, Mehlmann M, et al. Diagnostic microarray for influenza B viruses. *Anal Chem* 2007; 79(5):2084-2090.
31. de Souza Luna LK, Heiser V, Regamey N, et al. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3):1049-1052.
32. Lopez-Campos G, Coiras M, Sanchez-Merino JP, et al. Oligonucleotide microarray design for detection and serotyping of human respiratory adenoviruses by using a virtual amplicon retrieval software. *J Virol Methods* 2007; 145(2):127-136.
33. Nordstrom H, Johansson P, Li QG, et al. Microarray technology for identification and distinction of hantaviruses. *J Med Virol* 2004; 72(4):646-655.
34. Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6):2212-2219.
35. Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V, et al. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: Evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(16):9398-9403.
36. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, et al. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12):5811-5818.
37. Jaaskelainen AJ, Piiparinen H, Lappalainen M, et al. Improved multiplex-PCR and microarray for herpesvirus detection from CSF. *J Clin Virol* 2008; 42(2):172-175.
38. Jaaskelainen AJ, Piiparinen H, Lappalainen M, et al. Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens. *J Clin Virol* 2006; 37(2):83-90.
39. Zheng ZB, Wu YD, Yu XL, et al. DNA microarray technology for simultaneous detection and species identification of seven human herpes viruses. *J Med Virol* 2008; 80(6):1042-1050.
40. Sergeev N, Rubtcova E, Chizikov V, et al. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J Virol Methods* 2006; 136(1-2):8-16.
41. Ryabinin VA, Shundrin LA, Kostina EB, et al. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J Med Virol* 2006; 78(10):1325-1340.
42. Neverov AA, Riddell MA, Moss WJ, et al. Genotyping of measles virus in clinical specimens on the basis of oligonucleotide microarray hybridization patterns. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10):3752-3759.
43. Jaaskelainen AJ, Maunula L. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *J Virol Methods* 2006; 136(1-2):210-216.
44. Brown DW, Gunning KB, Henry DM, et al. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *J Virol Methods* 2008; 147(1):86-92.

45. Honma S, Chizhikov V, Santos N, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P [4], P [6], P [8], P [9], and P [14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2641–2648.
46. Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, et al. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2398–2407.
47. Lovmar L, Fock C, Espinoza F, et al. Microarrays for genotyping human group a rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11):5153–5158.
48. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24):15687–15692.
49. Wang D, Urisman A, Liu YT, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003; 1(2):E2.
50. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(1):73–81.
51. Kistler A, Avila PC, Rouskin S, et al. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J Infect Dis* 2007; 196(6):817–825.
52. Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, et al. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol Cell Probes* 2002; 16(2):119–127.
53. Sulaiman IM, Tang K, Osborne J, et al. GeneChip resequencing of the small-pox virus genome can identify novel strains: A biodefense application. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2):358–363.
54. Vahey M, Nau ME, Barrick S, et al. Performance of the Affymetrix GeneChip HIV PRT 440 platform for antiretroviral drug resistance genotyping of human immunodeficiency virus type 1 clades and viral isolates with length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8):2533–2537.
55. Wang Z, Daum LT, Vora GJ, et al. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(4):638–646.
56. Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, et al. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2359–2364.
57. Lin B, Wang Z, Vora GJ, et al. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 2006; 16(4):527–535.
58. Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, et al. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2):443–452.
59. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003; 300(5624):1394–1399.
60. Sulaiman IM, Liu X, Frace M, et al. Evaluation of affymetrix severe acute respiratory syndrome resequencing GeneChips in characterization of the genomes of two strains of coronavirus infecting humans. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(1):207–211.
61. Kessler N, Ferraris O, Palmer K, et al. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42(5):2173–2185.

62. Antonishyn NA, Horsman GB, Kelln RA, et al. The impact of the distribution of human papillomavirus types and associated high-risk lesions in a colposcopy population for monitoring vaccine efficacy. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(1):54–60.
63. Jiang HL, Zhu HH, Zhou LF, et al. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *J Med Microbiol* 2006; 55 (Pt 6):715–720.
64. Nazarenko I, Kobayashi L, Giles J, et al. A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture sample preparation method combined with GP5+/6+ PCR and multiplex detection on Luminex XMAP. *J Virol Methods* 2008; 154(1–2):76–81.
65. Oh Y, Bae SM, Kim YW, et al. Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types. *Cancer Sci* 2007; 98(4):549–554.
66. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2):504–512.
67. Brunstein J, Thomas E. Direct screening of clinical specimens for multiple respiratory pathogens using the genaco respiratory panels 1 and 2. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15(3):169–173.
68. Mahony J, Chong S, Merante F, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2965–2970.
69. Pabbaraju K, Tokaryk KL, Wong S, et al. Comparison of the Luminex xTAG respiratory viral panel with in-house nucleic acid amplification tests for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):3056–3062.
70. Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, et al. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2779–2786.
71. Lee WM, Grindle K, Pappas T, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2626–2634.
72. Brunstein JD, Cline CL, McKinney S, et al. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1):97–102.
73. Marshall DJ, Reisdorf E, Harms G, et al. Evaluation of a multiplexed PCR assay for detection of respiratory viral pathogens in a public health laboratory setting. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12):3875–3882.
74. Li H, McCormac MA, Estes RW, et al. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7):2105–2109.



## 7 ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ

**Д. Л. Лиланд**

Diane Leland, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, U.S.A.

**М. Л. Лэндри**

Marie Louise Landry, Department of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, U.S.A.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, способными развиваться только внутри живой клетки. Ранние работы по выделению вирусов требовали участия добровольцев, лабораторных животных или эмбрионов (табл. 7.1). И хотя животные до сих пор остаются важным инструментом выделения некоторых групп вирусов, их использование в клинической практике трудно и дорого. Так, для получения наилучших результатов следует производить внутрочерепную или внутрибрюшинную инокуляцию вирусного материала новорожденным мышатам в возрасте 24 или 48 часов. Оплодотворенные куриные яйца не так дороги, чем лабораторные животные, но требуют инокуляции в точно определенные периоды времени; неиспользованные яйца выбрасывают. В зависимости от типа вируса инокуляцию производят в аллантоисную или амниотическую полости либо в хориоаллантоисную мембрану. Детально подобные системы были описаны ранее [1]. В настоящее время эти методы используются только в специализированных исследовательских лабораториях или при производстве вакцин. Однако для применения в диагностических лабораториях эти методы слишком дороги и трудоемки.

Таблица 7.1

Использование оплодотворенных яиц и новорожденных мышат для выделения вирусов из клинических образцов

Культуральный метод	Вирусы, выделяемые из клинических образцов
Амниотическая <sup>a</sup> и/или аллантоисная полость зародыша цыпленка	Вирус гриппа и вирус эпидемического паротита
Хориоаллантоисная мембрана зародыша цыпленка	Поксвирусы и вирус простого герпеса
Новорожденные мышата	Арбовирусы, вирусы Коксаки групп А и В, вирус простого герпеса

<sup>a</sup> Для выделения вируса гриппа инокуляция в амниотическую полость предпочтительнее по сравнению с инокуляцией в аллантоис

С появлением в начале XX в. методик культивирования животных клеток *in vitro* выделение вирусов получило новый источник объектов, подходящих для культивирования вирусов. Уже в 1913 г. вирус осповакцины [2] был культивирован в клеточной культуре, а в 1930-х гг. вирусы натуральной оспы [3] и желтой лихорадки [4] были получены в культурах клеток и использованы для производства вакцин. Применение клеточных культур для выделения вирусов получило новое значение в 1950-х гг., когда было установлено, что полиовирусы могут заражать клеточные культуры не нейрального происхождения [5, 6]. Уже в 1960-х гг. изолирование вирусов в клеточных культурах производилось повсеместно в исследовательских лабораториях и некоторых крупных медицинских центрах.

Повышению интереса к культуральным методам также способствовали добавление антибиотиков к культуральной среде, разработка синтетических сред и появление оборудования для поддержания дежащихся культур [7]. С появлением коммерческих клеточных линий в начале 1970-х гг. вирусологическая диагностика получила мощный толчок к развитию [8]. Вскоре выделение вирусов в монослойных клеточных культурах стало золотым стандартом.

## ТРАДИЦИОННЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Хотя клетки можно культивировать в самых различных емкостях, стандартом считают круглодонную пробирку с завинчивающейся крышкой размером 16 × 125 мм. Монослой клеток обрастает боковую стенку пробирки. В США существуют два производителя готовых к использованию клеточных культур: Diagnostic Hybrids, Inc., Афины, шт. Огайо, и ViroMed Laboratories, Миннетонка, шт. Миннесота. Многие диагностические лаборатории приобретают готовые клеточные культуры, однако для других целей большинство вирусологов предпочитают поддерживать в лаборатории собственные постоянно пересеваемые культуры клеток.

### Типы клеточных культур

Вирусы, инфицируя клетку, связываются с рецепторами на ее поверхности. Тип рецептора, необходимого для присоединения, варьирует от вируса к вирусу. Лаборатории в клинической вирусологии используют и поддерживают ограниченное число линий клеток — обычно от трех до шести — в зависимости от исследуемого вируса. Один клинический образец инокулируют в несколько клеточных линий. Линии клеток подразделяют на первичные, диплоидные и гетероплоидные, или континуальные (табл. 7.2). Первичные клеточные культуры представляют собой клетки первого поколения, извлеченные из тканей, культивирование которых возможно только в течение одного-двух пересевов. Например, в США в вирусологических лабораториях широко применяется культура почечных фибробластов макака-резуса (RhMK). Диплоидные клеточные линии чаще всего получают из тка-

ней зародышей или новорожденных; клетки таких линий не изменяют плоидности в ходе культивирования и до наступления старения выдерживают 20–50 пересевов. Примеры диплоидных клеточных культур — клетки эпидермиса человека и линия MRC-5. Гетероплоидные, или континуальные, клеточные линии могут вести происхождение от тканей человека или животного, чаще всего это опухолевые клетки или клетки, инфицированные трансформирующим вирусом, однако они могут быть и результатом спонтанной трансформации нормальных клеток. Клетки таких культур гетероплоидны и выдерживают неограниченное число пересевов. Примерами культур этого типа служат линии А549 и Нер-2. Количество пробирок, инокулируемых исследуемым клиническим образцом, зависит от источника образца и групп вирусов, на наличие которых предполагается этот образец проверить.

Таблица 7.2

## Распространенные культуры клеток, используемые в вирусологии

Тип	Примеры
Первичная (от 1 до 3 пересевов)	Клетки почек макака-резуса, макака-крабеда <sup>a</sup> , африканской зеленой мартышки и кролика
Гетероплоидные (неограниченно культивируемые)	
опухолевого происхождения	Нер-2, А549, RD
спонтанно трансформировавшиеся	MDCK, LLCMK2, Vero <sup>b</sup> , BGМК
Диплоидные (эмбриональные или клетки новорожденных; 20–50 пересевов)	MRC-5, WI-38, HDF, HELF, клетки эпидермиса человека (HHF, HNF)
<i>Внимание!</i> Разные клеточные линии и линии, выдержавшие разное количество пересевов, обладают разной восприимчивостью к инфекции вирусом.	
<sup>a</sup> Два недавно выделенных вируса — метапневмовирус человека и коронавирус NL-63 — были впервые выделены из культуры клеток почек макака-крабеда.	
<sup>b</sup> Клетки линии Vero Е6 использовали для выделения филовирюсов, аренавирусов, переносимых клещами флавивирусов, буньявирусов, генипавирусов, а также коронавируса, ассоциированного с атипичной пневмонией (SARS)	

## Отбор, транспортировка и обработка образцов

Сбор и транспортировка клинических образцов в диагностическую лабораторию заметно влияют на качество получаемых результатов. Неверный метод отбора или неправильные условия транспортировки приводят к инаktivации вируса, что может стать причиной ложноотрицательного результата. Пробы можно отбирать как из пораженной вирусом области, так и из места бессимптомной репликации вируса. Так, при энтеровирусном менингите для выделения вируса можно использовать пробу спинномозговой жидкости (место поражения). Следует отметить, что подходящим источником для выделения виру-



са могут служить пробы кала, поскольку вирус реплицируется в ЖКТ и высвобождается в больших титрах, чем в месте поражения. Материалы смывов и биопсий помещают в транспортную среду для вирусов для предотвращения высыхания образца, а также добавляют антибиотики для подавления интенсивного роста бактериальной микрофлоры. Последнее особенно важно при транспортировке проб, взятых из мест с богатой микрофлорой, среди которых кожа, дыхательные пути и гениталии. После доставки в лабораторию со смывами, биоптатами и аспиратами могут быть произведены различные манипуляции, например центрифугирование, обработка антибиотиком или фильтрование. В отличие от описанных выше образцов, пробы в норме стерильных жидкостей организма, таких как ликвор, кровь или моча, в среду для транспортировки не помещают. Спинальная жидкость практически не требует обработки перед инокуляцией, тогда как для крови и мочи необходима коррекция pH или разведение, снижающее токсичность (мочи). Во всех случаях важно доставить образцы в лабораторию как можно быстрее, чтобы сохранить инфекционность содержащихся там вирусов. В идеальном случае время транспортировки не должно превышать 4 ч. Любые образцы, кроме проб периферической крови, следует охлаждать (помещая на лед или другим способом) и, если время транспортировки превышает сутки, необходимо сохранять образец во влажном состоянии. Если образец не может быть обработан в вирусологической лаборатории в течение трех дней, его следует заморозить при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже и транспортировать в закрытом контейнере на сухом льду [9]. Детали процесса отбора, транспортировки и обработки образцов детально описаны [10].

### **Инокуляция и инкубация**

После соответствующей подготовки образца инокулируемый материал добавляют к культуре клеток либо при помощи простого растворения в питательной среде, либо, предварительно слив среду, адсорбируют и инокулят на монослой клеток. В последнем случае спустя 1 ч инкубации инокулированной емкости при физиологической температуре инокулируемый материал выбрасывают или оставляют, после чего добавляют свежую питательную среду [11]. Метод с адсорбцией занимает больше времени, однако позволяет лучше выделять вирусы из образцов с низкой концентрацией вирионов.

Инокулированные культуральные емкости инкубируют при  $35-37^{\circ}\text{C}$ , хотя некоторые риновирусы интенсивнее пролиферируют при  $33^{\circ}\text{C}$ . Иногда выделение вирусов улучшалось при перемешивании среды на качалке. Емкости на такой качалке закрепляют под небольшим углом так, чтобы горловая часть была выше донной. Это сохраняет среду в нижней части емкости, где она покрывает монослой клеток, и предохраняет ее от попадания на пробку, где она может загрязниться. Наилучшие результаты подобный подход дает при скорости вращения ротора 0,2–2 об./мин [12]. Ротация азрирует монослой

клеток и распределяет размножающиеся вирусы по всему объему культуральной емкости.

Если нет качалки, культуральные емкости можно содержать в стационарных ячейках. Емкости в стационарных держателях тоже устанавливаются под углом. При использовании стационарных ячеек следует убедиться, что жидкая среда полностью покрывает монослой клеток. Случайное расположение монослоя на верхней поверхности, не покрытой средой, приведет к высыханию и гибели монослоя. Покупные емкости с готовыми культурами снабжены маркировкой, показывающей положение монослоя, находящегося на противоположной стороне пробирки. Следует удостовериться, что этот маркер при инкубации всегда развернут вверх.

В качестве контроля для любых анализов следует инкубировать несколько неинкубированных емкостей. Любые изменения в клетках контрольной группы будут свидетельствовать о присутствии в культуре эндогенного вируса или загрязняющей микробиоты либо о ненадлежащем качестве партии клеточных культур.

Продолжительность инкубации и частота отбора проб для микроскопирования зависит от вируса, на присутствие которого тестируют материал. В случае неспецифичного анализа время культивации составляет обычно 10–14 дней; отбор проб ведут через каждые 24 ч на 5–7 сутки и через каждые 48 ч впоследствии. При тестировании на вирус простого герпеса время культивации можно сократить до 7 дней в силу быстрой пролиферации вируса, а отбор проб производить ежедневно. В случае цитомегаловируса может потребоваться от 7 до 21 и более дней для появления первых видимых признаков вирусной пролиферации, что требует увеличения продолжительности инкубации. Культуры, тестируемые на цитомегаловирус, проверяют через день в течение первых двух недель, и еженедельно в последующие две недели.

### **Микроскопические исследования монослоев клеточных культур**

Долгое время стандартным методом определения пролиферации вируса было микроскопическое исследование культуральных клеток. Дегенеративные изменения, среди которых набухание, сморщивание и округление клеток, а также образование скоплений и синцитиев и в некоторых случаях — разрушение монослоя, могут быть результатами активности вируса. Все эти изменения называют цитопатогенным влиянием вируса. Интенсивность и характер цитопатогенных изменений, индуцируемых различными вирусами-возбудителями, зависят от типа клеточной культуры, концентрации вируса в образце и индивидуальных свойств вируса. Наиболее распространены в неокрашенных препаратах виды цитопатогенных изменений, которые будут описаны ниже.

**Вакуолизация цитоплазмы** — внутри клетки заметны крупные светлые области в виде пузырьков.

**Синцитии** — крупные агрегаты клеток, содержащие до 100 ядер. Иногда подобные образования называют «гигантскими клетками»; они образуются в результате слияния зараженных вирусом клеток, что способствует распространению вируса.

**Общие изменения морфологии** — округление, увеличение и уменьшение размеров или образование гроздеподобных структур.

**Потеря адгезивных свойств** — потеря клетками способности прикрепляться к поверхности сосуда для культивации. Клетки при этом свободно плавают в среде, а монослой прерывается свободными от клеток участками.

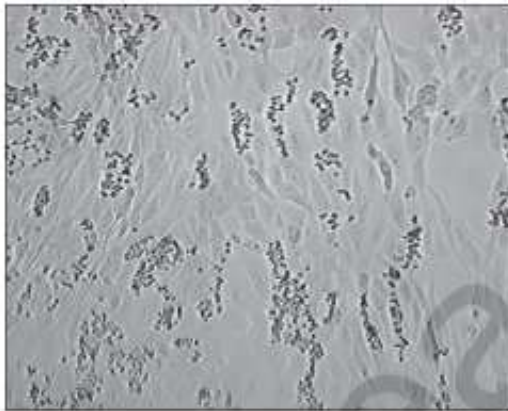
**Грануляция клеток** — клетки выглядят шершавыми и темными, с небольшим количеством тонких отростков. Грануляция, вызванная вирусом, напоминает таковую при старении культуры.

Интенсивность цитопатогенных изменений чаще всего рассчитывают по следующей шкале: 4+ — изменения характерны для всех клеток монослоя; 3+ — изменения характерны для 75% клеток монослоя; 2+ — изменения характерны для 50% клеток монослоя; 1+ — изменения характерны для 25% клеток монослоя. В случае когда изменения носят точечный характер и наблюдаются в менее чем 25% клеток монослоя, говорят об очаговых (фокальных) изменениях.

## Гемадсорбция

Альтернативный подход, позволяющий обнаружить присутствие вируса, — это гемадсорбция. Гемадсорбция применима только для выявления таких вирусов, как вирусы гриппа, парагриппа и эпидемического паротита, которые экспрессируют гемагглютинины на поверхности зараженных клеток. Эти белки можно обнаружить благодаря их средству к эритроцитам. Гемадсорбцию применяют при выявлении цитопатогенных изменений, характерных для гемагглютинирующего вируса, или когда цитопатогенных изменений не наблюдается в течение 3–7 дней культивирования, а исходные данные указывают на возможность присутствия в пробе гемагглютинирующего вируса [13]. Очаги гемадсорбции обнаруживаются в культуре клеток легких человека спустя 12 ч после инокуляции вирусов гриппа А и В [14]. При проведении гемадсорбции культуральную среду удаляют и заменяют на разбавленную суспензию эритроцитов (чаще всего эритроцитов морской свинки), после чего культуральные емкости инкубируют в течение 30 мин при 4 °С [11]. Для вируса парагриппа типа 4 гемадсорбцию рекомендуется проводить при комнатной температуре. Затем культуру микроскопируют [1]. Если в инокуляте присутствует гемадсорбирующий вирус, эритроциты будут оседать на зараженные клетки, формируя бляшки (рис. 7.1). Эритроциты не оседают на неинфицированные клетки и на клетки, зараженные негемадсорбирующим вирусом. Неадсорбированные эритроциты свободно отстают от монослоя при встряхивании или покачивании культуральной емкости. При использовании старых эритроцитов может наблюдаться

неспецифическая адсорбция. К гемадсорбции способно лишь крайне ограниченное число вирусов, но для точного установления видовой принадлежности вируса необходимо дальнейшее исследование образца, положительного по гемадсорбции.



**Рис. 7.1.** Гемадсорбция клеток культуры ВМК, инфицированных вирусом парагриппа (100×)

### Точная идентификация штамма вируса

Как правило, опытный вирусолог может понять, какой вирус находится в пробе, основываясь на характере цитопатогенных изменений, результатах гемадсорбции, использованных клеточных линиях, продолжительности инкубации и типе клинического образца, однако для точного определения вируса требуются дальнейшие исследования. Точное определение вируса, выявленного по цитопатогенным изменениям или по гемагглютинации, основано, как правило, на использовании антител, специфичных к экспрессируемым в клетках вирусным антигенам. Их определяют, например, в тестах нейтрализации или ингибирования гемадсорбции. В настоящий момент наиболее широко для определения видовой принадлежности вируса используется реакция иммунофлуоресценции с применением конъюгированных с изотиоцианатом флуоресцина (FITC) моноклональных антител. Клетки соскабливают со стенки культурального сосуда и помещают на предметное стекло. Препарат фиксируют ацетоном, после чего обрабатывают моноклональными антителами известной специфичности. Связывание антител с вирусными белками регистрируют при помощи флуоресцентного микроскопа. Распределение метки (сплошное или локализованное) и ее локализация в клетке (ядерная или цитоплазматическая) помогают идентифицировать вирус. Весь процесс занимает 1–2 ч и позволяет определять вирусы с высокой чувствительностью и специфичностью. В настоящее время при помощи этого метода

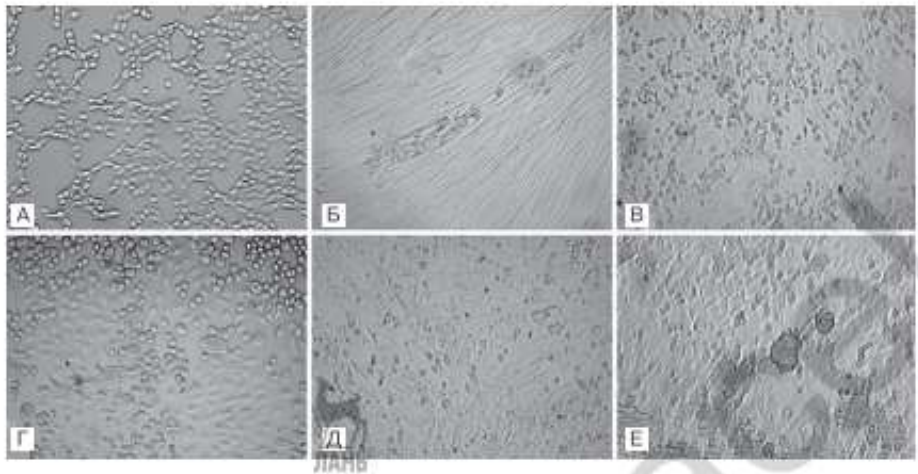
можно определять следующие группы вирусов: аденовирусы (группа, но не тип), энтеровирусы (группа, но не тип), HSV типов 1 и 2, вирусы гриппа А и В, вирус кори, вирусы парагриппа типов 1, 2, 3 и 4, респираторный синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, цитомегаловирус, а также вирус ветряной оспы.

К сожалению, иммунофлуоресцентные реагенты не позволяют идентифицировать ряд вирусов — среди них вирусы Коксаки, полиовирусы и эховирусы, определяемые методом как энтеровирусы. Определение их серотипа требует дополнительного проведения реакции нейтрализации, в ходе которой стандартное количество вируса инкубируют с антителами известной специфичности, после чего инокулируют в клеточную культуру, которую затем исследуют на предмет цитопатических изменений. В случае их обнаружения делают вывод о том, что использованные антитела не связались с вирусом и не нейтрализовали его. В случае отсутствия таких изменений делают обратное заключение. Систематическую принадлежность вируса затем определяют на основании специфичности использованных антител. Эта процедура отличается высокой трудоемкостью и требует титрования вируса для определения инокулируемой дозы и продолжительной инкубации после инокуляции. Хотя реакция нейтрализации позволяет определить широкий спектр различных вирусов, использовать ее, в силу трудоемкости и продолжительности, следует только в случаях, когда более простые методы не дали желаемого результата, или при необходимости определения серотипа.

### **Вирусы, выделенные в клеточных культурах**

Лишь ограниченное число патогенных для человека вирусов способно давать цитопатогенные изменения клеточных культур. Среди них аденовирус, CMV, энтеровирусы (за исключением многих серотипов вируса Коксаки группы А), HSV 1 и 2, вирусы гриппа А и В, вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4, респираторный синцитиальный вирус (RSV), риновирус и VZV. Характерные цитопатогенные изменения для этих групп вирусов показаны на рис. 7.2. Клеточные линии, дающие цитопатогенные изменения, характер таких изменений и время их развития для вирусов этих групп представлены в табл. 7.3 [15].

Вирусы кори и эпидемического паротита также способны давать цитопатогенные изменения. Эти вирусы в развитых странах встречаются редко в силу интенсивной и эффективной вакцинации, тем не менее сообщалось о вспышках кори [16] и эпидемического паротита [17] в США. Вирус кори вызывает образование синцитиев и общие изменения морфологии клеток линии Vero и первичных культур почечных клеток обезьяны через 7–10 сут. после заражения, но наибольший эффект пролиферации отмечается на монослоях клеток В95а. Эти клетки представляют собой В-лимфобластоидные клетки мармозетки, трансформированные вирусом Эпштейна—Барр; их чувствительность к вирусу кори примерно в 10 000 раз превышает тако-



**Рис. 7.2.** Типичные цитопатогенные изменения (100х), вызываемые (А) аденовирусом в клетках А549, (Б) CMV в клетках MRC-5, (В) энтеровирусом в клетках RhMK, (Г) HSV типа 2 в клетках А549, (Д) риновирусом в клетках MRC-5 и (Е) RSV в клетках HEp-2

Таблица 7.3

Цитопатогенные эффекты в стандартных клеточных линиях, вызываемые патогенными вирусами, характерными для США<sup>а</sup>

Вирус	Цитопатогенные изменения				Метод окончательной идентификации штамма
	Фибробласты	A549	RhMK	Другие	
Аденовирусы	Некоторые образуют скопления	Гроздевидные скопления или кружевной рисунок через 2–8 сут.	Некоторые образуют скопления клеток (при эндогенной инфекции SV40)	НЕК: гроздевидные скопления через 5–7 сут.	ИФА для определения группы, нейтрализация для определения типа
CMV	Скопления округлых клеток через 10–30 сут.	Нет	Нет	Для быстрого обнаружения следует использовать флаконы для однослойной культуры клеток	ИФА или перенос во флаконы для однослойной культуры клеток, цитопатогенные изменения в случае положительной реакции во флаконе

Продолжение табл. 7.3

Вирус	Цитопатогенные изменения				Метод окончательной идентификации штамма
	Фибробласты	A549	RhMK	Другие	
Энтеровирусы	Некоторые дают цитопатогенные изменения, сходные с таковыми для RhMK, через 2-5 сут.	Нечастые дегенеративные изменения	Мелкие округлые клетки с выбросами цитоплазмы через 2-5 сут.		ИФА для определения группы, нейтрализация для определения типа
HSV	Крупные округлые клетки через 2-6 сут.	Крупные округлые клетки через 1-4 сут.	Некоторые дают цитопатогенные изменения, сходные с таковыми для A549, через 4-8 сут.	RK или НЕК: крупные округлые клетки через 1-4 сут.	ИФА
Вирус гриппа	Нет	Нет	Недифференцируемые изменения, грануляция через 4-8 сут.	Положительный результат при гемадсорбции эритроцитов морской свинки	ИФА
Вирус парагриппа	Нет	Нет	Округлые клетки, немногочисленные синцитии через 4-8 сут.	Положительный результат при гемадсорбции эритроцитов морской свинки	ИФА
Риновирус	Дегенерация, округление через 7-10 сут.	Нет	Нет	Инкубировать фибробласты при 33 °С	Тест на чувствительность к кислоте; цитопатогенные изменения могут слабо отличаться от таковых для энтеровирусов

Окончание табл. 7.3

Вирус	Цитопатогенные изменения				Метод окончательной идентификации штамма
	Фибробласты	A549	RhMK	Другие	
RSV	Нечастая гранулярная дегенерация	Редкие изменения	Синцитии через 4–10 сут.	HEP-2: синцитии через 4–10 сут.	ИФА
Вирус ветряной оспы	Незначительные изменения, мелкие округлые клетки через 4–8 сут.	Мелкие округлые клетки через 4–8 сут.	Мелкие округлые клетки через 6–8 сут. при высоком титре вируса	HEK: мелкие округлые клетки через 6–8 сут.	ИФА

<sup>a</sup> Вирусы кори, эпидемического паротита и краснухи сейчас редко встречаются в Европе и США. Вирус кори приводит к образованию крупных синцитиев в клетках RhMK через 7–10 сут. и дает положительный результат при гемадсорбции эритроцитов рекуса, но требуется окончательная идентификация с использованием иммунофлуоресценции. Вирус эпидемического паротита приводит к образованию крупных округлых клеток и синцитиев в культуре RhMK через 6–8 сут., дает положительную реакцию гемадсорбции для эритроцитов морской свинки, также требует окончательной идентификации с применением иммунофлуоресценции. Идентификация вируса краснухи требует специальных культур, таких как клетки почек зеленой мартышки, RK или BSC-1 и не вызывает цитопатогенных изменений. Для обнаружения присутствия вируса необходимы специальные методики [15]

вую для клеток других линий [18]. Вирус эпидемического паротита пролиферирует на клетках многих линий, среди которых первичные клетки почек обезьяны и человека, HeLa и Vero, и индуцирует округление клеток и образование синцитиев на 6–9 сут. после заражения [19]. Тем не менее показано, что клетки V95a обладают чувствительностью к этому вирусу, сравнимой с таковой для первичной культуры почечных клеток обезьяны [20].

Некоторые вирусы, нехарактерные для стран северного полушария, также способны пролиферировать на клеточных культурах, и для их обнаружения успешно применяли этот метод. Так, вирус Чикунгунья, передаваемый кровососущими насекомыми и характерный для стран Африки и Индии, был обнаружен в США; сообщалось о 26 случаях заражения в течение 2006 г. [21]. Вирус способен пролиферировать на первичной культуре почечных клеток обезьяны и был классифицирован как BSL-3.

Вирус оспы обезьян — поксвирус, характерный для животных и способный передаваться человеку, — был обнаружен в США в 2003 г. Вирус передался от привезенных гамбийских крыс сурика-



там, которых совместно содержал торговец экзотическими животными. Оказались инфицированы целые семьи, купившие зараженных сурикатов. Вирус оспы обезьян способен пролиферировать на нескольких линиях клеточных культур, среди которых Vero, BSC-1, CV-1 и некоторые другие. Этот вирус можно культивировать в лабораториях класса BSL-2, но только в том случае, если их персонал был вакцинирован против натуральной оспы не позднее 10 лет назад.

Прочие вирусы, культивирование которых в лабораториях BSL-2 недопустимо, также реплицируются в культурах клеток (вирус птичьего гриппа, вирус клещевого энцефалита). Диагностическая лаборатория должна принимать во внимание такую возможность и воздерживаться от инокуляции и уничтожать культуры клеток в случае подозрения на присутствие в них подобных вирусов.

### Случайная контаминация клеточных культур

Первичные или пересеваемые клеточные культуры могут быть случайно заражены различными контаминантами. Подобное загрязнение может повлиять на интерпретацию результатов [23–25]. Цитопатогенные изменения, вызванные заражением, могут быть похожими на опосредованные вирусом, что приведет к ложноположительному результату, либо такое заражение может повлиять на способность вирусов расти в культуре. Более того, некоторые эндогенные вирусы животных, такие как вирус герпеса В, могут представлять угрозу для персонала лаборатории. Первичные культуры клеток обезьян могут содержать вирус SV40, аденовирусы, цитомегаловирус, энтеровирусы, реовирусы, вирус парагриппа (SV5) и вирус губчатого энцефалита (ретровирус). Вирусную инфекцию могут также нести ткани и кровь иного происхождения [26]. Так, сыворотка телят, зараженная вирусом ринотрахеита крупного рогатого скота может привести к развитию в клетках линии A549 цитопатогенных изменений, характерных для HSV типа 2. Микоплазмы также составляют важную группу контаминантов клеточных культур, в связи с чем требуется периодическое тестирование на их присутствие [28]. Консерванты и/или антитела, используемые для сохранения сыворотки, применяемой в культуральных средах, могут снизить чувствительность при выделении вируса, особенно ортомиксо- и парамиксовирусов [29]. Несмотря на то что все продукты животного происхождения, описанные выше, проходят контроль, позволяющий снизить вероятность заражения, она тем не менее существует. По этой причине многие лаборатории используют только диплоидные или иммортальные клеточные линии, что позволяет исключить использование первичных культур клеток приматов.

### Выявление неизвестных возбудителей инфекций

Для выявления новых патогенов клеточные культуры перспективнее, чем более специфичные методики, основанные на выявлении

вирусных белков или нуклеотидных последовательностей, и, как следствие, обладают большими возможностями выявления нетипичных патогенов. Если вирус, вызвавший цитопатогенные изменения, не поддается идентификации при помощи доступных методик, применяют электронно-микроскопические методы, позволяющие определить семейство вируса по морфологии частицы. Затем для более точного определения систематического положения вируса проводят молекулярное клонирование, амплификацию и секвенирование. Недавно были описаны метапневмовирус человека [30] и коронавирус NL-63, изначально выделенные в культуре клеток почки обезьян. Подобным образом с использованием линии клеток Vero E6 был выделен и описан коронавирус, ассоциированный с атипичной пневмонией [33].

### **Преимущества и недостатки выделения вирусов с использованием традиционных клеточных культур**

Традиционный культуральный метод имеет как преимущества, так и недостатки. Некоторые из них представлены ниже.

#### **Преимущества**

1. Можно выделить множество разнообразных вирусов. Это особенно важно, когда нет указаний на природу содержащегося в образце вируса, когда образец содержит более одного вируса или вирус, присутствие которого маловероятно (необычная географическая локализация, сезон и т. д.).

2. Для многих вирусов метод более чувствителен и специфичен, чем выявление вирусных антигенов.

3. Клеточные культуры позволяют отличить инфекционные вирусные частицы от присутствующих в образце неинфекционных вирусных антигенов.

4. Выделение таким методом позволяет получить достаточное количество вируса для дальнейших исследований.

#### **Недостатки**

1. Для определения состояния инфицированного клеточного монослоя требуется специальная квалификация.

2. Для развития цитопатогенных изменений необходима длительная инкубация в течение 1–21 сут.

3. Клеточные культуры дороги в приобретении и поддержании.

4. Возможно случайное выделение опасных патогенов в лаборатории, не оборудованной для работы с ними, таких как коронавирус (возбудитель атипичной пневмонии), вирус гриппа H5N1, вирус клещевого энцефалита или вирус лихорадки Эбола.

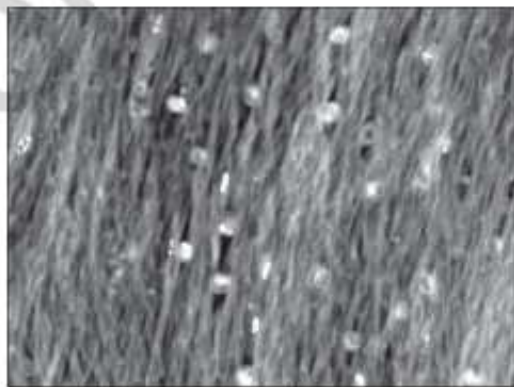
5. Многие клинически значимые вирусы не допускают культивации в клеточных культурах (к примеру, норовирусы, вирусы гепатита и парвовирус B19).

## УСКОРЕННЫЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

### Центрифугированные культуры (однослойные культуры клеток)

Традиционное выделение вирусов при помощи культур клеток обычно подразумевает исследование клеток на предмет наличия цитопатогенных изменений, развитие которых может занять много дней. В силу этого применение центрифугированных культур для быстрой диагностики дает значительные преимущества. Несмотря на то что принцип действия метода остается невыясненным, низкоскоростное центрифугирование монослоев клеток усиливает инфекционность вирусов и хламидий [34]. В 1984 г. применение центрифугированных культур с последующим иммуноокрашиванием моноклональными антителами после 24 ч инкубирования было применено для обнаружения CMV [35] (рис. 7.3). В последующих работах этот метод применили для быстрой диагностики других вирусов, среди которых HSV [36], VZV [37], аденовирусы [38–40], респираторные вирусы [41], полиомавирус ВК [42] и энтеровирусы [43]. При стандартизации инокулируемого материала можно получить полуколичественные результаты, основываясь на подсчете вирусположительных клеток [44].

Метод однослойной культуры сочетает: 1) центрифугирование для увеличения инфекционности вируса, 2) поддержание клеточной культуры, в которой вирус способен амплифицироваться, 3) раннее выявление вирусспецифичных антигенов (до развития цитопатогенных изменений) при помощи антител. Вирусы с длительным репликативным циклом можно выявить на несколько дней раньше, чем появятся какие-либо признаки цитопатогенных изменений, особенно когда вирусные антигены синтезируются на ранних этапах жизненного цикла вируса. Вирусы, реплицирующиеся быстрее, например HSV, дают положительный результат при использовании флаконов для



**Рис. 7.3.** Центрифугированная культура, выявление немедленноранних антигенов CMV в ядрах инфицированных клеток спустя 16–24 ч после инокуляции (иммунофлуоресцентное окрашивание, 200×)

однослойной культуры за меньшее время. Тем не менее при применении этой методики увеличивается число ложноотрицательных результатов, поскольку центрифугируемая культура признается отрицательной по вирусу и утилизруется после 48 ч инкубации, в отличие от 7–14 сут., принятых для традиционной культуры (табл. 7.4) [45].

Таблица 7.4

Время, необходимое для выявления вируса при помощи традиционных и центрифугируемых клеточных культур

Вирус	Время, необходимое для обнаружения вируса (сут.)	
	Развитие цитопатогенных изменений в культуре (среднее значение и разброс)	Время до обнаружения центрифугируемых культур при помощи ИФА
Респираторные вирусы		
Аденовирус	6 (1–14)	2–5
Вирус гриппа А	2 (1–7)	1–2
Вирус гриппа В	2 (1–7)	1–2
Вирусы парагриппа 1–3	6 (1–14)	1–2
Респираторный синци- тиальный вирус	6 (2–14)	1–2
Герпесвирусы		
Цитомегаловирус	8 (1–28)	1–2
Вирус простого герпеса	2 (1–7)	1–2
Вирус ветряной оспы	6 (3–14)	2–5
С разрешения из [45]		

Этот метод подразумевает использование плоскодонных флаконов с круглыми покровными стеклами, несущими монослой клеток, и инокуляцию образца с последующим центрифугированием в течение 30–60 мин с ускорением около 700 g. Инокулят впоследствии можно удалить, после чего следует добавить жидкую питательную среду и инкубировать культуру при 35–37 °С. В определенные дни после инокуляции клетки культуры фиксируют ацетоном или смесью ацетона и метанола и окрашивают вирусспецифичными антителами. В некоторых случаях центрифугируемые культуры исследуют на предмет наличия цитопатогенных изменений или реакции гемадсорбции по методикам, аналогичным таковым для обычных культур. Для проведения широкомасштабных исследований с применением указанной методики можно использовать 24- или 48-луночные культуральные планшеты вместо индивидуальных емкостей. Для визуализации сигнала используется как иммунофлуоресценция, так и иммуноферментный анализ, дающий хромогенную реакцию с определенным субстратом, но первый метод более распространен.

На чувствительность метода оказывает влияние целый ряд факторов, среди которых тип образца [46], длительность и температура центрифугирования [47], природа исследуемого вируса, тип клеточной культуры, используемые антитела, а также продолжительность фиксации и окрашивания. Чаще всего используют молодые клеточные культуры и инокуляцию в несколько культуральных сосудов, что повышает чувствительность метода [48, 49]. Токсичность материала образца, что особенно актуально для образцов крови и мочи, может привести к потере монослоя. В этом случае потребуется пересев культуры или повторная инокуляция.

Следует отметить, что при применении быстрых культуральных методик, направленных на выявление одного конкретного вируса, можно выявить только его. Традиционные культуральные методы, использующие несколько различных культур, напротив, дают возможность обнаруживать целый спектр вирусов, включая те, наличие которых в образце исходно не ожидалось [50]. По возможности эти два метода следует использовать параллельно [41, 51–53].

### **Смешанные клеточные культуры и смеси антител**

Для применения метода однослойной культуры клеток при определении спектра вирусов в клиническом образце требуется несколько культуральных сосудов и антител. Для упрощения процесса и выявления большего количества вирусов при помощи меньшего числа культуральных сосудов антитела к нескольким вирусам смешивают для получения одного реагента [41, 54, 55] и в одной культуральной емкости выращивают 2–3 клеточные культуры [56–58]. Чтобы отличить вирусспецифичную реакцию от неспецифической, требуется квалификация, но время на подготовку персонала для работы по этой методике намного меньше, чем при подготовке к выявлению цитопатогенных изменений. Смешанные клеточные культуры и соответствующие смеси антител в настоящее время доступны в форме коммерческих продуктов, а сами культуры могут быть улучшены при помощи методов генной инженерии. Применение этой технологии позволило упростить выявление распространенных респираторных вирусов, сократив трудозатраты и ускорив получение как положительных, так и отрицательных результатов.

Смешанные клеточные культуры можно поддерживать более 2 сут., что необходимо для успешного иммуноокрашивания, и исследовать на наличие цитопатических изменений спустя 1–2 недели после инфицирования. По этой причине ряд лабораторий отказался от использования традиционных клеточных культур, полностью заменив их центрифугируемыми смешанными культурами [59].

Существует множество различных смешанных культур, которые чувствительны к определенным вирусам (табл. 7.5). Смеси R-mix™ (Mv1Lu и A549) и R-mix Too™ (MDCK и A549) используют совместно со смесями антител для быстрого выявления некоторых респира-

торных вирусов [58, 60–65]. Смесь R-mix Too™ была разработана, чтобы исключить случайный рост коронавируса, ассоциированного с атипичной пневмонией, для чего клетки линии Mv1Lu были заменены на клетки линии MDCK. При помощи этих культур можно выделить и метапневмовирус человека [66]. По появлению цитопатогенных изменений в этих культурах можно выявить и многие другие вирусы.

Таблица 7.5

**Коммерчески доступные смешанные клеточные культуры и генетически модифицированные клеточные линии**

Культура	Состав	Определяемые по стандартной методике вирусы	Прочие определяемые вирусы	Литература
R-mix™	Mv1Lu и A549	RSV, вирусы гриппа А и В, вирусы парагриппа 1, 2 и 3, аденовирусы	HSV, VZV, CMV, энтеровирусы	58, 60–66
R-mix Too™	MDCK и A549	То же, что и для R-mix, но без возможности роста возбудителя атипичной пневмонии	HSV, VZV, энтеровирусы	
H&V Mix™	Клетки почек зеленой мартышки (CV-1) и клетки MCR-5	HSV 1 и 2, VZV	CMV, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус энцефалита, риновирусы, аденовирусы и энтеровирусы, RSV	68
Super E-mix™	BGMK-hDAF и A549	Энтеровирусы	HSV, VZV, аденовирусы	71
ELVIS®	Линия клеток ВНК с промотором UL39 и геном LacZ <i>E. coli</i>	HSV 1 и 2		72, 74–78

Традиционно обнаружение энтеровирусов требовало инокуляции 3–5 клеточных культур различных линий. Это значение было снижено после введения оригинальных смесей E-mix A (RD и H292) и E-Mix B (BGMK и A549). Впоследствии эти смеси были заменены созданной с применением генетической инженерии более чувствительной Super E-mix™, которая описана ниже [67].

Смесь H&V Mix™ (CV-1 и MRC-5) была разработана для выделения HSV типов 1 и 2 и VZV, однако способна выявлять также и CMV. Несмотря на то что HSV и CMV выявляются методом иммунофлуоресцентного окрашивания спустя 1–2 сут. инкубирования,

оптимальное выявление VZV достигается при окрашивании препарата клеток культуры спустя два и четыре дня после инокуляции. В этой смеси может также реплицироваться множество других вирусов, и их можно выявить цитопатогенным изменениям культуры [68].

Протоколы инокуляции, инкубации и окрашивания коммерческих смешанных культур чаще всего разрабатываются производителем и не требуют дополнительных модификаций, хотя и допускают их в соответствии с нуждами исследователя. Так, для выявления респираторных вирусов при помощи смесей R-mix™ и R-mix Too™ рекомендуется инокулировать три культуральных емкости и применять следующий протокол.

1. В течение суток после инокуляции клетки из одной емкости фиксируют и окрашивают при помощи смеси антител к антигенам респираторных вирусов.

2. Если материал из первой емкости дал положительную реакцию, клетки из второй рассаживают в лунки восьмилуночного планшета, что позволяет установить видовую принадлежность вируса путем окрашивания видоспецифичными антителами.

3. При отрицательной реакции в первой емкости материал из второй отбирают спустя два дня инкубации и помещают как в отдельную емкость, так и в ячейки восьмилуночного планшета.

4. Для окраски образца из отдельной емкости применяют смесь антител.

5. При положительном результате для этого образца клетки из ячеек планшета окрашивают индивидуальными видоспецифичными антителами.

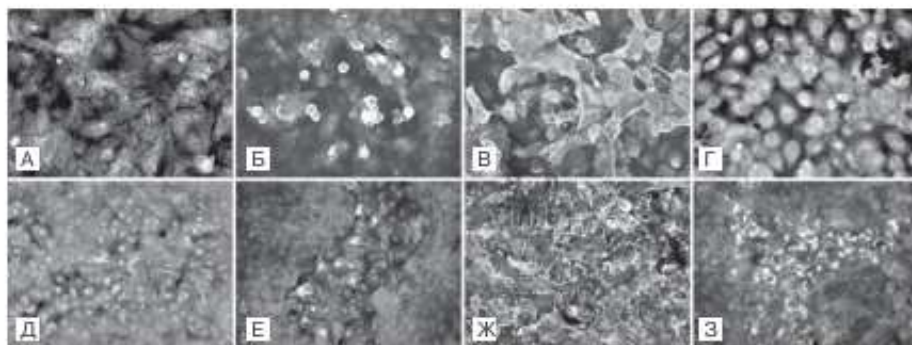
6. При отрицательном результате для образца из отдельной емкости клетки из восьмилуночного планшета не анализируют.

7. Клетки третьей емкости исследуют на наличие цитопатогенных изменений по прошествии продолжительного периода времени, что позволяет выявлять медленно реплицирующиеся вирусы или вирусы, присутствующие в пробе в небольшом количестве.

8. Альтернативный вариант подразумевает использование третьей емкости для приготовления образцов для восьмилуночного планшета в случае, если клетки из второй дали положительную реакцию при окраске смесью антител.

На рис. 7.4 показаны результаты окрашивания смеси R-mix Too™ смесью антител. Последующее окрашивание индивидуальными антителами позволило идентифицировать представленные вирусы.

Для выявления энтеровирусов две емкости со смесью Super E-mix™ рекомендуется инокулировать две емкости вирусным материалом и окрашивать клетки в них спустя два и пять дней после инокуляции. Образцы с высоким вирусным титром, такие как анализы кала, дают положительный результат уже на второй день, а для образцов, к примеру, ликвора требуется до пяти дней для получения положительного результата [67].



**Рис. 7.4.** Клетки смеси R-mix Too™, окрашенные смесью антител после 1 сут. инкубации с вирусным материалом (200×): (А) неинокулированные, (Б) аденовирус, (В) вирус гриппа А, (Г) вирус гриппа В, (Д) вирус парагриппа 1, (Е) вирус парагриппа 2, (Ж) вирус парагриппа 3 и (З) RSV

### Генетически модифицированные клеточные линии

Генетически модифицированные клеточные линии были введены в лабораторную практику сравнительно недавно, однако сразу показали себя как мощный диагностический инструмент [69]. Белок hDAF, или CD55 — рецептор многих вирусов человека, — был перенесен в клетки линии BGМК [70, 71]. Затем клетки BGМК-hDAF были скомбинированы с клетками линии CaCo-2, в результате чего получена коммерческая клеточная смесь Super E-mix™. Эта смесь оказалась более чувствительной при выделении энтеровирусов, чем инокуляция культуры клеток почек обезьяны, A549 и эмбрионального эпителия [67]. В настоящее время в указанной смеси клетки CaCo-2 заменены клетками A549.

Существует также другой подход, требующий введения в клетку гена чужеродного белка. Проникновение вируса в клетку запускает синтез фермента, количество которого можно измерить. Применение простейших иммуногистохимических приемов приведет к изменению цвета инфицированных клеток. Это позволяет идентифицировать зараженные клетки даже без специальной подготовки, а также делает возможным выявление инфекции на более ранних стадиях. Этот подход полезен для обнаружения как ДНК-, так и РНК-вирусов при использовании разных стратегий запуска синтеза фермента [72, 73].

Индукцибельная система для выделения HSV, носящая название ELVIS<sup>®</sup>, позволяет получить как положительные, так и отрицательные результаты в течение 16 ч [74]. В этой коммерческой системе трансгенные клетки почки новорожденного хомяка (ВНК) изменены введением вирусспецифичного промотора, управляющего экспрессией бактериального гена LacZ. Клетки, положительные по HSV, дают цветную реакцию при обработке аналогом лактозы X-Gal или другим подобным хромогенным субстратом. Система ELVIS<sup>®</sup> проста в ис-



пользовании, чувствительная и быстрая. Ее можно использовать для одновременного выявления, идентификации и типирования штаммов HSV из клинических образцов [75–78]. Тем не менее ELVIS® обладает меньшей чувствительностью по сравнению с наиболее чувствительными клеточными линиями, позволяющими выявлять вирус в очень низких концентрациях.

## КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

Клинические лаборатории обычно получают клеточные культуры от производителя в течение 1–2 недель с момента заказа. В ходе доставки культура может подвергаться стрессу в результате перепада температур, условия ее содержания могут быть нарушены при упаковке, хранении и погрузке, она может даже испортиться в силу различного рода задержек при доставке [79]. Помимо этого клиническая лаборатория должна заранее рассчитывать количество клеточных культур, которое будет израсходовано за определенный период времени. В случае непредвиденного резкого увеличения расхода культур, например при вспышке вирусных заболеваний, лаборатория может истратить весь свой запас клеточных культур и оказаться неспособной выполнять анализы до пополнения запасов культур.

Чтобы избежать ситуаций подобного рода, был разработан ряд замороженных клеточных культур. В настоящее время они свободно продаются и всего за несколько дней вырастают до плотности монослоя (среди них Frozen FreshCells™, Diagnostic Hybrids, г. Афины, шт. Огайо, США). Эти клетки можно хранить в замороженном состоянии до 6 мес. с момента получения и готовить к использованию по мере возникновения необходимости в дополнительном клеточном материале или в культуре, не поддерживаемой в лаборатории.

Готовые к использованию криоконсервированные монослои клеток доставляют в сухом льду и хранят при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение 6 мес. с даты изготовления (ReadyCells™, Diagnostic Hybrids, г. Афины, шт. Огайо, США). Культуральные емкости в случае монослоев полностью готовы к инокуляции спустя несколько минут после оттаивания при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  на водяной бане и заливки поставляемой в комплекте культуральной среды. Доступны замороженные монослои для культивирования хламидий (McCoy ReadyCells™), HSV и CMV (Hs27 ReadyCells™), а также различных респираторных вирусных патогенов (R-Mix ReadyCells™). В ходе сравнительных исследований было установлено, что при выявлении HSV и вирусов гриппа А и В замороженные монослои обладают чувствительностью, сравнимой с традиционными клеточными культурами [79].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение в культуре клеток долгое время оставалось золотым стандартом в диагностике вирусных заболеваний, однако с появлением современных методов, обладающих высокой чувствительностью

и требующих меньшего времени для проведения анализа, этот статус культуральных методов оказался под вопросом. Ограничения при использовании клеточных культур, рассмотренные в настоящей главе, включают длительное время, необходимое для развития вируса, наличие высококвалифицированного персонала для работы с клеточными культурами и идентификации цитопатогенных изменений, возможность присутствия в культуре эндогенных вирусов или других посторонних агентов, непостоянное качество результатов, а также снижение чувствительности культур после множественных пересевов. Некоторые вирусы не дают распознаваемых при микроскопии цитопатогенных эффектов в традиционных культурах клеток. При перевозке образцов на большие расстояния и неправильной обработке вирус может потерять жизнеспособность, что приведет к ложноотрицательному результату. При использовании клеточных культур возможно выделение вирусов, принадлежащих к представляющим опасность группам патогенности, культивирование которых в диагностической лаборатории недопустимо.

В число преимуществ культуральных методов входит возможность выявления широкого спектра вирусов и меньшая по сравнению с молекулярными методиками стоимость анализа, высокая чувствительность и специфичность и определение инфекционности вируса в пробе. При использовании молекулярных методов могут быть выявлены клинически незначимые инфекции, что приведет к избыточному лечению. Определение вируса-возбудителя инфекции в культуре имеет большое клиническое значение и используется некоторыми врачами в качестве оценки эффективности лечения. Помимо этого, культуральные методы способны выявлять вирусы, присутствие которых в пробе не предполагалось [80], что ускоряет выделение и описание неизвестных вирусов.

Недавние нововведения, коснувшиеся культуральных методов, позволили ускорить получение результатов до 1–2 сут., а также уменьшить трудозатраты и снизить требования к квалификации персонала и контролю качества результатов. Поскольку в большинстве лечебных учреждений диагностические возможности ограничены, внедрение ускоренных методов культивирования может в определенной степени заменить молекулярные методы, особенно в случае отправки образцов на анализ в специализированные учреждения.

Лабораториям, производящим диагностику гриппа и RSV, применение смешанных культур позволяет определять более широкий спектр патогенов с большей чувствительностью и за меньшее время. Для лабораторий, применяющих прямую иммунофлуоресценцию для выявления вируса герпеса или респираторных вирусов, необходима периодическая проверка результатов при помощи культуральных методов. Помимо этого, культуральные методы применяют для анализа образцов, непригодных для прямой иммунофлуоресценции, а также для исследования проб из нижних дыхательных путей или тканевых биоптатов на наличие сопутствующих вирусных инфекций или неожиданных вирусов.

Хотя молекулярные методы необходимы для выявления вирусов в ликворе и для проверки вирусной нагрузки крови, культуральные методы по-прежнему остаются важным инструментом в диагностике вирусных инфекций. Тем не менее центральная роль традиционных культуральных методов, использующих цитопатогенные изменения для выявления активности вируса, в настоящее время находится под вопросом. Существует целый ряд различных методов, основанных на применении клеточных культур, которые остаются важнейшим инструментом проверки качества результатов анализов на присутствие вируса и планирования хода лечения, особенно в случае проведения непосредственно в лечебном учреждении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML. Hsiung's Diagnostic Virology, 4th ed. New Haven, CT: Yale University Press, 1994.
2. Stinehardt E, Israeli C, Lambert R. Studies on the cultivation of the virus of vaccinia. *J Infect Dis* 1913; 13:204-300.
3. Rivers TM, Ward SM. Jennerian prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccine virus. *J Exp Med* 1935; 62:549-560.
4. Lloyd W, Theiler M, Ricci NI. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1936; 19:481-529.
5. Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949; 109:85-87.
6. Robbins FC, Enders JF, Weller TH. Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses in vitro on human embryonic tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 75:370-374.
7. Schmidt NJ. Tissue culture technics for diagnostic virology. In: Lennette EH, Schmidt NJ, eds. *Diagnostic procedures for Viral and Rickettsial Infections*, 4th ed. New York, NY: American Public Health Association, Inc., 1969:81-178.
8. Hsiung GD. Diagnostic virology: from animals to automation. *Yale J Biol Med* 1984; 57:727-733.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Viral Culture: Approved guideline*. Document M41-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
10. Forman MS, Valsamakis A. Specimen collection, transport, and processing: Virology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007:1284-1296.
11. Leland DS. *Clinical Virology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1996.
12. Hughes JD. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:150-175.
13. Minnich LL, Ray GC. Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. *J Clin Microbiol* 1987; 25:421-422.
14. Phipps P, McCulloch HBG, Miller HR, et al. Rapid detection of influenza virus infections in human fetal lung diploid cell cultures. *J Infect* 1989; 18:269-278.

15. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Rev Clin Microbiol* 2007; 20:49–70.
16. Mulholland EK. Measles in the United States, 2006. *N Engl J Med* 2006; 355:440–443.
17. Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, et al. Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1101–1103.
18. Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol* 1990; 64:700–705.
19. Leland DS. Parainfluenza and mumps viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007:1352–1360.
20. Knowles WA, Cohen BJ. Efficient isolation of mumps virus from a community outbreak using the marmoset lymphoblastoid cell line B95a. *J Virol Methods* 2001; 96:93–96.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Chikungunya fever diagnosed among international travelers — United States, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56:276–277.
22. Kyle JC, Fleischauer AT, Beard B, et al. Transmission of monkeypox among persons exposed to infected prairie dogs in Indiana in 2003, 2007.
23. Hsiung GD. Latent virus infections in primate tissues with special reference to simian viruses. *Bacteriol Rev* 1968; 32:185–205.
24. Smith KO. Adventitious viruses in cell cultures. *Prog Med Virol* 1970; 12:302–336.
25. Whiteman MD. Scope and practicality of in vivo testing for adventitious agents. *Dev Biol (Basel)* 2006; 123:147–152; discussion 183–197.
26. Merten OW. Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines — safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev Biol (Basel)* 2002; 111:233–257.
27. Fong CKY, Landry ML. An adventitious viral contaminant in commercially supplied A549 cells: Identification of infectious bovine rhinotracheitis virus and its impact on diagnosis of infection in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1611–1613.
28. Stanbridge E. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol Rev* 1971; 35:206–227.
29. Krizanova O, Rathova V. Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1969; 47:125–151.
30. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719–724.
31. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368–373.
32. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:6212–6216.
33. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al; SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1953–1966.
34. Hudson JB, Misra V, Mosmann TR. Cytomegalovirus infectivity: Analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology* 1976; 72:235–243.

35. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, et al. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19:917-919.
36. Gleaves CA, Wilson DJ, Wold AD, et al. Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16 hr postinoculation. *J Clin Microbiol* 1985; 21:29-32.
37. Gleaves CA, Lee CF, Bustamante CI, et al. Use of murine monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of varicella-zoster virus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1623-1625.
38. Espy MJ, Hierholzer JC, Smith TF. The effect of centrifugation on the rapid detection of adenovirus in shell vial. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:358-360.
39. Mahafzah AM, Landry ML. Evaluation of conventional culture, centrifugation culture, and immunofluorescence reagents for the rapid diagnosis of adenovirus infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12:407-411.
40. van Doornum GJJ, DeJong JC. Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens; comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2865-2868.
41. Olsen MA, Shuck KM, Sambol AR, et al. Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: a practical and highly sensitive method. *J Clin Microbiol* 1993; 31:422-425.
42. Marshall WF, Telenti A, Proper J, et al. Rapid detection of polyomavirus BK by a shell vial cell culture assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1613-1615.
43. She RC, Crist G, Billetdeaux E, et al. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective. *J Clin Virol* 2006; 37:151-155.
44. Slavin MA, Gleaves CA, Schock HG, et al. Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid after allogeneic marrow transplantation by centrifugation culture. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2776-2779.
45. Landry ML. Rapid Viral Diagnosis. In: Detrick B, Hamilton RG, Folds JE, eds. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2006:610-616.
46. Paya C, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J Clin Microbiol* 1987; 25:755-757.
47. Shuster EA, Beneke JS, Tegtmeier GE, et al. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application. *Mayo Clin Proc* 1985; 60:577-585.
48. Paya C, Wold AD, Ilstrup DM, et al. Evaluation of number of shell vial cultures per clinical specimen for rapid diagnosis of cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26:198-200.
49. Fedorko DP, Ilstrup DM, Smith TF. Effect of age of shell vial monolayers on detection of cytomegalovirus from urine specimens. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2107-2109.
50. Blanding JG, Hoshiko MG, Stutman HR. Routine viral culture for pediatric respiratory specimens submitted for direct immunofluorescence testing. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1438-1440.
51. Rabella N, Drew WL. Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1990; 28:806-807.

52. Espy MJ, Wold AD, Jespersen DJ, et al. Comparison of shell vials and conventional tubes seeded with rhabdomyosarcoma and MRC-5 cells for the rapid detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2751–2753.
53. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, et al. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1505–1508.
54. Brumback BG, Farthing PG, Castellino SN. Simultaneous detection of and differentiation between herpes simplex virus and varicella-zoster viruses with two fluorescent probes in the same test system. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3260–3263.
55. Engler HD, Pruess J. Laboratory diagnosis of respiratory virus infections in 24 hours by utilizing shell vial cultures. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2165–2167.
56. Brumback BG, Wade CD. Simultaneous culture for adenovirus, cytomegalovirus and herpes simplex virus in same shell vial by using three-color fluorescence. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2289–2290.
57. Navarro-Mari JM, Sanbonmatsu-Gamez S, Perez-Ruiz M, et al. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous culture of HEP-2, LLC-MK2, and MDCK cells in single vial. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2346–2347.
58. Huang YT, Turчек BM. Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:422–423.
59. Stevenson D, Hoffman J, Beckman KW, et al. Impact of Converting from Conventional Tube Cultures to Shell Vials: A Community Hospital Laboratory's Experience. Poster M-59, 23rd Annual Clinical Virology Symposium, Clearwater Beach, FL, April 29 — May 2, 2007.
60. Fong CKY, Lee MK, Griffith BP. Evaluation of R-mix fresh cells in shell vials for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4660–4662.
61. Barenfanger J, Drake C, Mueller T, et al. R-mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2001; 22:101–110.
62. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, et al. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004; 42:79–82.
63. St. George K, Patel NM, Hartwig RA, et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-mix cultures. *J Clin Virol* 2002; 24:107–115.
64. Fader RC. Comparison of the Binax NOW flu A enzyme immunochromatographic assay and R-mix shell vial culture for the 2003–2004 influenza season. *J Clin Microbiol* 2005; 43:6133–6135.
65. Weinberg A, Brewster L, Clark J, et al. Evaluation of R-mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2004; 30:100–105.
66. McRae KL, Bocchini JA Jr., Anga A, et al. Human Metapneumovirus Detection Using MGB Eclipse RT PCR and Mixed Cell Culture. Poster TP-45, 23rd Annual Clinical Virology Symposium, Clearwater Beach, FL, April 29 — May 2, 2007.
67. Buck GE, Wiesemann M, Stewart L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (super E-mix) with

- RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol* 2002; 25:S13-S18.
68. Huang YT, Hite S, Duane V, et al. CV-1 and MRC-5 mixed cells for simultaneous detection of herpes simplex viruses and varicella zoster virus in skin lesions. *J Clin Virol* 2002a; 24:37-43.
69. Olivo PD. Transgenic cell lines for detection of animal viruses. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:321-334.
70. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: Biochemistry, molecular biology, and function. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:35-58.
71. Huang YT, Yam P, Yan H, et al. Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2002b; 40:366-371.
72. Stabell EC, O'Rourke SR, Storch GA, et al. Evaluation of a genetically engineered cell line and a histochemical  $\beta$ -galactosidase assay to detect herpes simplex virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2796-2798.
73. Lutz A, Dyall J, Olivo PD, et al. Virus-inducible reporter genes as a tool for detecting and quantifying influenza A virus replication. *J Virol Method* 2005; 126:13-20.
74. Proffitt MR, Schindler SA. Rapid detection of HSV with an enzyme-linked virus inducible system™ (ELVIS™) employing a genetically modified cell line. *Clin Diag Virol* 1995; 4:175-182.
75. Patel N, Kauffmann L, Baniewicz G, et al. Confirmation of low-titer, herpes simplex virus-positive specimen results by the enzyme-linked virus-inducible system (ELVIS) using PCR and repeat testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3986-3989.
76. Turcsek BM, Huang YT. Evaluation of ELVIS™ HSV ID/typing system for the detection and typing of herpes simplex virus from clinical specimens. *J Clin Virol* 1999; 12:65-69.
77. Kowalski RP, Karenchak LM, Shah C, et al. A new 24-hour culture test for detecting herpes simplex virus from ocular samples. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:960-962.
78. Crist GA, Langer JM, Woods GL, et al. Evaluation of the ELVIS plate method for the detection and typing of herpes simplex virus in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:173-177.
79. Huang YT, Yan H, Sun Y, et al. Cryopreserved cell monolayers for rapid detection of herpes simplex virus and influenza virus. *J Clin Microbiol* 2002c; 40:4301-4303.
80. Mackenzie JS. Emerging viral diseases: An Australian perspective. *Emerging Infect Dis* 1999; 5:1-8.



# 8 ДИАГНОСТИКА ПРИ ПОМОЩИ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ

**Б. Форгани**

Bagher Forghani, Viral Immunoserology Section, Viral and Rickettsial Disease Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Наука не стоит на месте, и вирусологическая диагностика — не исключение, о чем свидетельствуют новые перспективные методики выявления вирусных заболеваний. Применение молекулярных методов, широко распространившееся за последние два десятилетия, усиление влияния биоинформатики на лабораторную практику и доступность коммерческих систем обнаружения антигенов позволили ускорить диагностику вирусных инфекций. Новым прорывом в диагностических методах может стать применение нанотехнологий для анализа клинических образцов. Методики на основе нанотехнологий сочетают исключительную чувствительность с высокой специфичностью реакции антител с антигенами, и могут не требовать выделения вируса. В настоящее время ведутся активные исследования в этом направлении. В то же время традиционные методики обнаружения вирусных антигенов по-прежнему используются в диагностических исследованиях [1–6].

Традиционно лабораторная диагностика вирусной инфекции требует выделения и идентификации возбудителя с использованием клеточных культур, лабораторных животных или куриных эмбрионов. Разработанные в последнее время клеточные линии позволили значительно ускорить выделение и идентификацию ряда важных вирусов человека, хотя этот процесс все еще остается весьма продолжительным [7–13]. Длительность определения вируса методом клеточных культур, который остается золотым стандартом выявления вирусов, обусловила необходимость разработки быстрого, селективного, воспроизводимого и чувствительного метода диагностики вирусных инфекций. Иммуные методы отлично удовлетворяют этим критериям благодаря способности обнаруживать вирусные антигены непосредственно в материале образца при использовании антител, меченных флуоресцеином, радиоизотопами или ферментом.

По сравнению с выделением в клеточной культуре у иммуных методов намного более узкий спектр выявляемых за один тест вирусов, а также они обладают еще некоторыми недостатками. Они выявляют только вирус, для которого есть меченые антитела, что не позволяет определять неизвестные вирусы либо вирусы, которых в пробе не ожидается. Помимо этого, небольшой объем клинического материала может ограничивать возможность прямого анализа присутствия



множества вирусов. Однако выделение вирусов в клеточной культуре — дорогостоящий и медленный метод, требующий использования и поддержания нескольких различных линий клеток, приготовления стерильных сред и высокой квалификации персонала. Выделение вирусов тем не менее обладает высокой специфичностью и способностью выявлять неизвестных возбудителей. Чтобы метод выделения вируса в клеточных культурах оставался в лабораторной практике, разрабатываются методики работы с новыми клеточными линиями (транзгенные и стволовые клетки). В различных областях биологии и медицины уже успешно используются линии стволовых клеток человека и разных других видов животных. Исследования этих линий могут привести к созданию клеток, поддерживающих быструю репликацию вирусов, что особенно важно для медленнореплицирующихся вирусов, а также выделять те вирусы, культивировать которые в настоящее время невозможно.

ЛАНЬ

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ

### Антиген

**Антигеном** называется вещество, способное при введении в организм животного вызывать образование антител и связывающееся с антителами, образование которых оно вызвало. Иммуногенность вирусных антигенов измеряется способностью вызвать специфический иммунный ответ и связываться с антителами. Все системы обнаружения вирусов основаны именно на этих принципах.

Антигенность того или иного вещества зависит от его физикохимических свойств, таких как молекулярная масса, элементный состав, пространственная структура, а также степень чужеродности для организма [14, 15]. Антитела связываются чаще всего со структурами на поверхности антигена. Области антигена, с которыми взаимодействуют антитела, носят название **эпитопов** или антигенных детерминант. Антигенная область белковой молекулы может содержать более одного эпитопа. Эпитопы зависят от конформации белка; они могут быть непрерывными (состоят из соседних по первичной структуре аминокислот) или прерывистыми (сложены аминокислотами, которые оказываются рядом после укладки белка в компактную глобулу). Размер эпитопа, судя по всему, достаточно велик и соответствует размеру гексапептида или пентасахарида, однако может быть и другим. В настоящее время считается, что эпитоп может быть как подвижным, так и жестким. В жестком состоянии затруднено взаимодействие с антителом, тогда как подвижность позволяет достичь наиболее энергетически выгодного взаимодействия. Реакция антиген—антитело обусловлена, помимо пространственной конфигурации, способностью участков их структуры образовывать электростатические, ван-дер-ваальсовы взаимодействия или водородные связи.

## Основы кинетики иммунных методов

Область связывания антигена на молекуле антитела называется **паратопом**. Специфическое взаимодействие эпитопа антигена и паратопа антитела лежит в основе специфичности иммунной реакции. Исследование кинетики и стехиометрии взаимодействия антигенов с антителами показало, что такие взаимодействия подчиняются тем же законам, что и любые другие биохимические взаимодействия. Эта особенность может быть использована для подсчета количества антигена или антитела в пробе. Это наблюдение легло в основу многих иммунологических методов, использующихся как для фундаментальных исследований взаимодействия антигенов с антителами, так и для выявления микробных и вирусных антигенов в клинических образцах. Обнаружение вирусных антигенов в клинических образцах — одна из наиболее широко применяемых современных методик [3, 6].

Наше понимание природы взаимодействия антигена и антитела остается весьма общим, особенно когда речь идет о таких сложных антигенах, как вирусные частицы. Предполагается, что антиген взаимодействует с антителом при помощи слабых нековалентных связей электростатической и ван-дер-ваальсовой природы и образование этого комплекса подчиняется закону действующих масс. Таким образом, принято считать, что реакция взаимодействия антигена с антителом достигает равновесия в лабораторных условиях, но не идет при этом до конца. Количество образующихся комплексов находится в пропорциональной зависимости от концентрации антител. Следует отметить, что, чем выше конформационное средство антигена и антитела, тем больше связей образуется. Эти связи дополняются гидрофобными взаимодействиями антигена и антитела. Поскольку реакция экзотермическая, связывание усиливается при понижении температуры, тогда как при повышении температуры происходит замедление реакции.

К важнейшим параметрам любого основанного на иммунных методах анализа относят аффинность и avidность антител. **Аффинностью** называют степень сродства антитела к антигену, а **авидностью** — силу связывания антигена после формирования комплекса. Высокая авидность требуется для создания специфичных и чувствительных твердофазных иммунных методов, поскольку в случае недостаточной стабильности комплекса с антигеном антитела будут отмыты в ходе необходимой в таких методах обработки различными жидкими реагентами. По этой причине авидность — важный фактор отбора при производстве антител для твердофазных иммунных методов, предназначенных для выявления вирусных антигенов в клинических образцах. На связывание антигена с антителом также оказывает влияние концентрация антител. Лучший способ повысить концентрацию антител — использовать только антитела нужной специфичности [15–17].

## ОПИСАНИЕ МЕТОДИК ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ

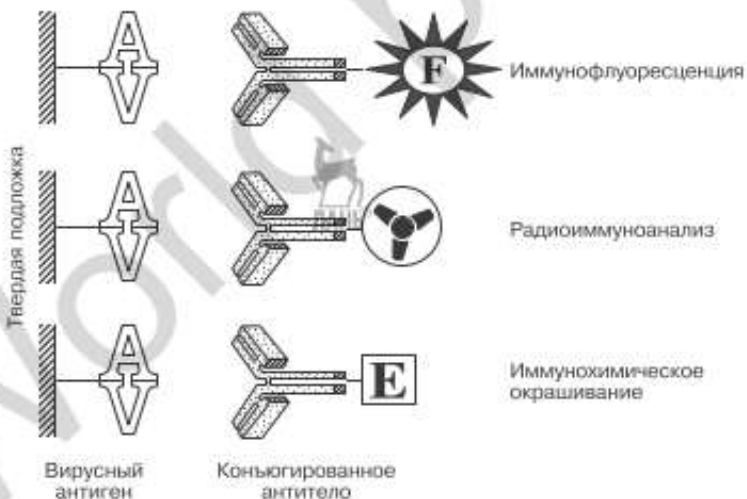
Методики, описанные в этой главе, широко используются в учреждениях здравоохранения для быстрого выявления вирусных антигенов в клинических образцах. Особое внимание уделим коммерческим наборам, предназначенным для выявления вирусных антигенов. Чувствительность и специфичность таких наборов была измерена целым рядом исследователей; здесь будут представлены только некоторые из полученных результатов. В целом эти исследования показывают, что большинство коммерческих систем выявления вирусных антигенов обладают чувствительностью от 60 до 90% и специфичностью 90–100% в сравнении с результатами, полученными при помощи других методов, таких как ПЦР [18–22].

### Выявление вирусных антигенов при помощи реакции иммунофлуоресценции

Иммунофлуоресцентное окрашивание стало стандартной методикой выявления вирусных антигенов в клинических образцах для многих лабораторий. К антителу можно присоединить множество флуорохромов без потери специфичности антитела или свойств флуорохрома. Меченные подобным образом антитела используют в различных тестах, направленных на обнаружение вирусного антигена или вирусспецифичного антитела. За последние годы возросли как чистота флуорохромов, так и качество оптических инструментов, что привело к более широкому распространению иммунофлуоресцентных методик в вирусологии. Впервые иммунофлуоресценция была введена в лабораторную практику в 1940-е гг., а в вирусологической диагностике она нашла свое применение еще спустя десятилетие. Круг применения метода был значительно расширен после разработки антител, ковалентно связанных с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) [23]. В настоящее время из флуорохромов чаще всего используют FITC, излучающий в зеленой области спектра, и изотиоцианат тетраметилродамина (TRITC), дающий оранжево-красную флуоресценцию. Несмотря на то что оба флуорохрома дают интенсивное излучение, флуоресцеин предпочтительнее по трем причинам: человеческий глаз наиболее чувствителен к зеленой области спектра, фоновая автофлуоресценция материала пробы обычно имеет красный цвет, а неспецифичное фоновое прокрашивание можно заблокировать обработкой такими красителями, как Эванса синий и конго красный. Не так давно были разработаны антитела, конъюгированные с красителями Су3 (зеленый) и Су5 (красный). Присутствие Эванса синего в растворе конъюгированных антител позволяет прокрасить все области клетки, а его красная флуоресценция хорошо контрастирует с зеленым свечением флуоресцеина. Следует, однако, помнить, что этот краситель канцерогенный и тератогенный, и избегать его попадания на кожу.

### Первичная и вторичная иммунофлуоресценция

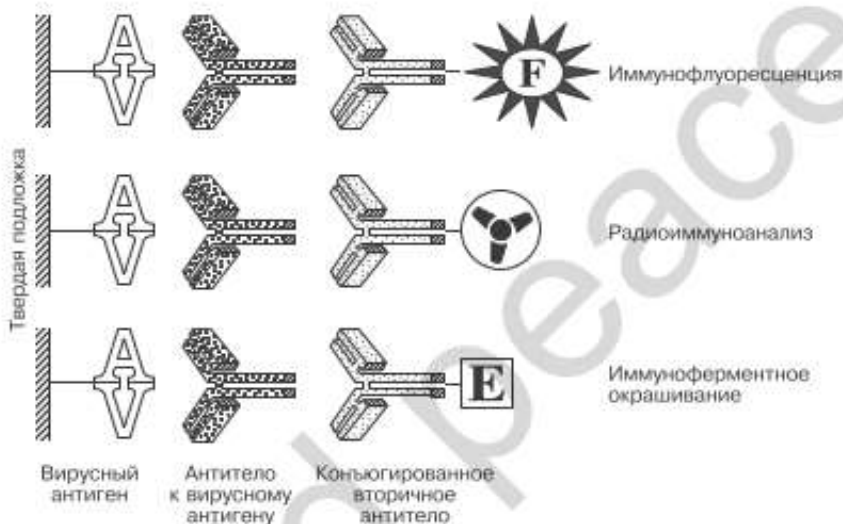
Первичную иммунофлуоресценцию (иногда ее называют прямой) удобно использовать для анализа клинических образцов на наличие вирусного антигена. Этот метод отличается простотой и надежностью и превосходит по этим параметрам все прочие методы иммуноокрашивания; он дает минимум неспецифических реакций, снижая количество ложноположительных результатов. Известный объем конъюгированных антител наносят непосредственно на исследуемый образец (инфицированная культура клеток, везикулярная жидкость, смывы тканей и т. д.), предварительно зафиксированный ацетоном на предметном стекле, после чего инкубируют препарат 30–45 мин при повышенной влажности и температуре 37 °С. Несвязавшиеся антитела отмывают, после чего препарат сушат, обрабатывают нефлуоресцирующим маслом и исследуют под микроскопом (рис. 8.1). Несмотря на необходимость наработки антител к каждому исследуемому вирусу и конъюгации их с флуорофором, высокая специфичность методики окупает это неудобство [24–28]. В настоящее время доступны коммерческие конъюгаты, специфичные к антигенам аденовирусов, CMV, HSV, вирусам гриппа А и В, вирусам парагриппа 1, 2 и 3, RSV и VZV [29].



**Рис. 8.1.** Принцип первичного иммуноокрашивания для выявления вирусных антигенов в тканях

Чувствительность к антигену при вторичном иммуноокрашивании несколько выше, но оно дает значительно больше неспецифических реакций. В случае вторичного (непрямого) иммуноокрашивания образец вначале обрабатывают вирусспецифичными первичными анти-

телами в течение 30–45 мин при 37 °С. Затем образец промывают буфером PBS и инкубируют в тех же условиях с конъюгированными вторичными антителами, специфичными к первичным. По завершении инкубации препарат отмывают, обрабатывают нефлуоресцирующим маслом и исследуют под микроскопом (рис. 8.2). Существует широкий выбор коммерчески доступных первичных и вторичных антител, комбинации которых позволяют разрабатывать самые разные методики анализа [29–31].



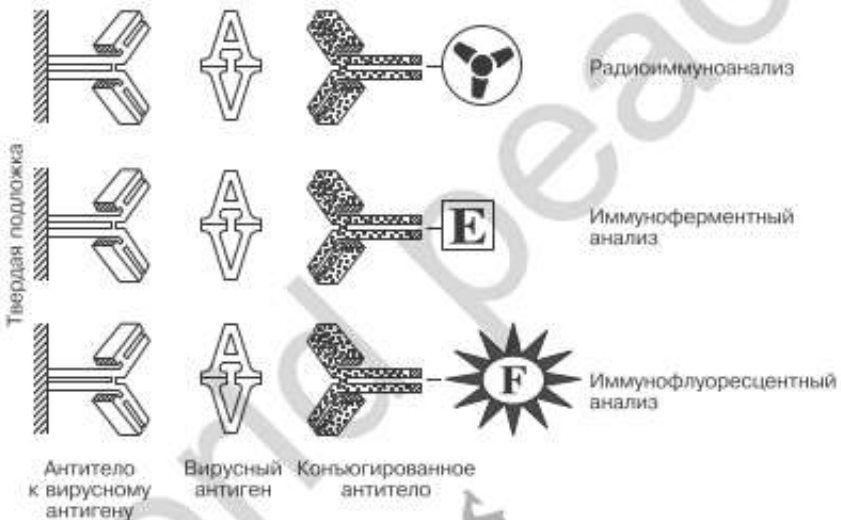
**Рис. 8.2.** Принцип вторичного иммуноокрашивания для выявления вирусных антигенов в тканях

### Выявление вирусных антигенов с использованием радиоиммунного анализа

В вирусологической диагностике радиоиммунные методы впервые были применены для определения антигена гепатита В, что привело к созданию нового поколения методов выявления антигенов вирусов гепатита. По мере развития иммуноферментных методик радиоиммунные методы со временем отошли на второй план. Основными недостатками радиоиммунных методов следует считать недолговечность реактивов, сложность работы с радиоактивными материалами, а также необходимость получения как лабораторией, так и производителем реагентов разрешения на работу с радиацией.

В методе прямого радиоиммуноанализа адсорбированные на твердой подложке антитела использовали для захвата вирусных антигенов из материала образца. Непрореагировавшие антигены затем удалялись отмывкой. После этого к комплексу антител с вирусными антигенами добавляли меченные иодом-125 антитела, специфичные

к вирусным антигенам. Несвязавшиеся вторичные антитела удаляли отмыжкой, после чего производили подсчет радиоактивности связавшихся меченых антител. Результат определяли, сравнивая показания с контролем. Этот метод известен также как сэндвич-радиоиммуноанализ. Имобилизованные и меченые антитела могут принадлежать животным как одного, так и разных видов (рис. 8.3). Недостаток этой системы в необходимости изготовления меченых антител для каждого определяемого антигена. При использовании методики вторичного радиоиммунного анализа первые три стадии остаются такими же, как у первичного, но второе антитело не несет метки [32, 33]. На четвертой стадии проводят обработку меченными радиоактивным иодом антителами, специфичными ко вторым антителам, связывающимся с иммобилизованным антигеном (рис. 8.4).



**Рис. 8.3.** Принцип прямого иммуноанализа, позволяющего выявлять вирусные антигены в жидких средах

### Выявление вирусных антигенов при помощи иммуноферментных методов

Иммуноферментные методы характеризуются практически идеальным сочетанием чувствительности, специфичности и технологичности, что делает их одними из лучших для обнаружения вирусных антигенов в клинических образцах [28]. Существует широкий выбор антител, конъюгированных с ферментами, различными по своим физико-химическим свойствам. В результате активности фермента происходит усиление сигнала, поскольку фермент расщепляет множество молекул субстрата; методики на основе связанных с ферментами антител могут быть как качественными, так и количественными, полностью

безопасны, в отличие от радиоиммунных методов, имеют большой потенциал для автоматизации, а используемые в этих методиках реагенты широко доступны на рынке и отличаются длительными сроками хранения. Спустя десятилетия исследований были выработаны два разных подхода к использованию конъюгированных с ферментами антител: иммуногистохимическое окрашивание препаратов тканей и твердофазный количественный иммуноферментный анализ [34, 35].

### *Имуногистохимическое окрашивание*

Традиционно для выявления в тканях вирусных антигенов использовали иммунофлуоресцентные методы. Однако с появлением антител, конъюгированных с ферментами, которые способны расщеплять хромогенные субстраты, образуют нерастворимый окрашенный продукт, для окрашивания на присутствие вирусных антигенов стали применять и иммуногистохимические методики. Продукты хромогенной реакции можно наблюдать невооруженным глазом или при помощи светового микроскопа; электронноплотные продукты заметны при электронной микроскопии. Наиболее широко в качестве конъюгированных ферментов используют пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу; эти ферменты применимы как для качественных, так и для количественных методик. Преимущество пероксидазы хрена в высокой ферментативной активности, способности расщеплять сразу несколько различных хромогенных субстратов, а также легкости визуализации продуктов реакции. Методики с применением пероксидазы хрена иногда называют иммунопероксидазным окрашиванием [35]. Иммуногистохимическое окрашивание широко применяется в цитологических и гистологических исследованиях, однако для обнаружения вирусных антигенов его применение ограничено.

### *Первичное и вторичное иммуногистохимическое окрашивание*

Первичное иммуногистохимическое окрашивание чаще всего применяют при необходимости быстрой диагностики, поскольку результаты при помощи этого метода получают в течение 2 ч. Клинические образцы, такие как смывы носоглотки, биоптаты тканей или соскобы, фиксируют ацетоном на предметных стеклах. Зафиксированный образец обрабатывают раствором конъюгированных с пероксидазой хрена антител. После инкубации с раствором его остатки отмывают буфером, затем добавляют раствор хромогенного субстрата и инкубируют при комнатной температуре до появления окраски. После образования достаточного количества окрашенного продукта производят контрокрашивание (необязательно), и микроскопируют [35] (см. рис. 8.1).

При производстве вторичного иммуногистохимического окрашивания неконъюгированные антитела к вирусным антигенам наносят в виде раствора на препарат и инкубируют при 37 °С в течение 30–

40 мин. После отмывки несвязавшихся антител препараты инкубируют со вторичными антителами, конъюгированными с ферментом и специфичными к первичным, которые связываются с образовавшимися на предыдущем этапе комплексами антигена и антитела. Несвязавшийся конъюгат отмывают, образцы инкубируют с хромогенным субстратом, после чего исследуют под микроскопом (см. рис. 8.2).

### *Количественный иммуоферментный анализ*

Существует два типа количественных методик, основанных на применении конъюгированных с ферментами антител: гомогенный и гетерогенный иммуоферментные анализы. При гомогенном иммуоферментном анализе измеряют повышение или снижение ферментативной активности в результате взаимодействия конъюгированных антител с антигеном. Для проведения теста не требуется удалять несвязавшийся конъюгат, а сам процесс длится всего несколько минут. Для этого анализа используют следующие ферменты: лизоцим, малатдегидрогеназу и галактозидазу. Чувствительность гомогенного иммуоферментного анализа сравнительно невелика; он не используется для выявления вирусных антигенов в клинических образцах.

При гетерогенном иммуоферментном анализе взаимодействие конъюгата с антигеном не влияет на активность фермента. Метод требует удаления несвязавшегося конъюгата и весьма длительного периода инкубации. Все количественные иммуоферментные методики в вирусологической диагностике основаны на этом экспериментальном протоколе, на нем базируются все методики твердофазного иммуоферментного анализа [34].

### *Твердофазный иммуоферментный анализ*

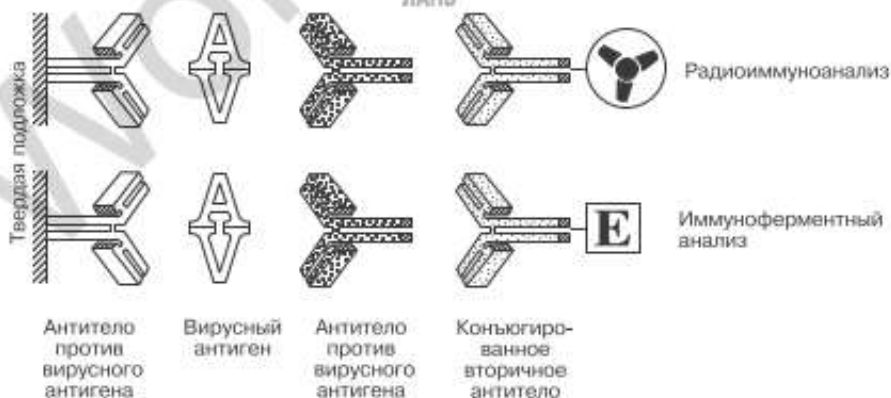
Большая часть количественных иммуоферментных методов использует твердый носитель и по этой причине называется твердофазным иммуоферментным анализом. Основное преимущество подобных методов — универсальность: их можно использовать для обнаружения как вирусных антигенов, так и противовирусных антител. Прямой и непрямой иммуоферментные анализы основаны на тех же принципах, что прямое и непрямое радиоиммунные исследования, и требуют фиксации вирусного антигена на твердой поверхности, покрытой антителами.

В случае прямых методов антитела, не несущие метки, иммобилизуют на твердой подложке (микротитровочные планшеты, мембраны, пробирки или кюветы). После адсорбции несвязавшиеся антитела удаляют. Потенциальные места неспецифического связывания белков блокируют при помощи различных белковых агентов (к примеру, бычьего сывороточного альбумина). Затем добавляют образец, инкубируют положенное время, несвязавшийся антиген отмывают; после чего



следует обработка конъюгированными антителами к вирусному антигену. Эти антитела связываются с антигенами, иммобилизованными на связанных с подложкой антителах. Несвязавшиеся конъюгированные антитела отмывают и добавляют субстрат. Ферментативную активность измеряют по скорости окисления или гидролиза субстрата (см. рис. 8.3). Количество образующегося продукта пропорционально количеству связавшегося конъюгата. Количество вирусного антигена в образце определяют путем сравнения с результатами для положительного и отрицательного контролей. Количество продуктов реакции можно определять при помощи спектрофотометрии, флуориметрии или хемолуминометрии в зависимости от используемого субстрата. Метод и его многочисленные варианты широко применяются для выявления целого ряда вирусов [36–43].

Метод непрямого иммуноферментного анализа используют, если необходима высокая чувствительность. Повышение чувствительности обусловлено связыванием сразу нескольких молекул вторичных антител с молекулой первичного, вирусспецифичного антитела. Проведение непрямого иммуноферментного анализа требует наличия двух выработанных животных у разных видов антител, которые не дают перекрестных реакций друг с другом. Вкратце процедура проведения анализа выглядит так: не несущее метки антитело к вирусному антигену адсорбируют на твердом носителе и добавляют клинический образец; после отмывки материала образца добавляют вирусспецифичные антитела, выработанные у животного не того же вида, из которого были получены иммобилизованные на твердой подложке. Затем добавляют вторичные конъюгированные антитела, специфичные ко вторым добавленным, после чего следует добавление субстрата и измерение ферментативной активности по описанной выше методике (см. рис. 8.4).

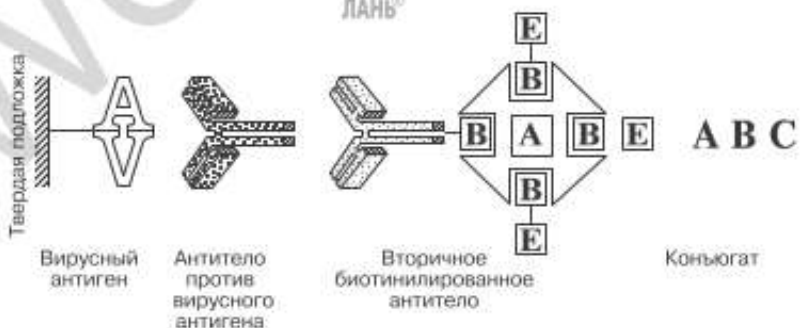


**Рис. 8.4.** Принцип вторичного иммуноанализа для выявления вирусных антигенов в жидких средах

## Системы на основе авидина—биотина

Использование комплекса авидина с биотином (АБК) может повысить чувствительность непрямого иммуноферментного анализа. Авидин (белок яйца) обладает высоким сродством к биотину (витамин низкой молекулярной массы), при этом одна молекула авидина способна связать четыре молекулы биотина. Стрептавидин (белок бактерии *Streptomyces avidinii*) обладает большей специфичностью к биотину, чем авидин, поскольку он не гликозилирован; именно стрептавидин предпочтительнее для проведения анализа. Стрептавидин может быть связан с различными ферментами, но чаще всего используют конъюгаты с щелочной фосфатазой и пероксидазой хрена. Образование АБК происходит независимо от каких бы то ни было иммунных реакций. Системы на основе авидина и биотина получили широкое распространение и применяются как в количественных, так и в качественных методах.

В системах на основе авидина и биотина используют конъюгированные с биотином первичные антитела, инкубируемые с образцом; по завершении инкубации несвязавшиеся антитела отмывают и к образцу добавляют связанный с ферментом стрептавидин. Он соединяется со связанным с антителами биотином, образуя очень прочный комплекс. Последующая обработка субстратом происходит так же, как описано выше (рис. 8.5). В случае использования непрямого метода производят инкубацию с тремя различными реагентами: первичное антитело инкубируют с вирусным антигеном, образовавшийся комплекс обрабатывают специфичными к первичному антителу вторичным антителом, связанным с биотином, после чего добавляют связанный с ферментом биотин-стрептавидиновый комплекс. Система авидин—биотин позволяет избежать или снизить неспецифические реакции в результате использования вторичных антител. Еще одно достоинство методики в том, что один и тот же комплекс фермента со стрептавидином и биотином может быть использован с любым биотинилированным антителом.



**Рис. 8.5.** Принцип непрямого иммуноферментного анализа для выявления вирусных антигенов с применением авидин-биотинового комплекса

Принципы, лежащие в основе количественных методик с применением комплексов биотина и стрептавидина, аналогичны описанному для количественного иммуноферментного анализа. В настоящее время производится авидин, связанный с различными флуорохромами, радионуклидами и ферментами [29].

### Метод агглютинации латексных частиц



Метод агглютинации основан на слипании покрытых антителами латексных микросфер в присутствии вирусных антигенов. Специфические моноклональные или поликлональные антитела либо адсорбируются на поверхности микросфер, либо связывают с ними ковалентно. Обычно в качестве таких микросфер берут латексные частицы (нанометрового размера). Материалами для микросфер служат полистирол, полиакрилат, полиакролеин или полиакриламид. Методика агглютинационного теста очень проста и не занимает много времени. Однако ее чувствительность и специфичность ниже, чем у иммуноферментного анализа из-за неспецифической агглютинации клинических образцов. Для проведения теста покрытые антителами микросферы смешивают с разведенными клиническими образцами на предметном стекле. Наличие агглютинации заметно невооруженным глазом спустя 10–15 мин. Метод агглютинации используют для выявления аденовирусов, респираторного синцитиального вируса, а также ротавирусов. В настоящее время на рынке представлен целый ряд наборов для проведения агглютинационного тестирования, различающихся по чувствительности и специфичности [44–47].

### Выявление вирусных антигенов при помощи мембранного иммуноферментного анализа

Мембранный иммуноферментный анализ известен также под названием кассетного. Кассетный анализ стал популярным методом для обнаружения антигенов, особенно при тестировании на единственный инфекционный агент (например, вирус гриппа). Это вызвано тем, что на единицу площади нитроцеллюлозной ( $80 \text{ мг/см}^2$ ), нейлоновой ( $480 \text{ мг/см}^2$ ) или другой модифицированной мембраны может быть связано большое количество антител, что сильно повышает чувствительность и сокращает время проведения анализа до нескольких минут. Чаще всего мембрану закрепляют на дне жесткого пластикового сосуда, который, в свою очередь, прикреплен к адсорбирующему материалу, способному впитывать всю излишнюю жидкость. Все реагенты добавляют при помощи пипетки. Антитела к вирусному белку и контроль помещают на одну мембрану в одной емкости или на мембраны в разных емкостях на одной подложке. Для визуализации сигнала чаще всего используют щелочную фосфатазу. Неспецифические взаимодействия устраняют блокирующим реагентом, как описано выше.

На практике разведенные клинические образцы и прочие реагенты добавляют так же, как и в случае твердофазного иммуноферментного

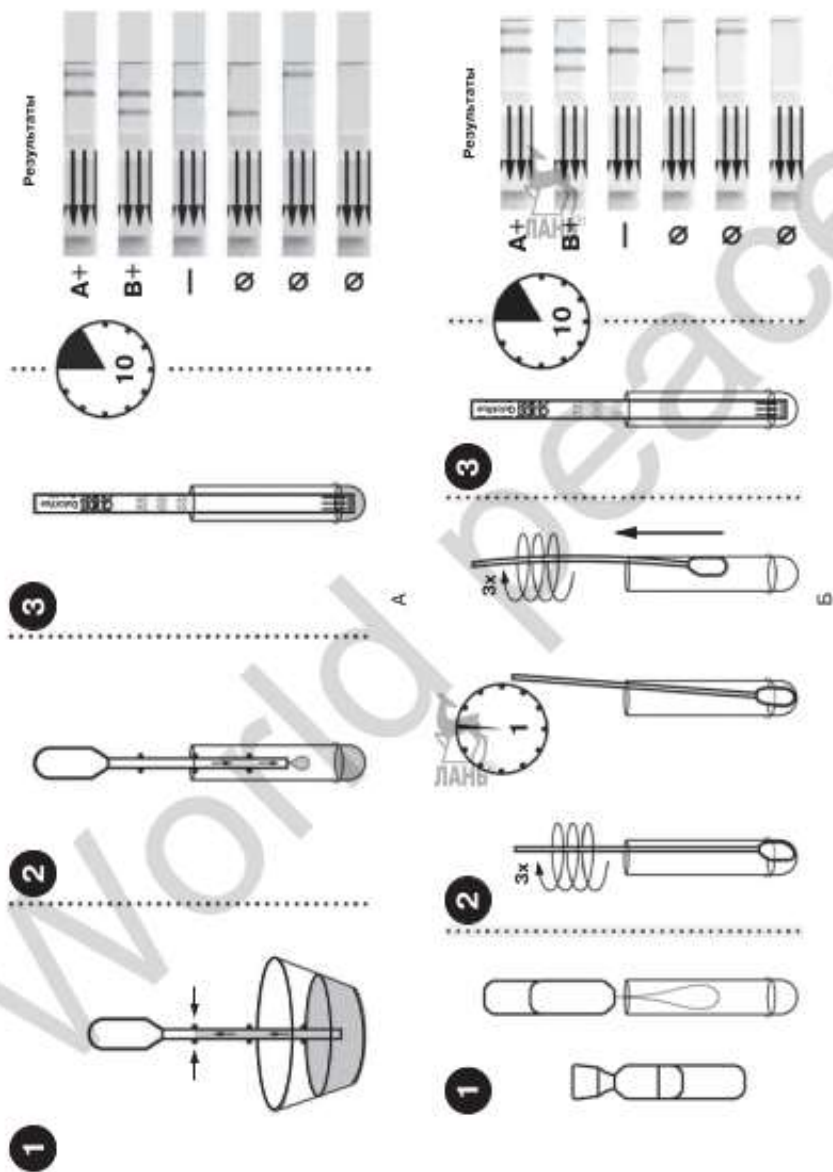
анализа. Продукты хромогенной реакции окрашены и нерастворимы, вследствие чего легко видны невооруженным глазом. В настоящее время на основе метода разработаны коммерческие наборы для выявления респираторных вирусов. В некоторых из таких наборов есть цветовая таблица, облегчающая трактовку результата и позволяющая выявить образцы с пограничным уровнем сигнала. Такие образцы перед вынесением заключения следует проверять повторно.

### *Иммунохроматография латерального тока*

Иммунохроматография латерального тока представляет собой колориметрический метод, использующий мембранную полоску, покрытую предварительно антителами против вирусных белков, и предназначенный для непосредственного визуального выявления вирусных антигенов в клинических образцах. В основе метода лежит применение окрашенных частиц (к примеру, красных), связанных с антителами к вирусному белку, которые после добавления экстракта клинического образца движутся вдоль тест-полоски. Поток несет смесь материала образца и красных частиц, покрытых антителами, к вирусному белку, последовательно через линии связывания антител к вирусному белку и контрольную. В случае присутствия вирусного антигена в образце антитела в жидкой фазе связываются с ним, и образовавшийся комплекс движется дальше вместе с фронтом жидкости, пока не свяжется контрольной полосой с антителами, образовав красную линию. После нанесения жидкого образца вместе с током жидкости начинают движение также и синие частицы контроля. По достижении фронтом контрольной полосы частицы контроля связываются с ней, образуя синюю линию. Таким образом, если в образце присутствуют вирусные антигены, по завершении теста можно наблюдать две линии: красную на тестовой полосе и синюю на контрольной. При отсутствии вирусных антигенов в образце проявится только контрольная синяя линия. Метод применяют для обнаружения различных вирусов. Существуют коммерческие наборы на основании этого метода, предназначенные для выявления RSV и вирусов гриппа А и В, продаваемые под торговыми марками QuickVue (Quidel Corporation) и BinaxNOW (Iverness Medical). На рис. 8.6 показано использование тестов QuickVue для обнаружения вирусных антигенов гриппов А и В в смывах или мазках из носоглотки. Показатели точности этих методов были исследованы целым рядом групп, в результате чего было установлено, что их чувствительность составляет 54–95%, а специфичность — 85–100% по сравнению с эталонным методом [48–57].

### *Оптические иммунные методы*

Основные принципы оптических иммунных методов те же, что и для мембранного иммуноферментного анализа, однако вместо мембраны здесь используется биосенсор из силиконовой пленки. Эти методы позволяют производить прямую визуальную регистрацию изменения



**Рис. 8.6** (см. цветную вставку). Использование системы Quidius для выявления присутствия антигенов вирусов гриппа А и В в мазках или смывах из носоглотки

оптической плотности пленки. Пленка покрыта антителами к вирусному антигену, и в результате связывания антигена антителами и происходит изменение оптической плотности. Для проведения теста клинический образец растворяют в воде и наносят на пленку, после чего отмывают и наносят конъюгированные антитела и хромогенный субстрат. Ферментативная реакция увеличивает толщину пленки. Изменение толщины влияет на ход лучей внутри пленки, что визуально воспринимается как изменение цвета. Положительный результат выглядит как появление фиолетовых точек на изначально желтой поверхности. В случае отрицательного результата толщина мембраны остается неизменной и цвет не меняется [49, 50, 58].

### Иммунофлуориметрия в реальном времени

Иммунофлуориметрия в реальном времени — очень чувствительный метод обнаружения вирусных антигенов в клинических образцах. В основу этого метода положено измерение выжигания флуоресцирующих веществ при облучении. Обычно время выжигания фоновой флуоресценции белков и других компонентов клинических проб примерно 3–4 наносекунды (нс). Поскольку изотиоцианат флуоресцеина имеет практически такое же время выжигания (4,5 нс), его невозможно выявить этим методом. Однако время выжигания редкоземельных металлов лантаноидов больше — от тысяч до миллионов наносекунд [59]. Наиболее часто в методике используют трехвалентный лантаноид европий ( $\text{Eu}^{3+}$ ) с временем выжигания порядка одной микросекунды и совершенно четко отличаемый от фоновой автофлуоресценции образца. Помимо этого, за счет стоковского смещения длина волны излучаемого света для европия (613 нм) сильно отличается от длины волны возбуждающего света (360 нм).

Принцип иммунофлуориметрии в реальном времени в основном похож на прямой иммуноферментный анализ с некоторыми модификациями. В этой методике используются микротитровочные планшеты, покрытые первичными антителами и обработанные блокирующим агентом. Клинический образец и антитела к нему добавляют одновременно. По завершении инкубации несвязавшиеся компоненты отмывают. После этого добавляют усиливающий раствор и измеряют флуоресценцию при помощи одnofотонного флуориметра. Этот метод используется для выявления многих вирусов и недавно был применен для создания новых методов, основанных на нанотехнологии [59, 60].

### Белковые чипы

Необходимость создания технологии, позволяющей быстро проводить параллельный анализ множества образцов на присутствие вирусных белков в малом объеме пробы, в последнее время становится все более актуальной. Белковые чипы имеют большое значение в качестве инструмента контроля потенциально пандемичных вирусов, таких как вирус птичьего гриппа. Способность одновременно выявлять не-

сколько антигенов может найти применение во многих областях, среди которых диагностика вирусных инфекций. Это важно, поскольку обычно объем клинической пробы невелик и провести много тестов невозможно. Белковый микрочип дает возможность регистрировать до 100 веществ в одной пробе. Для построения чипа белки наносят на стекло в определенном порядке в форме точек диаметром в несколько миллиметров. Каждый чип состоит из нескольких сотен таких точек. Этот метод можно использовать для обнаружения как вирусных антигенов, так и противовирусных антител. Антитела, нанесенные на белковый микрочип, способны выявлять присутствие антигена для концентрации менее 1 нг/мл [61]. Создан мультиплексный белковый чип для обнаружения множества антигенов и антител к вирусам гепатита человека [62].

### *Мультиплексные методики*

Наиболее простая версия белкового микрочипа — это мультиплексный тест. Этот формат исследования позволяет выявлять антигены нескольких вирусов в одном образце в ходе одной и той же реакции. Хотя микрочипы из нуклеиновых кислот широко применяются уже в течение нескольких лет, белковые чипы также могут найти применение, поскольку они позволяют обнаруживать и измерять количество вирусного антигена или антител к нему.

В настоящее время белковые чипы устроены примерно так же, как и количественный иммуноферментный анализ. Исходно производят иммобилизацию антител к вирусным антигенам, после чего наносят клинический образец, а образовавшиеся в результате комплексы антигена и антитела визуализируют при помощи меченых антител. В настоящее время на рынке представлено несколько флуориметрических платформ, различающихся по технологии и характеру сигнала [63–65].

Один из наборов для мультиплексного анализа представила компания Luminex. Он основан на применении микросфер и мультиплексной регистрации результатов для одновременного обнаружения до 100 веществ в пробе. Комплект состоит из 100 различных наборов микросфер одинакового диаметра, проточного цитометра, регистратора, предназначенного для 96-луночного планшета, а также программного обеспечения. Отдельные наборы микросфер могут быть модифицированы антигенами, антителами или олигонуклеотидами, закрепленными на поверхности микросферы амидной связью. В настоящее время Luminex выпускает коммерческий набор xTag Respiratory Viral Panel (xTag RVP), предназначенный для выявления ряда респираторных вирусов и определения их подтипа [63–65].

### **Диагностические методики на основе нанотехнологий**

Диагностика с применением нанотехнологий может положить начало новому поколению методик благодаря своей высочайшей чувстви-

тельности, высокой иммунной специфичности, большому потенциалу разработки мультиплексных методов, а также различных комбинаций приборов, сигналов и экспериментальных протоколов. Описано несколько методик, основанных на нанотехнологиях и предназначенных для обнаружения вирусных антигенов в клинических образцах. Но не было проведено сравнения различных характеристик этих методик, поэтому единой стандартной методики пока не существует. Подходы подобного рода применяли для выявления аденовирусов, HBV, ВИЧ, HSV-1 и RSV; специфичность и чувствительность для каждого патогена различались [66–74].

## **ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РАБОТУ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

На чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов, получаемых при помощи иммунологических методов, влияет целый ряд факторов. Разработкой методик контроля и подтверждения качества результатов для получения и подтверждения лицензии в учреждениях надзора в США занимается фонд Good Laboratory Practice. Согласно разработанным там требованиям, каждый опыт должен иметь положительный и отрицательный контроли и производиться в точном соответствии с рекомендованным протоколом.

При использовании коммерческого набора следует максимально точно следовать процедурам, указанным производителем. Для некоторых из недавно одобренных FDA диагностических наборов не нужно проводить постоянные проверки. Эти наборы просты в применении и не требуют сложного оборудования. Тем не менее специальное исследование выявило ряд серьезных проблем, связанных с квалификацией персонала, документацией, контролем качества и другими параметрами [75].

### **Отбор образцов**

Обязательное условие успешного диагностического тестирования — наличие подходящего клинического образца, отобранного в соответствии со стандартами, а также верная информация относительно возможного присутствия патогенов в образце [76–79]. Все эти факторы оказывают влияние на конечный результат иммунологического метода. Для конкретных групп вирусов информация по отбору и транспортировке образцов приведена в соответствующих главах.

### **Антитела**

Чувствительность и специфичность иммунологического метода зависят во многом от качества антител. Источником IgG может служить гипериммунная сыворотка или моноклональные антитела (mAb). Антисыворотка должна иметь высокий титр, высокую аффинность и авидность и должна специфически реагировать с иммунизирую-



щим вирусом. Чистота вторичных и конъюгированных антител важна в той же степени, что и первичных. Оптимальные рабочие концентрации определяют для каждого антитела отдельно. Следует тестировать серийные разведения первичных антител, сопоставляя их с вторичными. В результате такого подбора можно обнаружить более одной комбинации оптимальных концентраций. Меньшая концентрация первичной антисыворотки, к примеру, может быть компенсирована более высокой концентрацией конъюгата. Помимо очевидной экономии реагентов большие разведения могут помочь устранить неспецифические реакции.

Если предполагается готовить антисыворотку в лаборатории, необходимы лабораторные животные, вирусы, культуры клеток и среды для их роста. Возможно использовать животных и клетки, принадлежащие к одному и тому же или родственным видам. Можно, наоборот, выращивать вирус на культуре гетерологических клеток; в этом случае следует использовать высокоочищенный вирус, свободный от фрагментов клеток. Посторонние антитела удаляют при помощи многократной адсорбции на неинфицированных клеточных культурах.

С появлением высокоспецифичных моноклональных антител, производимых при помощи гибридизации клеток, многие проблемы, связанные с использованием поликлональных антисывороток, были решены [80]. Несмотря на то что использование гибридов требует больших трудозатрат и высококвалифицированного персонала, обученного работе с клеточными культурами, эта технология позволяет производить моноклональные антитела высокой степени очистки практически непрерывно. Некоторые моноклональные антитела тем не менее обладают низкой аффинностью и авидностью, нестабильны при различных манипуляциях, но после соответствующего отбора возможно производство моноклональных антител с нужными параметрами. Низкая аффинность или авидность могут приводить к отмывке связанного антигена, а также к диссоциации уже сформированного комплекса антигена с антителом. В любом случае результатом будет слишком слабый сигнал или ложноотрицательный результат.

Чувствительность индивидуального препарата антител можно повысить, смешивая несколько моноклональных антител, связывающихся с разными эпитопами, в результате чего чувствительность становится равной или выше чувствительности полученных из гипериммунной сыворотки IgG. Выпускается множество качественных моноклональных антител к различным вирусным антигенам, хотя часто они дорогие. Моноклональные антитела все больше вытесняют поликлональные в методиках выявления вирусных антигенов [29].

## Конъюгаты

Ранее большинство конъюгатов готовили непосредственно в диагностической лаборатории. Приготовление конъюгатов требует отличной подготовки персонала и наличия вивария, что ограничивало приме-

нение большинства методик крупными диагностическими центрами. В настоящее время, однако, производятся наборы для мечения антител, что позволяет приготовить требуемый конъюгат даже в неподготовленной лаборатории [29].

Качество конъюгата определяется качеством исходных антител и процедурой введения метки. Аффинность, авидность, концентрация и специфичность конъюгата лимитируют чувствительность и специфичность теста. Основным преимуществом использования фермента в качестве метки является амплификация сигнала, компенсирующая сниженную эффективность конъюгации. Все флуорохромы и радионуклиды генерируют постоянный либо затухающий со временем сигнал. Ферменты же, напротив, увеличивают интенсивность сигнала с течением времени, что значительно повышает чувствительность.

### Флуоресцентная микроскопия

Первое поколение флуоресцентных микроскопов было основано на применении проходящего света. В этих микроскопах свет проходил через возбуждающий фильтр и отражался в темнопольный конденсор, после прохождения которого падал на образец. Флуоресцентный сигнал проходил через отсекающий фильтр к окуляру. В настоящее же время практически все микроскопы в лабораториях используют систему эпифлуоресценции и укомплектованы интерференционными фильтрами Пюэма (Ploem). В микроскопах этого типа вертикальный осветитель располагается над образцом. Возбуждающий свет после прохождения светофильтра падает на дихроическое зеркало, отражающее свет требуемой длины волны через объектив на образец. Флуоресцентный сигнал проходит через объектив, дихроическое зеркало и отсекающий фильтр, после чего попадает в окуляр. Для флуоресцентной микроскопии необходимо наличие источника света заданной длины волны. Наиболее распространены в качестве источников света для эпифлуоресцентной микроскопии ртутно-разрядные лампы, галогенные кварцевые лампы и ксеноновые лампы высокого давления со спектром излучения, близким к дневному свету. Часто считается, что для возбуждения флуорохрома необходим ультрафиолетовый свет, но это не обязательно так. Например, пик поглощения FITC находится в области 495 нм, а излучения — 525 нм. При помощи интерференционных фильтров отсекается до 85% света с длиной волны за пределами интервала 400–500 нм, что лежит в видимой, а не ультрафиолетовой части спектра. Для утвержденного СИА ИФА-теста обязателен контроль качества результатов, который подразумевает регулярное техобслуживание микроскопа и настройку света.

### Твердые подложки

Впервые твердую подложку применили для радиоиммунного анализа, это позволило исключить этап разделения связавшегося и свободного антигена. В настоящее время используются несколько вариантов твер-



дой подложки, среди которых разнообразны изделия из полистирола и поливинилхлорида. Микротитровочные планшеты из этих материалов наиболее распространены, особенно при анализе нескольких образцов. Они устраняют необходимость индивидуальных реакционных сосудов. Работу с микротитровочными планшетами можно автоматизировать, совместить с колориметрическими или флуориметрическими детекторами и программным обеспечением для анализа [32, 34].

Точная природа взаимодействия белков с твердыми подложками неизвестна. Пластики, используемые для изготовления микротитровочных планшетов, как правило, гидрофобны, и предположительно, иммобилизация белков на их поверхности обусловлена гидрофобными взаимодействиями. Для термодинамической стабильности белки взаимодействуют с пластиком своими гидрофобными участками. Для достижения состояния с минимумом энергии белок может «прятать» на поверхности пластика участки, в норме экспонированные в раствор. На чувствительность метода могут влиять структурные изменения антигенов или антител, иммобилизуемых на подложке. В силу этого успех иммобилизации зависит от природы подложки, структуры белка и условий иммобилизации.

Пока не ясно, влияет ли pH на иммобилизацию. В ранних исследованиях была показана такая зависимость, поэтому сейчас иммобилизацию чаще всего производят в карбонатном буфере, однако иммобилизация также может быть успешной и в буферах с меньшим pH. По всей видимости, иммобилизация на мембранах сильнее подвержена влиянию pH, чем иммобилизация на микротитровочных планшетах.

Чувствительность твердофазных иммунных методов зависит от количества адсорбированного на подложке антитела. Антитело, иммобилизуемое на подложке, должно быть очищено до концентрации 10–12 мкг/мл; в одну ячейку планшета добавляют обычно 50–100 мкл раствора. Чаще всего предварительная обработка микротитровочного планшета не дает выигрыша в чувствительности, а может проявляться даже обратный эффект. Обработка планшета поли-L-лизинном усиливает неспецифическое связывание белков. Еще один лимитирующий фактор — гетерогенность связывания антител, наиболее характерная для планшетов, однако наблюдающаяся и для других твердых подложек. Химическая обработка микротитровочных планшетов снижает, но не ликвидирует неравномерность связывания антител. В жидкой фазе антиген взаимодействует с антителом намного быстрее, чем в твердой. По этой причине все твердофазные методы требуют сравнительно долгого времени инкубации, что увеличивает вероятность неспецифического ответа [34].

## Ферменты

Ферменты представляют собой высокоэффективные биогенные катализаторы — вещества, ускоряющие химические реакции, но не расходующиеся при этом. Одна молекула фермента может расщепить

миллионы молекул субстрата в минуту без потери активности. Продукт реакции можно обнаружить визуально или при помощи микроскопа, колориметра или флуориметра. Чувствительность всех иммуноферментных методик зависит от кинетики взаимодействия антигена с антителом и кинетики ферментативной реакции. Таким образом, идеальный фермент для иммуноферментного анализа значительно ускоряет катализируемую реакцию, стабилен, небольшого размера, легко связывает антитело; его субстраты стабильны, и он производится промышленным методом. Для диагностических целей существуют хорошо известные и стабильные ферменты, производимые промышленностью. Для иммуноферментных методов чаще всего используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и глюкоксидазу, а также  $\beta$ -галактозидазу; эти ферменты удовлетворяют большинству указанных критериев. Для иммуногистохимии и количественного анализа чаще всего применяют щелочную фосфатазу и пероксидазу хрена [35].

## Субстраты

На чувствительность иммуноферментного анализа большое влияние оказывают чистота и срок годности применяемого субстрата; она также зависит от растворимости получаемых в ходе реакции продуктов, которые должны быть растворимы для количественного метода, и нерастворимы для качественного, а также от стабильности продукта. Возможность выявления этих продуктов зависит от их молярного коэффициента экстинкции, составляющего обычно  $10^5$ – $10^6$  для окрашенных продуктов и  $10^8$  для флуоресцирующих. В зависимости от методов выявления продуктов ферментативной реакции иммуноферментные методы можно разделить на несколько категорий.

Имуногистохимический анализ требует хромогенного субстрата, распадающегося с образованием нерастворимых продуктов, способных диффундировать от места локализации меченных ферментом антител. Субстратом пероксидазной реакции служит пероксид водорода, у него несколько хромогенных доноров электронов, самые распространенные из них тетрагидрохлорид 3,3'-диаминобензидина (ДАБ), 3-аминометилкарбазол (АМК) и 4-хлор-1-нафтол (4-C-1 N). ДАБ образует коричневый осадок, растворимый в спирте. АМК дает красноватый осадок, а 4-C-1 N — темно-синий, оба растворимы в спирте и органических растворителях, они требуют заливочных сред на водной основе. Любое иммунопероксидазное окрашивание можно усилить, добавив ионов металлов, например в виде тетраоксида осмия. Допустимо приготовление стоковых растворов любого из этих хромогенных субстратов для повседневного использования. ДАБ и АМК обладают канцерогенным эффектом, а 4-C-1 N токсичен, с этими веществами следует работать с осторожностью. На рынке представлены неканцерогенные и нетоксичные субстраты. Один из безопасных и универсальных субстратов — хромоген HistoMark® (Kiregaard and Perry Laboratory, Гейсерсбург, шт. Мэриленд, США), в форме гото-

вого к использованию раствора для различных вариантов иммуногистохимического окрашивания для выявления вирусных антигенов. В реакции нейтрализации бляшкообразования вируса эпидемического паротита этот хромоген был использован для визуализации и подсчета вирусных плашек в 48-луночной планшете. Хромоген давал темно-коричневые точки в клетках, инфицированных вирусом и практически без неспецифического окрашивания; чувствительность метода с его участием оказалась выше, чем с применением АМК [81]. Наиболее часто при количественном иммуноферментном анализе субстратами пероксидазы хрена выступают дигидрохлорид *o*-фенилендиамида, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота).

В качестве безопасных хромогенов для щелочной фосфатазы, продукты распада которых видны в световой микроскоп, используют различные азокрасители. Окрашенный продукт фосфатазной реакции дает соль нафтола, которая конденсируется с солью диазония. Альтернативой для реакций блота, обладающей повышенной чувствительностью, является применение реактива МакГрейди — смеси 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата и NBT. Темно-синий осадок, изменяющий цвет на коричневый, отлично визуализует связавшийся конъюгат [82]. Для количественного иммуноферментного анализа в качестве субстрата щелочной фосфатазы используют *p*-нитрофенилдифосфат, который хорошо растворим и доступен в форме таблеток.

## Неспецифические реакции

Эффективный иммунный метод вне зависимости от конкретной методики эксперимента должен быть специфичным, воспроизводимым и давать интенсивный сигнал, легко отличимый от фоновых шумов. Для разных методик характерны разные неспецифические реакции, имеющие разные причины и интенсивность. Одни присущи любому методу, а другие обусловлены конкретной применяемой методикой. Неспецифические реакции могут сильно влиять на интерпретацию результатов, поэтому нужно выявлять и контролировать их возникновение. Неспецифические реакции можно разделить на иммунологическую неспецифичность и неспецифичность метода [83].

### *Иммунологическая неспецифичность*

Использование соответствующих контролей, среди которых инфицированные и неинфицированные клетки и преиммунные и постиммунные антитела, позволяет на этапе тестирования выявить большую часть проблем, связанных с неспецифичностью. Почти все трудности, связанные с неспецифичностью антител, можно решить, используя при производстве антител высокоочищенные антигены. Поликлональная антисыворотка содержит смесь антител, способных неспецифично связываться с материалом образца, особенно при высокой концентрации. Некоторые неспецифические реакции можно ослабить, уменьшая

концентрацию антител, а неспецифичные антитела можно удалить адсорбцией на неинфицированных клетках. Помимо этого, избыточная концентрация антител может ингибировать иммунологические реакции. Этот эффект имеет решающее значение при использовании одного разведения. Неспецифичные компоненты можно ингибировать нейтральным белком, нормальным иммуноглобулином или нормальной сывороткой того же вида, у которого получены меченые антитела. Инфекция клеточной культуры, особенно герпесвирусами (например, CMV), способна вызвать появление неспецифических Fc-рецепторов. Поэтому не используют конъюгаты, изготовленные из антител, полученных из сыворотки. Связывания Fc-фрагмента можно избежать при помощи меченых фрагментов антител F(ab')<sub>2</sub>. Примерно так же эффективны, но гораздо дешевле козы антитела, намного хуже связывающиеся с Fc-рецепторами, чем кроличьи [84]. Проблем, связанных с наличием индуцированных вирусом Fc-рецепторов при тестировании на CMV, HSV и VZV, можно избежать, применяя моноклональные антитела к немедленным вирусным белкам [24, 29, 85].

### *Неспецифичность метода*

При доскональном знании особенностей тест-системы можно учесть и предотвратить большую часть причин неспецифических реакций. Усложнить интерпретацию результатов теста может связывание иммунореагентов вследствие электростатических взаимодействий с участками, не несущими вирусного антигена, при иммуногистохимическом окрашивании или связывание на поверхности мембраны или микротитровочного планшета. Чтобы избежать этого, чаще всего перед инкубацией с антителами реагенты и растворы конъюгатов обрабатывают блокирующим веществом, а также блокирующее вещество добавляют ко всем растворам антител, что заметно сокращает общее время проведения теста. В качестве блокирующих могут выступать нормальные сыворотки козы, лошади или крупного рогатого скота, сывороточный альбумин, желатин или казеин.

Обычно меченные флуоресцеином антитела несут общий отрицательный заряд и хорошо связываются с положительно заряженными компонентами клетки. Некоторые фиксирующие препараты, такие как производные альдегидов, могут увеличивать положительный заряд образца, что повышает вероятность развития неспецифической реакции. Еще один источник неспецифических реакций — присутствие в растворе конъюгата несвязанного флуоресцеина. Избыточное количество антител при конъюгации может привести к слипанию. Некоторые клетки и ткани могут давать автофлуоресценцию с длиной волны, регистрируемой микроскопом. Чаще всего длина волны автофлуоресценции сдвинута в желтую область по сравнению с флуоресцеином. Автофлуоресценцию и некоторые другие причины неспецифического окрашивания можно устранить при контрокрашивании образца синим Эванса [13, 28].

Хотя эндогенная ферментативная активность для фиксированных тканей нехарактерна, она часто может быть причиной проблем при анализе клинических образцов (биоптатов, соскобов или мочи) и вызвана присутствием неинактивированных ферментов или содержащих гем белков (форменные элементы крови), слизи, бактерий или поврежденных клеток. Если эндогенные ферменты не были инактивированы, повышается вероятность ложноположительного результата. Для подавления активности ферментов следует использовать ингибиторы, необратимо их инактивирующие и не влияющие на реакцию антигена с антителами. При ингибировании эндогенных ферментов перед инкубацией с первичными антителами образцы обычно обрабатывают метанолом или азидом натрия в смеси с пероксидом водорода, кислотой или щелочью. Среди ингибиторов щелочной фосфатазы левамизол и уксусная кислота. Следует также помнить, что предварительная обработка образца для подавления активности эндогенных ферментов может привести к разрушению вирусных антигенов.

Ложноотрицательные результаты могут возникать из-за маскировки детерминант антигенов при слишком долгой фиксации или вследствие связывания с эндогенными антителами. Поперечной сшивке антигенов успешно препятствует протеолитическая обработка образца перед фиксацией. Обработка проназой или трипсином, по всей видимости, разрушает сшивки между антигенами, что позволяет антителам связываться с ними. Обнаружение антигенов в фиксированных формалином и заключенных в парафин образцах может быть затруднительным. Было произведено получение антигенов VZV, для чего было применено нагревание депарафинизированного образца в кислом буфере, за которым следовала стандартная процедура иммуноокрашивания [28].

Другая важная причина ложноотрицательных результатов в иммунохимических методах — иммунные комплексы, при определенных вирусных инфекциях представленных в ряде образцов. Это особенно значимо при анализе сывороток на присутствие антигена ВИЧ p24. Для предотвращения ложноотрицательных результатов образцы обрабатывают кислым буфером, разрушающим комплексы антигена с антителом. На этом принципе основаны практически все коммерческие наборы для обнаружения антигена p24 [86, 87].

Все твердофазные иммунохимические методики включают стадию отмывания, и некорректное проведение может вызвать неспецифическую реакцию. Недостаточная отмывка может привести к равномерному неспецифическому прокрашиванию части препарата или всей его поверхности, маскируя таким образом специфическую реакцию, или к неспецифическому связыванию антител с материалом образца или подложки. Эти неспецифические взаимодействия сможет ингибировать блокирующий реагент. Все реагенты, используемые для отмывки микротитровочных планшетов, следует тщательно очищать и калибровать каждый день перед использованием для предотвращения неспецифического связывания.

## Фиксация и фиксирующие реактивы

Идеальный фиксирующий реактив должен переводить вирусные антигены в нерастворимую форму и не нарушать структур белков, изменять их иммунологическую активность или доступность для антител. Он должен инактивировать инфекционные вирионы в клетке или ткани. В качестве фиксирующего реактива чаще всего используют ацетон, наносимый на препарат в разные промежутки времени и при разных температурах. Ацетон инактивирует многие вирусы, однако некоторые из них, не имеющие внешней липопротеидной оболочки, такие как аденовирусы, могут быть инактивированы только после 30-минутной обработки ацетоном при 50–60 °С или 10%-м формалином в течение нескольких минут. Препараты, окрашенные при помощи иммуногистохимических методов, также можно обрабатывать 2%-м формалином в течение 2 мин перед микроскопическим исследованием препарата [88]. Утилизация фиксирующих реагентов, таких как ацетон и формальдегид, представляет определенные трудности, связанные с охраной окружающей среды, поэтому непрерывно ведутся разработки новых методов фиксации. Так, вирус бешенства можно с успехом фиксировать обработкой в микроволновой печи [89]. Фиксирующие реактивы следует подбирать с осторожностью, поскольку большая часть вирусных антигенов весьма лабильна. Для предотвращения изменений в антигенах рекомендуется использовать минимальные возможные концентрации и времена обработки. В качестве фиксирующих агентов часто используют этанол или метанол в комбинации с ацетоном, а также формалин и глутаровый альдегид. Клеточные культуры, растущие на пластике, можно фиксировать абсолютным спиртом или 80–90%-м охлажденным ацетоном. Это дает хорошие результаты. Для определения наиболее подходящего в конкретном случае метода следует провести несколько пробных экспериментов. Чрезмерная фиксация может привести к ложноотрицательным результатам, вызванным денатурацией вирусного антигена, что препятствует его распознаванию антителом. В некоторых случаях для закрепления препарата на стекле может быть необходима предварительная обработка альбумином.

## Заливочная среда

Флуорофоры, используемые для иммунолюминесцентного окрашивания, быстро выгорают при продолжительном воздействии возбуждающего излучения. Изначально интенсивная флуоресценция при этом затухает, становясь менее контрастной, и постепенно перестает быть различима. Это мешает фотографировать препараты с длительным временем экспозиции. Выгорание в некоторых случаях можно замедлить, добавив определенные вещества в заливочную среду. Хорошая заливочная среда — раствор ПВА и глицерина в буфере Tris с добавлением 1,4-дiazобисцикло[2,2,2]октана (DAICO) [90]. Окрашенные при помощи иммунофлуоресценции препараты, зафиксирован-



ные с применением такой среды, можно изучать и фотографировать в течение более продолжительного времени. Некоторые выпадающие в осадок продукты реакции, образующиеся при иммуногистохимическом окрашивании, растворяются в органических растворителях, поэтому среду для заливки таких препаратов следует подбирать особенно тщательно. Заливочная среда закрепляет покровное стекло над препаратом, препятствуя распылению окрашенных областей. Препараты, окрашенные при помощи пероксидазной реакции с применением ДАБ или АМК и залитые ПВА, сохраняют цвет в течение многих лет. Промышленно производится множество разнообразных заливочных сред.

## Автоматизация

С 1970-х гг. автоматизация, особенно позволяющая анализировать много образцов одновременно, была приоритетным направлением исследований в вирусологической и серологической диагностике. Аппаратура для анализов подобного рода непрерывно совершенствуется для получения быстрых, точных и воспроизводимых результатов, что позволяет освободить квалифицированных сотрудников от выполнения рутинных задач. Для операций с жидкими реактивами были разработаны роботизированные технологии. Автоматические и полуавтоматические пипетки, распределители, смесители, промыватели и детекторы для планшетов, снабженные полным пакетом программного обеспечения, выпускаются в настоящее время целым рядом производителей [91–93]. Автоматизация должна оправдывать затраты на установку и поддержание, а программное обеспечение должно поддерживать обновления. Также необходимо учитывать необходимость наличия свободного пространства для размещения аппаратуры. Начальные капиталовложения в ряде случаев могут быть снижены при помощи различных предложений от производителей. Также следует учитывать возможность обновления оборудования при выпуске новых моделей. Некоторые производители осуществляют также обслуживание своих продуктов и располагают специалистами, обученными ремонтировать и настраивать выпускаемое оборудование.

Еще одно серьезное нововведение — использование информационных технологий для управления лабораторными операциями. Поскольку конечным продуктом деятельности любой диагностической лаборатории является информация, для эффективной работы лаборатории необходимо грамотное управление информацией. Многие компании производят программное обеспечение для управления данными. Для лабораторных целей было разработано два подхода: Лабораторная информационная система (LIS) и Лабораторная система управления информацией (LIMS). Обе системы выполняют сходные функции. LIS исходно проектировалась для больших и малых учреждений здравоохранения и клинических лабораторий, LIMS — для исследовательских лабораторий и фармацевтической промышленности. Существуют два вида LIMS: с веб-интерфейсом и с возможностью его

подключения. LIMS должна служить центральной информационной системой лаборатории и выполнять следующие функции: идентификацию, проверку качества и маркировку образцов, составление графика работ, запуск тестирования, получение данных, автоматизированное или ручное занесение результатов в базу данных, автоматизированную или ручную отправку отчета о результатах, анализ данных, статистический анализ, отчеты о контроле качества, проверку методов, подготовку лаборантов, отслеживание образцов, результатов и сотрудников, поддержание стандартных рабочих процедур, ведение финансовой отчетности и прочие функции по управлению лабораторией [94].

Несколько лет департамент здравоохранения Калифорнии США использует пакет программ STARLIMS во всех лабораториях, среди которых — лаборатория вирусных и риккетсиозных заболеваний. Это обусловлено возможностями STARLIMS для управления лабораториями широкого профиля в сфере здравоохранения. Более того, департамент здравоохранения Калифорнии, ассоциация лабораторий в сфере здравоохранения и компания STARLIMS поддерживают информационную систему национального охвата, позволяющую быстрый обмен данными между лабораториями.

## **ОТЧЕТЫ О РЕЗУЛЬТАТАХ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

Основная функция иммунологических методов — предоставить информацию для успешной диагностики вирусной инфекции. Иммунологические методы полезны лишь в том случае, если дают точные, чувствительные, специфичные и воспроизводимые результаты. Важно также быстро доставить результаты количественного анализа лечащему врачу [95, 96]. Номенклатура и интерпретация данных в вирусологических исследованиях отличаются от таковых в других областях знаний, даже полученных теми же методами. Например, при биохимическом исследовании крови концентрация инсулина в сыворотке должна быть в пределах некоторого нормального интервала; отклонения показателя означают наличие нарушений у пациента, и основной задачей этого исследования является точное определение количества инсулина. Однако количественное определение продукта деятельности вируса может быть достаточным для диагностики лишь некоторых инфекций (например, заражение вирусом гепатита В), а в других случаях количественные данные не соотносятся со статусом инфекции.

Если требуется уточнить диагноз, дополнительную информацию об инфекции может дать комбинация нескольких маркерных вирусных антигенов. Так, помимо наличия HbsAg в сыворотке, инфекция вирусом гепатита В характеризуется присутствием антигена e. Высокая концентрация HBeAg и отсутствие в сыворотке антител к нему говорит о ранней острой стадии инфекции, тогда как наличие антител к нему в отсутствие самого антигена характерно для хронической инфекции без HbsAg или свидетельствует о персистентном носительстве в присутствии этого антигена [20–22].

При ВИЧ-инфекции обнаружение антигена p24 в сыворотке рассматривается как прогностический маркер прогрессирующего СПИДа. Если уровень антигена p24 у ВИЧ-инфицированного пациента повышается, а количество антител к нему падает, то при подтверждении другой иммунологической информацией можно говорить о развившемся СПИДе [97, 98]. Эти примеры показывают, почему для постановки точного диагноза и определения клинического состояния требуется детальное исследование и определение количества вирусного антигена.

Тем не менее большая часть распространенных методов иммунохимической диагностики, используемых для выявления вирусных антигенов, таких как иммуногистохимическое окрашивание и иммунофлуоресценция, носят качественный характер. Эти методы позволяют получить данные только о наличии или отсутствии антигена без возможности определения его количества в клиническом образце или состоянии инфекции. Результаты обоих методов могут иметь разную интенсивность по шкале от + до ++++; отчет об исследовании составляется в форме «антиген обнаружен» или «антиген не обнаружен», что позволяет быстро диагностировать большинство вирусных инфекций.

## ОТКАЗ ОТ ПРАВОВОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ

Названия реагентов, наборов для проведения тестов, лабораторного оборудования и других коммерческих продуктов, упомянутые в настоящей главе, приведены исключительно в целях информирования и не являются рекламой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidt NJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral infections. In: de la Maza LM, Peterson. EM, eds. Medical Virology. New York, NY: Elsevier, 1981:1–33.
2. Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral rickettsial and chlamydial infections. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 7th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1995:3–25.
3. Forghani B, Hagens S. Diagnosis of viral infections by antigen detection. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections, 7th ed. Washington DC: American Public Health Association, 1995:79–96.
4. Forghani B. Detection by antigen detection. In: Lennette EH, Smith TF, eds. Laboratory Diagnosis of Viral Infection, 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1999:71–94.
5. Storch GA. Diagnostic virology. Clin Infect Dis 2000; 31:739–751.
6. Leland DS. Clinical virology: Concepts and perspectives. In: Lennette EH, Smith TF, eds. Laboratory Diagnosis of Viral Infection, 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1999:1–20.
7. Leland DS, Ginocchio. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev 2007; 20:49–78.

8. Olivo P. Application of genetically engineered cell lines to diagnostic virology. In: Lennette EH, Smith TT, eds. *Laboratory Diagnosis of Viral Infection*, 3rd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1999:159–175.
9. Crist GA, Langer JM, Woods GL, et al. Evaluation of the Elvis plate method for the detection and typing herpes simplex virus in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:173–177.
10. Kowalski RP, Karenchak LM, Shah C, et al. Elvis: A new 24-hour culture test for detecting herpes simplex virus from ocular samples. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:960–962.
11. Lasola P, Bufton K, Ismail N, et al. Perspective comparison of R-mix shell vial system with direct antigen test and conventional cell culture for respiratory virus detection. *J Clin Virol* 2007; 38:210–216.
12. Buck GE, Wieseman M, Stewart L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (super mix E mix) with RT-PCR and conventional cell culture for diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol* 2002; (24 suppl 1):S13–S18.
13. Forghani B, Hurst JW, Chan CS. Advantages of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) persistently infected HeLa T4 + cell line for HIV-1 indirect immunofluorescence serology. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2266–2272.
14. Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ, et al. The antigenic structure of proteins: A reappraisal. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:7–101.
15. Underwood PA. Measurement of the affinity of viral antibodies. *Adv Virus Res* 1988; 34:283–289.
16. Colman PM, Air GM, Webster RG, et al. How antibodies recognize virus proteins. *Immunol Today* 1987; 8:323–326.
17. Getzoff ED, Trainer JA, Lerner RA, et al. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv Immunol* 1988; 43:1–98.
18. Bonner AB, Monroe KW, Tally LI, et al. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: Results of a randomized, prospective, control trial. *Pediatrics* 2003; 112:363–367.
19. Uyeki TM. Influenza diagnosis and treatment in children: A review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:164–177.
20. World Health Organization. HIV Assays: Operational characteristics, Report 15, Antigen/Antibody ELISAs. UNAIDS 2004. [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/publications/en/HIV\\_Report15.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf).
21. World Health Organization. WHO recommendation on the use of rapid testing for influenza diagnosis 2005. [http://www.who.int/influenza/resources/documents/rapid\\_testing/en/](http://www.who.int/influenza/resources/documents/rapid_testing/en/).
22. U.S. FDA, Center for Biologic Evaluation Research. Donor Screening assays for infectious agents and HIV diagnostic assays. 2008; Silver Spring, MD. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/ucm080466.htm>.
23. Riggs JL. Immunofluorescence staining. In: Schmidt NJ, Emmons RW, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*, 5th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1979:123–133.
24. St. George K, Boyd MJ, Lipson SM, et al. A multisite trial comparing two cytomegalovirus (CMV) antigenemia test kits, Biotest CMV Brite and Bartels / Argene antigenemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1430–1433.

25. Landry ML, Ferguson D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 2000; 38:708–711.
26. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Real-time PCR compared to Binax Now and cytospinn immunofluorescence for detection of influenza in hospitalized patients. *J Clin Virol* 2008; 43:148–151.
27. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Perspective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1098–1100.
28. Forghani B. Laboratory diagnosis of infection. In: Arvin AM, Gershon AA, eds. *Varicella-zoster Virus: Virology and Clinical Management*. New York, NY: Cambridge University Press, 2000:351–382.
29. Linscott's directory of immunological and biological reagents. <https://www.linscottsdirectory.com/>.
30. NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. [aidsreagents@thermofisher.com](https://aidsreagents@thermofisher.com). Accessed July 2008.
31. American Type Culture Collection. [www.atcc.org](http://www.atcc.org). Accessed July 2008.
32. Forghani B. Radioimmunoassay systems. In: Lennette EH, ed. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1992:89–104.
33. Forghani B, Schmidt NJ, Lennette EH. Solid phase radioimmunoassay for identification of herpes hominis types 1 and 2 from clinical materials. *Appl Microbiol* 1974; 28:661–667.
34. Forghani B. Enzyme immunoassay systems. In: Lennette EH, ed. *Laboratory Diagnosis of Viral Infection*. New York, NY: Marcel Dekker, 1992:105–125.
35. Forghani B, Dennis J. Immunoenzymatic staining. In: Schmidt NJ, Emons RW, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 6th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1989:135–156.
36. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detection of norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:1349–1355.
37. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000; 181 (suppl 2):5349–5359.
38. Melver CJ, Palombo EA, Doultree, JC, et al. Detection of astrovirus gastroenteritis in children. *J Virol Methods* 2000; 84:99–105.
39. Wilhelmi dCI, Revilla A, del Alamo JM. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays for detection of norovirus in fecal samples from hospitalized children with sporadic acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:341–343.
40. Alvin R, Janz B, Doerr HW. Viral gastroenteritis. An epidemiologic investigation between the period 2001–2006. *Med Klin (Munich)* 2008; 103:389–395.
41. Chen D, Kaplan LA. Performance of a new-generation chemiluminescent assay for detection of hepatitis B surface antigen. *Clin Chem* 2006; 52:1592–1598.
42. Leary TP, Gutierrez RA, Muehoff AS, et al. A chemiluminescent, magnetic particle-based immunoassay for the detection of hepatitis C virus core antigen in human serum and plasma. *J Med Virol* 2006; 78:1436–1440.
43. Hamilton MS, Abel DM, Ballam YJ, et al. Clinical evaluation of the Zstat-FluII test: A chemiluminescence rapid diagnostic test for influenza virus. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2331–2334.
44. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B. *J Clin Virol* 2004; 31:113–115.

45. Raboni SM, Nogueira MB, Hakim, et al. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:392–394.
46. Ruest A, Michaud S, Delandes S, et al. Comparison of Directigen Flu A+B test, the QuikVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid detection of influenza virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3487–3493.
47. Rodriguez WJ, Schwartz RH, Thorne MM. Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:193–196.
48. Fader RC. Comparison of the Ninax NOW Flu A enzyme immunochromatographic assay and R-Mix shell vial culture for the 2003–2004 influenza season. *J Clin Microbiol* 2005; 43:6133–6135.
49. Cazacu AC, Demmler GJ, Neuman MA, et al. Comparison of a new lateral-flow chromatographic membrane immunoassay to viral culture for rapid detection and differentiation of influenza A and B in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 42:3661–3664.
50. Cruz AT, Cazacu AC, Greer JM, et al. Performance of a rapid assay (Binax NOW) for detection of respiratory syncytial virus at a children's hospital over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1993–1995.
51. Jonathan N. Diagnostic utility of Binax Now RSV- an evaluation of the diagnostic performance of Binax Now RSV in comparison with cell culture and direct immunofluorescence. *Ann Microbiol Antimicrob* 2006; 5:13–21.
52. Konstantinos A, Mack K, Bonsu BK, et al. Evaluation of the Quidel QuickVue test for detection of influenza viruses in pediatric emergency medicine setting by using different specimen collection methods. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2638–2643.
53. Kikuta H, Sakata C, Gamo R, et al. Comparison lateral-flow immunochromatography assay with real-time reverse transcription-PCR for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2008; 46:928–932.
54. Zainah S, Abdul-wahab AH, Mariam M. Performance of commercial rapid dengue N1S1 antigen immunochromatographic test with reference to N1S1 antigen capture ELISA. *J Virol Methods* 2009; 155:157–160.
55. Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, et al. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods* 2008; 147:360–363.
56. Hideaki K, Sakata C Gamo, R et al. Comparison of a lateral-flow immunochromatography as time reverse transcription-PCR for detection of hman metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 928–932.
57. Rahman M, Vandermause MF, Kiel BA, et al. Performance of Binax Now Flu A and B and direct fluorescent assay in comparison with a composite of viral culture or reverse transcription PCR for detection of influenza infection during 2006–2007 season. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62: 162–164.
58. Hindiyeh M, Goulding C, Morgan H, et al. Evaluation of Biosta Flu OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2000; 17:119–126.
59. Hierholzer JC, Anderson LJ, Halonen P. Monoclonal time-resolved fluoroimmunoassay: Sensitive systems for the rapid diagnosis of respiratory viruses. In: de la Maza LM, Peterson EM, eds. *Medical Virology*. New York, NY: Plenum Press, 1990:17–46.
60. Valane A, Huopalahti S, Vainiopaa R, et al. Rapid and sensitive HBsAg immunoassay based fluorescent nanoparticle labels and time-resolved detection. *J Virol Methods* 2005; 129:83–90.

61. Brian Haab B, Dunham MJ, Brown PO. Proten microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solution. *Genome Biol* 2001; 2:Research 004.
62. Xu R, Gan X, Fang Y, et al. A simple, rapid, and sensitive integrated protein microarray for simultaneous detection of multiple antigens and antibodies of five human hepatitis viruses (HBV, HCV, HDV, HEV, and HGV). *Anal Biochem* 2007; 362:69–75.
63. Merate F, Yghoubian S, Janeczko R. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP). *J Clin Virol* 2007; 40 (suppl 1):S31–S35.
64. Kronic N, Yager TD, Himswoth D, et al. xTAG RVP assay: Analytical and clinical performance. *J Clin Virol* 2007; 40 (suppl 1):S39–S46.
65. Nolte FS, Marshall DJ, Raspberry C, et al. MultiCode-Plex system for multiplexed of seventeen respiratory viruses. *J. Clin Microbiol* 2007; 45:2779–2786.
66. Tripp RA, Alvarez R, Anderson B, et al. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus. *Int J Nanomedicine* 2007; 2:117–124.
67. Kim EY, Stanton J, Korber BT, et al. Detection of HIV-1 p24 Gag in plasma by a nanoparticle-based bio-barcode-amplification method. *Nanomedicine* 2008; 3:293–303.
68. Tang S, Zhao J, Storhoff, et al. Nanoparticle-based biobarcode amplification assay (BCA) for sensitive and early detection of human immunodeficiency type1 capsid (p24) antigen. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46:231–237.
69. Jaiswal JK, Simon SM. Potential and pitfalls of fluorescent dots for biological imaging. *Trends Cell Biol* 2004; 14:497–504.
70. Takeda S, Ozaki H, Hattori S, et al. Detection of influenza virus hemagglutination with randomly immobilized anti-hemaagglutinin antibody on a carbon nanotube sensor. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7:752–756.
71. Yun Z, Zhengatao D, Jiachang Y, et al. using cadmium telluride quantum dots as a proton flux sensor and applying to detect H9 avian influenza virus. *Anal Biochem* 2007; 364:122–127.
72. Dong C, Huang X, Ren J. Characterization of water-soluble luminescent quantum dots by fluorescence correlation spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1130:253–261.
73. Ymeti A, Greve J, Lambeck PV, et al. Fast, ultrasensitive detection using Young interferometer sensor. *Nano Lett* 2007; 7:394–397.
74. Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, et al. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J Am Chem Soc* 2003; 125:10192–10193.
75. Center for Disease Control and Prevention. Good laboratory practices for waived testing sites. *MMWR Morb Mort Wkly Rep*, November 2005.
76. Covalciuc K, Webb K, Carlson CA. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B virus by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3971–3974.
77. Smith TF. Specimen requirements: Selection, Collection, transport and processing. In: Spector S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000:11–26.
78. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Impact of sample type on rapid detection by cytospin-enhanced immunofluorescence and membrane enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38:429–430.
79. Loens K, Van Heirstraeten L, Malhotra-Kumar S, et al. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infection. A mini review. *J Clin Microbiol* 2009; 47:21–31.

80. Forghani B, Karu AE. Monoclonal antibodies. In: Harper DR, ed. *Virology Labfax*. Oxford, UK BIOS Scientific Publishers LTD, 1993:187–213.
81. LeBaron CW, Forghani B, Beck C. Persistence of mumps antibodies after 2 doses of measles-mumps-rubella vaccine. *J Infect Dis* 2009; 199:552–560.
82. McGrady J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatases. *Histochemie* 1970; 23:180–184.
83. Van Noorden S. Problems and solutions. In: Beesley JE, ed. *Immunocytochemistry- a practical approach*. New York, NY: Oxford University Press Inc., 1993:207–239.
84. Alexander EL, Sanders SK. F(ab')<sub>2</sub> reagents are not required if goat, rather than rabbit, antibodies are used to detect human surface immunoglobulin. *J Immunol* 1977; 119:1084–1088.
85. Forghani B, Mahalingam R, Vafai A, et al. Monoclonal antibody to immediate early protein encoded by varicella-zoster virus gene 62. *Virus Res* 1990; 16:195–210.
86. Schupbach J. Measurement of HIV-1 p24 antigen by signal-amplification-booster ELISA of heat-denatured plasma is a simple and inexpensive alternative. *AIDS Rev* 2002; 4:83–92.
87. Knuchel MC, Tomasik Z, Speck RF, et al. Ultrasensitive HIV-1 p24 antigen assay adapted for dried plasma spots to improve treatment monitoring in low-resource settings. *J Clin Virol* 2006; 36:64–67.
88. Groen G, Kurata T, Meta C. Modification of indirect immunofluorescence tests on Lassa, Marburg, and Ebola material. *Lancet* 1983; 1:654–655.
89. Davis C, Neill S, Raj P. Microwave fixation of rabies specimens for fluorescent antibody test. *J Virol Methods* 1997; 68:177–182.
90. Johnson GD, Davidson RS, McNamee KC, et al. Fading of immunofluorescence during microscopy: A study of the phenomenon and its remedy. *J Immunol Methods* 1982; 55:213–242.
91. Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HBsAg, antibodies to HBsAg, and antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42:610–617.
92. Kwon JA, Yoon SY, Lee CK, et al. Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination assays. *J Virol Methods* 2006; 133:20–26.
93. Taylor P, Pickard G, Gammie A, et al. Comparison of the ADVIA Centaur and Abbott AxSYM immunoassay systems for a routine diagnostic virology laboratory. *J Clin Virol* 2004; 30 (suppl 1):S11 — S15.
94. Raszko C, Turner E, Hinton MD. *Laboratory Information Management Systems*. Boca Raton, FL USA CRC Press, 2002.
95. Lanigan R, Mahony JB. Issues for reporting results. *J Clin Virol* 2007; 40 (suppl 1):S47 — S50.
96. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbush M, et al. Verification and Validation of Laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40:93–98.
97. Saag MS. Use of virologic markers in clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16 (suppl 1):S3 — S13.
98. Speers D, Philips P, Dyer J. Combination assay detection both Human Immunodeficiency Virus (HIV) p24 antigen and anti-HIV antibody opens a second diagnostic window. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5397–5399.



## 9 СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ ВИРУСОЛОГИИ

**Р. Л. Ходинка**

Richard L. Hodinka, Departments of Pathology and Pediatrics, Clinical Virology Laboratory, Children's Hospital of Philadelphia and University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в клинической вирусологии акцент делается на непосредственную идентификацию вирусов с помощью тестов на основе антигенов или нуклеиновых кислот, однако выявление антител продолжает играть существенную роль в диагностике и лечении многих вирусных болезней. Это касается вирусов иммунодефицита человека типов 1 и 2 (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусов гепатита А—Е, вирусов герпеса, кори, эпидемического паротита и краснухи, парвовируса В19, арбовирусов и HTLV-I и II. Проведение серологических исследований полезно в диагностике острых или хронических вирусных инфекций, для определения иммунного статуса человека или популяции в отношении конкретного вируса, для оценки иммунного ответа на вакцинацию (табл. 9.1). Быстрое определение иммунного статуса в больничных условиях может помочь в предотвращении нежелательного распространения специфических вирусов среди пациентов с ослабленным иммунитетом и работников здравоохранения. Скрининг наличия вирусспецифических антител в крови, а также у доноров и реципиентов органов до проведения трансплантации важен для профилактики передачи вирусов через кровь лицам с высоким риском возникновения тяжелого заболевания. Знание серологического статуса донора и реципиента полезно для назначения лечения или профилактики после трансплантации, при выборе донора и назначении препаратов крови. Пренатальный скрининг антител может дать полезную информацию о риске заболевания конкретной вирусной инфекцией во время беременности. Определение специфических антител в сыворотке пациента в некоторых ситуациях может быть единственным способом постановки диагноза. Ряд вирусов трудно вырастить в культуре или выявить другими методами. Могут возникнуть сложности в получении адекватных образцов для выращивания в культуре или выявления вирусов. Роль идентифицированного вируса в протекающем заболевании не всегда ясна, и серология может помочь выявить причинно-следственные связи.

Технологические достижения последних десятилетий привели к созданию быстрых, чувствительных и точных тестов для измерения вирусспецифических антител. В серологические тест-системы сейчас включены синтетические пептиды и рекомбинантные антигены,

Таблица 9.1

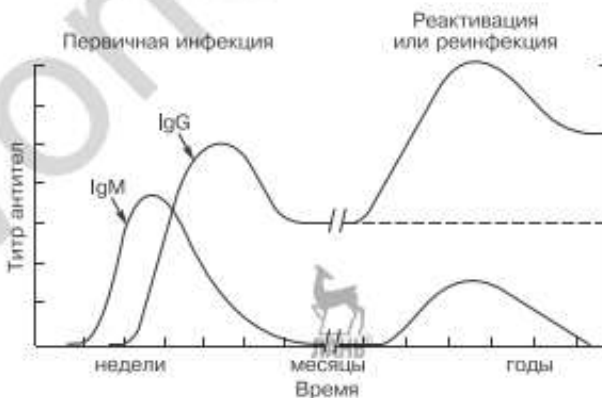
## Серологические тесты в клинической вирусологии

Клиническое значение	Самые распространенные вирусы
<b>Диагностика недавно перенесенных или хронических инфекций</b>	
Гепатит	HAV — HEV и HGV, CMV, EBV, HSV, VZV, ВИЧ, вирус Коксаки В, аденовирус, вирус желтой лихорадки
Центральная нервная система	HSV, CMV, VZV, EBV, HHV-6, энтеровирусы, арбовирусы, вирусы кори, эндемического паротита, краснухи, бешенства, ВИЧ, LCMV
Врожденные или перинатальные	CMV, HSV, VZV, парвовирус В19, HBV, HCV, LCMV
Экзантемы	Вирусы кори и краснухи, парвовирус В19, HHV-6, HHV-7, арбовирусы
Миокардит или перикардит	Вирус Коксаки В типы 1–5, вирус гриппа типов А и В, CMV, парвовирус В19
Инфекционный мононуклеоз гетерофильные АТ+ гетерофильные АТ <sup>-a</sup>	EBV EBV, CMV, ВИЧ, вирус краснухи
Неспецифический фебрилитет	CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, парвовирус В19, ВИЧ, вирус лихорадки денге, вирус колорадской клещевой лихорадки
Т-клеточная лейкопения	HTLV-I and HTLV-II
Геморрагическая лихорадка	Филовирусы, аренавирусы, флавивирусы, буньявирусы
Хантавирусный легочный синдром	Вирус Син Номбре и другие хантавирусы
Внезапный острый респираторный синдром	SARS-коронавирус
<b>Скрининг иммунного статуса</b>	
Перед трудоустройством	VZV, вирусы кори, эндемического паротита, краснухи, HBV
Пренатальный	Вирус краснухи, CMV, HSV, VZV, парвовирус В19, HBV, HCV, ВИЧ
Перед трансплантацией	CMV, HSV, EBV, VZV, HBV, HCV, ВИЧ
Сдача крови	ВИЧ, HBV, HCV, HTLV-I, HTLV-II
После контакта	ВИЧ, HAV, HBV, HCV, VZV
Эпидемиология/надзор	Все вирусы
<b>Подтверждение вакцинации</b>	HAV, HBV, VZV, вирусы кори, эндемического паротита, краснухи
<sup>a</sup> Для пациентов с гетерофил-отрицательным инфекционным мононуклеозом следует ставить современную панель EBV-специфичных серологических тестов	
<i>Сокращения:</i> CMV — цитомегаловирус, EBV — вирус Эпштейна—Барр, HSV — вирус простого герпеса, VZV — вирус варицелла зостер, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, LCMV — вирус лимфоцитарного хориоменингита, HAV — вирус гепатита А, HBV — вирус гепатита В, HCV — вирус гепатита С, HEV — вирус гепатита Е, HGV — вирус гепатита G, HHV-6 — вирус герпеса человека 6, HHV-7 — вирус герпеса человека 7, HTLV — вирус Т-лимфоцитов человека	

они работают лучше традиционных тестов на основе лизатов вирусов. Улучшились методы обнаружения связанных антител, в том числе с использованием высокочувствительных флуоресцентных, фосфоресцентных, хемилюминесцентных и электрохемилюминесцентных соединений. Произошло развитие и совершенствование автоматизированной технологии и устройств, применяемых у постели больного.

## АНТИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ НА ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Серологические исследования представляют собой непрямой подход к диагностике вирусной инфекции, поскольку антитела определяются по мере их образования в ответ на вторжение вируса. Контакт с вирусом может вызывать первичную инфекцию у иммунологически восприимчивого хозяина или экзогенную реинфекцию у инфицированных ранее лиц. Первичная инфекция некоторыми вирусами, например из семейства герпес-вирусов, приводит к возникновению персистирующей или латентной инфекции. Реактивация вируса может произойти в ответ на различные стимулы. После инфицирования вырабатываются антитела различных классов — IgG, IgM, IgA и, возможно, IgD и IgE [1, 2]. В ходе первичной инфекции IgM появляются через несколько дней после симптомов с пиком на 7–10-е сут. и в норме снижаются до незначительного уровня в течение 1–2 мес. (рис. 9.1). Ввиду транзиторной природы ответа антител IgM их наличие свидетельствует о текущей или недавно перенесенной вирусной инфекции. После естественной вирусной инфекции или успешной иммунизации появляются антитела IgG (через несколько дней после IgM), их пиковые уровни выше, чем у IgM, и в небольших ко-



**Рис. 9.1.** Диаграмма типичного ответа антител IgM и IgG после первичной вирусной инфекции, а также реактивации или реинфекции. Штриховой линией показаны вирусспецифические антитела IgG, которые в небольшом количестве могут существовать пожизненно после первичной инфекции при отсутствии реактивации или реинфекции

личествах они могут присутствовать пожизненно. Значительное повышение концентрации IgG во времени считается доказательством текущей или недавно перенесенной вирусной инфекции. Появление, повышение уровня и продолжительность персистенции антител IgA менее предсказуемы, чем IgM и IgG, и диагностические лаборатории не проводят рутинные серологические тесты на IgA. Роль и уровни IgD и IgE при вирусных инфекциях неясны. Во время реактивации или экзогенной реинфекции возникает вторичный иммунный ответ в виде повышения уровня IgG, а ответ IgM может наблюдаться или нет (см. рис. 9.1).

## ПРОЦЕДУРЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ

Разработано множество методов серодиагностики вирусных инфекций (табл. 9.2). Наиболее распространенные традиционные исследования — методы связывания комплемента (CF), ингибирования гемагглютинаина (HI), нейтрализации (NT), непрямой иммунофлуоресценции (IF), антикомплементной иммунофлуоресценции (ACIF). За исключением иммунофлуоресцентных тестов, эти исследования трудоемки, требуют много времени и стандартизации; они проводятся в государственных исследовательских и специализированных лабораториях и только для избранных вирусов. Со временем они были вытеснены твердофазным иммуноанализом (SPIA), тестами пассивной латекс-агглютинации (PLA) и пассивной гемагглютинации (PHA), методиками иммуноблота. Выбор теста зависит от его эффективности в отношении данного вируса, клинической ситуации, количества тестируемых образцов, потребностей в оборудовании, простоты тестирования, ресурсов и возможностей лаборатории. Качественные измерения можно проводить, если наличие или отсутствие специфических антител дает полезную информацию. Количественные измерения проводят, когда важно знать уровень антител; в первую очередь это относится к вирусспецифичным IgG при диагностике первичной вирусной инфекции или для оценки иммунности после вакцинации или контакта [3–5].

Таблица 9.2

Распространенные вирусные серологические пробы

Твердофазный иммуноанализ	Пробы агглютинации
Имуноферментный анализ	Пассивная агглютинация латекса
Имунофлуоресцентный анализ	Пассивная гемагглютинация
Хемилюминесцентный иммуноанализ	Ингибирование гемагглютинации
Имунофлуоресцентный анализ	Связывание комплемента
Непрямая иммунофлуоресценция	Нейтрализация
Антикомплементная иммунофлуоресценция	Иммуноблот

## Сбор и обработка образцов

Образцом для большинства серологических тестов служит сыворотка крови, хотя в некоторых случаях пригодна и плазма (например, для серологической диагностики ВИЧ и вирусов гепатита): 1–2 мл сыворотки или плазмы обычно достаточно, но это зависит от количества выполняемых тестов. Как правило, для каждого из 2–3 тестов надо получить 1–2 мл крови. Сыворотку собирают в пробирки без антикоагулянта или консерванта. В качестве антикоагулянта для сбора плазмы используются калий-ЭДТА, цитрат натрия, натрий-гепарин и лимоннокислую декстрозу. Сыворотку или плазму важно как можно скорее отделить от сгустка во избежание гемолиза. Сейчас доступны пробирки для сбора крови с гелевыми ограничителями — их можно использовать для эффективного отделения сыворотки или плазмы от других компонентов крови. Самые хорошие результаты получаются, когда образцы сыворотки или плазмы прозрачные, без гемолиза. Следует избегать липемических, желтушных или гемолизированных образцов, нельзя использовать образцы с явным микробным обсеменением. Пробы, содержащие сгустки, эритроциты или другие частицы, могут дать недостоверный результат, их следует предварительно очистить центрифугированием. Необработанные образцы крови рутинно охлаждают до 4 °С и доставляют в лабораторию; их не следует держать при комнатной температуре дольше 8 ч. Обработанные образцы можно хранить несколько дней при температуре 2–8 °С.

Если задержка транспортировки или тестирования образца недопустима (например, работа с сывороткой в острой фазе, пока не получена сыворотка фазы выздоровления), ее следует заморозить при –20 °С и ниже. Если в лаборатории достаточно места, можно хранить образцы для проведения ретроспективных исследований пациентов, эпидемиологических исследований в будущем или оценки новых серологических проб. Повторные замораживание и размораживание образцов могут привести к разрушению антител, его следует избегать. Не рекомендуется тепловая активация образцов, если это не оговорено для конкретной серологической пробы. Для определения иммунного статуса или выявления IgM-специфических антител требуется один образец сыворотки. За некоторыми исключениями (вирус Эпштейна—Барр (EBV), вирус гепатита В (HBV) и парвовирус В19), для диагностики текущей или недавно перенесенной вирусной инфекции требуются парные образцы сыворотки, собранные сразу и через 10–14 сут., — образцы тестируют на IgG. Сыворотку острой фазы следует получить как можно быстрее в ходе болезни, но не позднее 5–7 сут. от ее начала. Наиболее полезная информация поступает, когда одновременно тестируют образцы сыворотки острой фазы и фазы выздоровления. В зависимости от вируса промежуток времени между появлением и возможностью обнаружения антител IgM и IgG может варьировать. Для выявления пренатальной, натальной и постнатальной инфекции, вызванной цитомегаловирусом (CMV), вирусом про-

стого герпеса (HSV), вирусом краснухи, парвовирусом В19, ВИЧ, вирусами гепатитов В и С, нужны образцы сыворотки матери, плода и новорожденного.

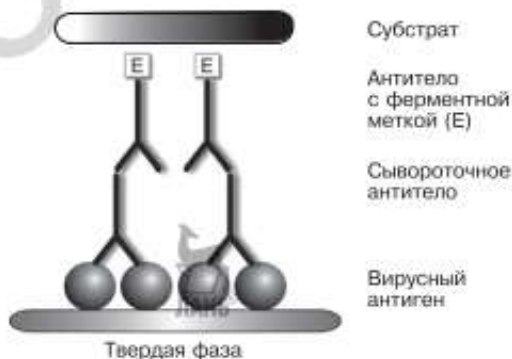
Серологическое тестирование других жидкостей организма, кроме сыворотки и плазмы крови, обычно не проводится. В качестве практических и эффективных заменителей сыворотки при скрининге на антитела к ВИЧ были изучены образцы цельной крови, полученные из пальца или при венопункции, а также крови, высушенной на фильтровальной бумаге [6–10]. У пациентов с вирусными неврологическими заболеваниями тестировать на антитела можно спинномозговую жидкость (СМЖ) — в паре с образцом сыворотки, взятым в тот же день [11]. Хотя многие большие лаборатории больше не проводят тестирование СМЖ на антитела, это тестирование может быть полезно для следующих вирусов: арбовирусы, вирусы кори, эпидемического паротита и бешенства, вирусы герпеса В и лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). В качестве неинвазивной альтернативы забору крови для выявления антител к ряду вирусов предлагается цельная слюна [12–16] или трансудат слизистой рта, богатый гингивальной жидкостью [17–19], а также моча [20–23]. Особое внимание уделялось значению оральных жидкостей (например, нестимулированной и стимулированной слюны и трансудатов слизистой) для диагностики инфекций с ВИЧ [19]. Нестимулированную слюну можно собрать, наклоня голову вперед и собирая слюну с нижней губы в мерную пробирку с воронкой. Через пять минут изо рта вытекает вся слюна. Она стабильна в течение 5 сут. при комнатной температуре, но может храниться и дольше при температурах от 4 °С до –20 °С. Для сбора стимулированной слюны можно использовать такие механические стимуляторы, как парафильм, парафиновая мазь, нейтральная гуммиоснова или резиновые полоски. С помощью специально разработанных систем сбора можно получать слюну непосредственно из околоушных, подчелюстных и подъязычных желез. Для получения образцов трансудатов слизистой ротовой полости было создано несколько коммерческих устройств. С их помощью получают однородные образцы, богатые IgG и IgM [19]. Образцы трансудата слизистой полости рта можно хранить 21 день при температуре от 4 до 37 °С или дольше при –20 °С. Для выявления антител к HSV или VZV у пациентов с инфекцией глаз можно использовать пробу из стекловидного тела [24, 25].

### Твердофазный иммуноанализ

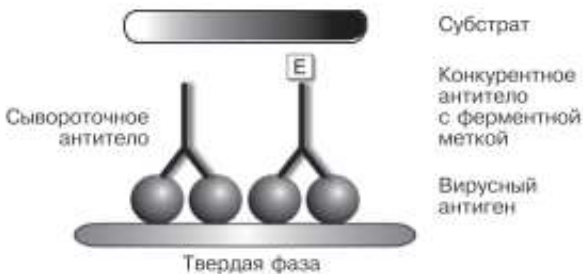
Твердофазный иммуноанализ (ТФИА, SPIA) сильно потеснил другие методы выявления антител к вирусам благодаря скорости, надежности, простоте в использовании, а также высокой чувствительности и специфичности [26–28]. Он применим для анализа многих вирусов и анализа большого количества образцов при сравнительно низкой стоимости. Метод ТФИА требует минимальной подготовки, оборудо-

дования и дает объективные результаты. Для постановки проб доступен широкий спектр инструментов: от простых ручных промывок и анализаторов до полностью автоматических высокопроизводительных систем. Иммуоферментный анализ (ИФА, EIA) — наиболее популярный вид ТФИА, используемый в клинических вирусологических лабораториях, сочетающий преимущества стандартных и стабильных иммунологических реактивов и колориметрические измерения связанных антител. Наборы ИФА для выявления IgG или IgM к различным вирусам доступны из разных коммерческих источников. Описаны как конкурентные, так и неконкурентные тесты, их результаты можно оценивать либо качественно, либо количественно.

Неконкурентный ИФА основан на том, что вирусный антиген фиксируется на твердой подложке и используется для связывания свободного вирусспецифичного антитела из клинического образца (рис. 9.2). Несвязавшиеся сывороточные антитела затем смывают перед добавлением детекторного антитела с ферментной меткой. После инкубации и отмытки избытка меченых антител добавляют хромогенный субстрат. Образование специфичных комплексов антиген—антитело приводит к изменению цвета. Интенсивность окраски пропорциональна количеству вирусспецифичных антител в образце. Результат спектрофотометрии сравнивают с положительным и отрицательным контролем для каждой партии образцов. Твердофазным носителем служат поверхности микроплашек, полистироловых шариков, пробирок, микрочастицы или парамагнитные частицы. Наиболее распространенные ферментные метки — пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. Для получения сигнала, который считывается флуориметром или люминометром, в качестве субстрата ферментативного расщепления используют флуорохромные, хемилюминесцентные и электрохемилюминесцентные или связанные с детекторными антителами молекулы [29, 30].



**Рис. 9.2.** Схема неконкурентного ферментного иммунотеста для выявления антител IgG



**Рис. 9.3.** Схема конкурентной иммуноферментной пробы для выявления антител IgG

В конкурентном анализе меченные ферментом противовирусные антитела смешивают с тестируемой сывороткой, вирусспецифичные антитела в образце конкурируют с мечеными антителами за ограниченное количество участков связывания с антигеном на твердой подложке (рис. 9.3). Несвязавшиеся антитела отмывают, активность меченых антител измеряют, как описано выше. Если в клиническом образце присутствуют антитела, они конкурентно ингибируют то количество меченых антител, которое может вступить в реакцию с иммобилизованным антигеном. Для обеспечения большей специфичности часто используют конкурентные пробы. Коммерческие тесты, основанные на конкурентном связывании, доступны для выявления всех антител к гепатиту А (HAV) и коровому антигену HBV.

«Сэндвич»-ИФА (антиген—антитело—антиген) — разновидность ИФА, успешно адаптированная для выявления антител против ВИЧ [8]. В этом варианте анализируемую сыворотку инкубируют с антигенами, связанными с твердофазным носителем, и любые вирусспецифичные антитела в образце прореагируют с антигенами с образованием комплексов антиген—антитело. Затем добавляют раствор тех же самых антигенов с ферментной меткой, и образуется комплекс антиген—антитело—антиген. Его выявляют путем добавления бесцветного субстрата, расщепляемого ферментом в цветной реакции, которая считывается спектрофотометром. Явное преимущество этого формата в том, что одновременно выявляются многие классы антител (IgG, IgM и IgA) — за счет этого повышается чувствительность по сравнению с тестами, выявляющими только IgG, и укорачивается временное окно между инфицированием и сероконверсией. Недавно были разработаны быстрые (около 20 мин) и простые твердофазные иммунопробы с использованием методик мембранного захвата антитела и боковой проточной иммунохроматографии для выявления антивирусных антител, включая антитела против ВИЧ [7, 8, 23, 31, 32], HBV [33], HSV [34–36], вируса денге [37, 38] и др. Устройства модульные и взаимозаменяемые, они предназначены для использования в пункте оказания помощи или в лаборатории. В мембранных проточных устройствах иммобилизованные на мембране антигены захва-



тывают и концентрируют вирусспецифичные антитела на поверхности устройства по мере того, как образец протекает сквозь мембрану и поглощается панелью с адсорбентом. Затем последовательно добавляются античеловеческие антитела и бесцветный субстрат; ферментативный гидролиз субстрата дает окрашенные продукты, видимые как след на мембране. При боковой проточной иммунохроматографии образец наносится на адсорбирующую панель и продвигается за счет капиллярного эффекта вдоль твердофазной полоски, где он соединяется с вирусными антигенами и реагентами-детекторами с образованием видимой полосы, если вирусспецифичные антитела присутствуют. При работе на обоих устройствах нужен контроль процедуры — для верификации работы теста. Явные преимущества этих проб: не нужно специальное оборудование (требуется лишь техническая экспертиза), реактивы стабильны в течение длительного времени при комнатной температуре. Как правило, эти пробы имеют более высокую чувствительность и специфичность по сравнению со сложными лабораторными пробами.

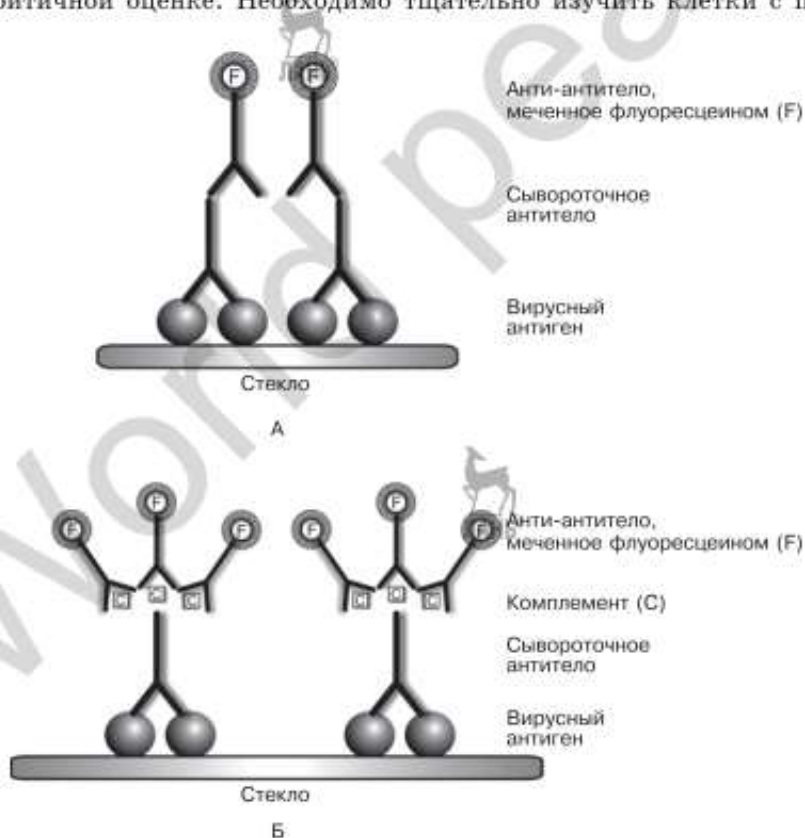
Главные недостатки описанных в этом разделе ТФИА: специфичность реакции нельзя оценить непосредственно. Известно лишь то, что по завершении тестирования образца сыворотки возникло окрашивание.

### Иммунофлуоресцентный анализ

Иммунофлуоресцентный анализ (ИФЛА) — очень полезный и недорогой метод качественного и количественного выявления IgM- и IgG-антител к вирусам в клинических образцах [39, 40]. В продаже имеются наборы для обнаружения многих распространенных вирусов; покрытые антигеном стекла и меченые вторичные антитела можно приобрести отдельно для собственных лабораторных тестов. Наборы содержат все необходимые реактивы, включая стекла с субстратом, меченые вторичные антитела, отмывочный буфер, фиксирующую жидкость, а также положительную и отрицательную контрольную сыворотку. ИФЛА прост, хорошо стандартизован, имеет высокую воспроизводимость, прекрасно приспособлен для тестирования в малом объеме. Главный его недостаток: необходимы флуоресцентный микроскоп и темная комната для оценки стекол, а также высокая подготовка для чтения и интерпретирования результатов тестов.

Антитела обычно выявляются либо с помощью непрямой иммунофлуоресценции (рис. 9.4, А), либо антикомплементной иммунофлуоресценции (рис. 9.4, Б). При непрямой иммунофлуоресценции разведения тестируемой сыворотки инкубируют с зараженными вирусом клетками, фиксированными на стекле для микроскопии. После инкубации стекло отмывают для удаления избытка сыворотки; образующиеся специфические комплексы антиген—антитело выявляют с помощью античеловеческих антител, конъюгированных с флуорохромом. Самый распространенный краситель для ИФЛА — флуоресцеин изо-

тиоцианат. Затем стекла отмывают, высушивают и изучают под флуоресцентным микроскопом. Многие аспекты антикомplementной иммунофлуоресценции аналогичны непрямоу ИФА. Различие состоит в том, что тестируемую сыворотку сначала инактивируют нагреванием для удаления эндогенной complementной активности, а затем инкубируют с зараженными вирусом клетками на стеклах. После отмывки избытка сыворотки добавляют свежий complement; он связывается образовавшимися специфическими комплексами антиген—антитело. Затем добавляют меченные флуоресцеином антикомplementные антитела; они связываются с C3-компонентом complementа. Затем стекла просматривают под флуоресцентным микроскопом. При антикомplementной иммунофлуоресценции происходит усиление сигнала, что позволяет выявлять малое количество антител или антитела низкой авидности. Этот метод рутинно используется для выявления антител к ядерному антигену вируса Эпштейна—Барр (EBV). Чтобы результаты были надежными, иммунофлуоресцентные пробы нуждаются в критичной оценке. Необходимо тщательно изучить клетки с поло-



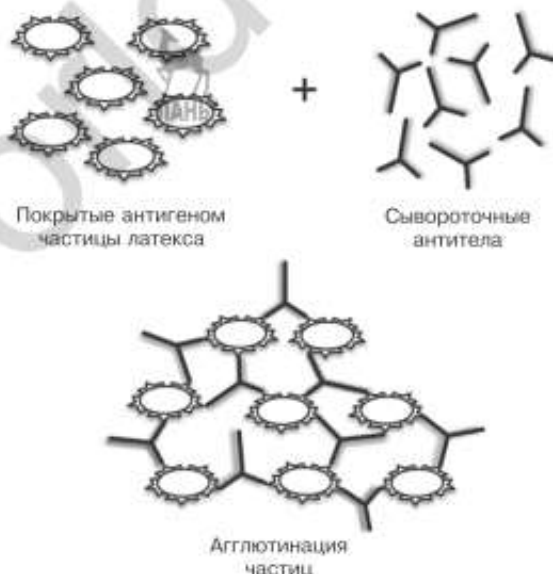
**Рис. 9.4.** Диаграммы непрямоу иммунофлуоресцентной пробы (А) и антикомplementной иммунофлуоресцентной пробы (Б) для выявления IgG

жительной флуоресценцией, а также качество и интенсивность флуоресценции и сравнить с результатом положительной и отрицательной контрольных сывороток. Большинство производителей коммерческих наборов поставляют стекла, где только 20–40% клеток имеют вирусные антигены. Неспецифическое связывание антител с клетками легко выявляется: при этом типе реакции окрашиваются все клетки.

## Пробы агглютинации

### *Пассивная латекс-агглютинация и пассивная гемагглютинация*

Чаще всего применяют пассивную латекс-агглютинацию (ПЛА). Она несложная, удобная и лучше всего приспособлена для малого количества образцов. Суспензию латексных шариков, покрытых вирусными антигенами, смешивают с клиническим образцом и инкубируют короткое время при перемешивании (рис. 9.5) [41]. Покрытые антигеном частицы в присутствии вирусспецифичных антител будут слипаться. Агглютинация видна невооруженным глазом. Если специфических антител нет или их концентрация мала, латексные частицы слипаться не будут, останутся равномерно распределенными. Тест можно провести за 10 мин, не требуется сложного оборудования и технических навыков. Выявляются IgG и IgM без дифференциации; чувствительность и специфичность ПЛА сравнима с таковыми для ТФИА и ИФА. Продаются наборы ПЛА для выявления гетерофильных антител при диагностике EBV-ассоциированного инфекционного



**Рис. 9.5.** Пассивная агглютинация латекса

мононуклеоза и вирусспецифичных антител к VZV и вирусу краснухи. ПЛА лучше всего подходит для качественного определения антивирусных антител, но возможны также количественные измерения. Наиболее важный недостаток ПЛА заключается в том, что прочтение реакции агглютинации может быть субъективным, а интерпретация результатов затруднительной. Также может образоваться прозона или снижение степени агглютинации с сыворотками, имеющими высокий уровень специфических антител — тогда необходимо развести отрицательные образцы и повторить пробу. Если эритроциты покрыты вирусным антигеном, описанная для ПЛА процедура называется пассивной гемагглютинацией.

### *Ингибирование гемагглютинации*

Реакция ингибирования гемагглютинации (РИГ) используется для выявления антител к вирусам, имеющим гемагглютинин на поверхности [42]. Эта проба пригодна для выявления антител к арбовирусам, респираторно-синцитиальному вирусу и вирусам полиомы при сероэпидемиологических исследованиях, а также испытаниях антивирусных средств и вакцин. Постановка РИГ такова: известное количество жизнеспособного вируса инкубируют с разведениями испытуемой сыворотки. Затем в смесь добавляют эритроциты животного подходящего вида. Если вирусспецифичные антитела присутствуют, они прореагируют с вирусным гемагглютинином и предотвратят агглютинацию эритроцитов. При отсутствии вирусспецифичных антител добавленный вирус связывается с эритроцитами и вызывает видимую реакцию гемагглютинации. Для РИГ нужна техника, время и надлежащий контроль качества процедур. Используемый в качестве источника гемагглютинина вирус должен быть тщательно оттитрован для наилучшей работы пробы. Некоторые образцы сыворотки содержат неспецифические ингибиторы и естественные агглютинины, которые следует предварительно удалить. Ингибиторы можно удалить путем предварительной обработки сыворотки ферментом, разрушающим рецепторы, тепловой инактивацией или же периодатом калия или каолином; естественные агглютинины удаляют путем адсорбции эритроцитов подходящего вида животных. Чаще всего РИГ используют для определения подтипов и антигенной характеристики штаммов вируса гриппа, хотя генотипирование на основе ПЦР быстро вытесняет эту методику.

### **Иммуноблотинг**

Иммуноблотинг — это твердофазный иммуноанализ, где используют выделенные и иммобилизованные вирусные антигены для выявления антител к специфическим белкам [45–47]. Методика используется преимущественно для подтверждения или как дополнительный тест при верификации положительного результата, полученного другим методом скрининга вирусспецифичных антител. Доступны ком-

мерческие наборы для ВИЧ-1, ВИЧ-2, вируса гепатита С (HCV), вируса Т-клеточной лейкемии человека I (HTLV-I) и II (HTLV-II) типов. Главное преимущество иммуноблотинга заключается в том, что специфическое взаимодействие антитела и антигена можно увидеть непосредственно. Эти пробы имеют высокую чувствительность и специфичность, но технически непросты, относительно дороги; кроме того, требуется интерпретация результата.

Чаще всего описывается вестерн-иммуноблот. В этой методике лизаты вирусов с инактивированными и разрушенными вирусными

1. Электрофорез вирусных антигенов

суспензия вирусных антигенов



Миграция белков

Гель SDS-Page

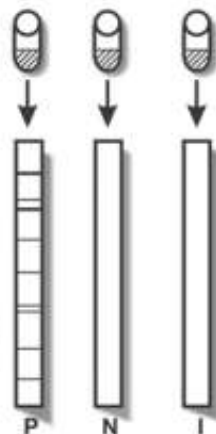


3. Разрежьте нитроцеллюлозную бумагу на отдельные полоски

2. Перенесите белки на нитроцеллюлозную бумагу



нитроцеллюлозная бумага



4. Поставьте реакцию полосок с сывороткой пациента. Проявите с помощью вторичных антител, меченных ферментом, и субстрата

Рис. 9.6. Вестерн-блот

белками разделяются электрофорезом в соответствии с их молекулярным весом или относительной подвижностью в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [88] (рис. 9.6). Получившиеся полосы белка затем переносятся на нитроцеллюлозную бумагу. Затем нитроцеллюлозная бумага нарезается на полоски для реакции с образцами сыворотки. Если в сыворотке имеются вирусспецифичные антитела, происходит связывание антител в полосках, соответствующих разделенным вирусным белкам. Полосы просматривают, используя меченные ферментом античеловеческие антитела, а затем хромогенный субстрат. Описаны иммуноблоты с использованием нанесенных на нитроцеллюлозные полоски рекомбинантных белков — для ВИЧ [48, 4]), HSV-2 [35, 36], хантавируса [50] и вируса денге [51, 52].

### Пробы avidности IgG

Были созданы пробы для измерения avidности вирусспецифичных IgG; они оказались полезными для дифференциации первичных и непервичных инфекций, особенно у женщин с подозрением на вирус цитомегалии или краснухи во время беременности [53–55], а также у реципиентов пересаженных плотных органов [56, 57]. Вирусспецифичные антитела IgG низкой avidности синтезируются в первые недели (месяцы) после первичного инфицирования, а IgG все более высокой avidности вырабатываются при позднем иммунном ответе или реинфекции. Доступны как коммерческие, так и некоммерческие наборы для определения avidности; тесты проводятся с небольшой модификацией базовой процедуры ТФЛИП. Пробы [58] сыворотки пациента добавляют к вирусным антигенам, связанным на твердой подложке, чтобы вирусспецифичные антитела могли связаться и образовать комплексы антиген—антитело. Затем проводится обработка денатурирующим агентом, таким как мочеви́на, для определения прочности связывания (avidности) антител. Далее добавляются античеловеческие антитела с ферментной меткой и хромогенный субстрат, чтобы изменение окрашивания можно было измерить на спектрофотометре. Вирусспецифичные IgG низкой avidности выявляются непрямым способом, поскольку только высокоavidные IgG остаются связанными с твердой подложкой и дают колориметрический сигнал. Второй вариант методики [59], конкурентный, включает добавление растворимого вирусспецифичного антигена к образцу перед измерением концентрации вирусспецифичных IgG. Высоко- и низкоavidные антитела конкурируют за участки связывания на растворимом антигене, вирусспецифичные высокоavidные IgG из образца селективно захватываются. Предварительно обработанный образец затем соединяют с вирусным антигеном, связанным с твердой фазой, чтобы связать вирусспецифичные IgG низкой avidности, оставшиеся в образце. Затем добавляются вторичные антитела, меченные акридином, а результат хемилюминесцентной реакции измеряется в относительных световых единицах. Для образцов, содержащих первично низкоavid-

ные IgG, концентрация вирусспецифичных IgG остается практически неизменной в присутствии или при отсутствии растворимого антигена, в то время как она сильно снижается в образцах, содержащих преимущественно высокоаavidные вирусспецифичные антитела. Для обеих проб уровень авидности выражается в виде процента вирусспецифичных IgG, связавшихся с антигеном, когда результаты сравниваются при наличии и в отсутствие этапа предварительной обработки.

### Пробы со сложными микросферами

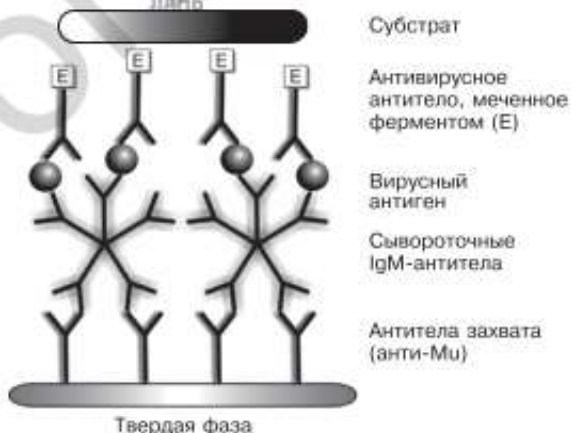
При традиционных методах выявления вирусных антител обычно нужны отдельные пробы каждого вирусспецифичного антитела. Недавно была разработана мультиплексная технология, совмещающая иммунохимию с проточной цитометрией для одновременной оценки ответа антител на разные вирусы или разные серотипы одного и того же вируса, когда в качестве твердой фазы используются полистироловые микросферы. Они окрашиваются внутри красным и инфракрасным флуоресцентными красителями различной интенсивности, им присваивается уникальный номер — и каждую микросферу можно отличить по характерному цветовому коду. Можно классифицировать и собрать воедино до 100 четко окрашенных микросфер. Окрашенные микросферы могут ковалентно связываться с различными вирусными антигенами и смешиваться в одной пробе для захвата множества антивирусных антител, имеющих в образце. Затем добавляют вторичные антитела с флуоресцентной меткой для выявления связанных комплексов антиген—антитело. Когда реакция завершается, микросферы считываются одновременно на люминометре с двумя лазерами для классификации и количественного определения каждого класса антител. Классификационный лазер считывает состав микросферы, а второй лазер считывает относительную интенсивность флуоресценции метки, связанной со вторичными детекторными антителами, чтобы количественно оценить реакцию антиген—антитело на поверхности микросферы. Эта платформа была применена для выявления антител к EBV [60–62], вирусу лихорадки Западного Нила [63], различных серотипов HPV [64], вирусов человеческого и птичьего гриппа [65, 66], панели семи респираторных вирусов [67] и HSV (неопубликованный коммерческий набор от Фокус Технолоджиз, Кипр, Калифорния).

### Выявление IgM-антител

Вирусспецифичные IgM-антитела чаще всего выявляют с помощью ИФА или ТФлиА [68]; в продаже имеются реактивы и полные диагностические наборы для многих вирусов. Методы такие же, как для IgG, за исключением того, что связанные с вирусными антигенами на твердой фазе IgM выявляются с помощью вторичных античеловеческих антител с подходящей меткой. Тесты на вирусспецифичные IgM-антитела применялись как помощь при диагностике

инфекций, вызванных вирусами кори, эпидемического паротита, краснухи, гепатитов А, В, D и Е, парвовируса В19, герпесвирусов, а также вирусов, передаваемых членистоногими и грызунами. Главная проблема при оценке вирусспецифичных IgM-антител — ложноположительные и ложноотрицательные реакции [68, 69]. Ложноотрицательные реакции могут возникать, когда высокие уровни IgG-антител конкурентно блокируют связывание IgM-антител с вирусным антигеном на твердой фазе. Ложноположительные реакции могут возникать, когда в сыворотке необыкновенно высок уровень ревматоидного фактора. Ревматоидный фактор, продуцируемый при ревматизме, вирусных заболеваниях и васкулитах, является иммуноглобулином класса IgM, который связывается Fc-рецептором IgG. В присутствии вирусспецифичных IgG-антител ревматоидный фактор образует комплекс с молекулами IgG. Затем такие IgG, несущие невирусные IgM, могут связаться с вирусным антигеном на твердой фазе, давая ложноположительный результат. Ложные реакции можно свести к минимуму, перед тестированием разделяя IgG и IgM.

Разработано множество методов удаления ревматоидного фактора и молекул IgG из сыворотки, дающих более надежные результаты тестирования IgM [70]. Антитела IgG и IgM можно разделить физически с помощью гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Эти методики хотя и эффективны, но непрактичны в клинических условиях. Более быстрые и простые процедуры селективной абсорбции и удаления фракции IgG из сыворотки с помощью гипериммунных античеловеческих IgG, стафилококкового А-белка или рекомбинантного G-белка из стрептококков группы G. Эти ме-



**Рис. 9.7.** Схема твердофазного связывания при иммуноферментном анализе для определения IgM-антител



тоды предварительной обработки вполне доступны и включены в большинство коммерческих наборов для выявления IgM-антител. Недавно были разработаны твердофазные пробы обратного захвата IgM в качестве альтернативы физическому фракционированию сыворотки. В этом методе твердая фаза покрывается античеловеческими IgM-антителами, используемыми для захвата вирусспецифичных IgM из образца сыворотки (рис. 9.7). Затем проводят отмывку для удаления конкурирующих IgG-антител и иммунных комплексов, способных повлиять на точность теста. Далее добавляют специфический вирусный антиген, и он связывается с захваченными IgM. Комплексы антиген—антитело выявляют, добавляя сначала вторичные антитела с ферментной меткой, затем субстрат для цветной реакции, дающий окраску при взаимодействии с ферментом. Анализ захвата IgM считается более чувствительным и специфичным, чем более традиционные методы выявления IgM.

## АВТОМАТИЗАЦИЯ

ТФЛИА имеют наибольший потенциал для автоматизации, и сейчас в продаже имеется множество полуавтоматических и полностью автоматических систем для постановки вирусных серологических проб (табл. 9.3) [71]. Разработано много методов определения ВИЧ, вирусов гепатита, вирусов, вызывающих врожденные инфекции, и других клинически значимых вирусов. Доступность продукции может варьировать в разных странах. Некоторые производители создали модели различного размера, формы и сложности для оснащения крупных, средних и маленьких лабораторий. Автоматизированные системы самостоятельно проводят тестирование от обработки образцов до интерпретации результатов. Устройства могут автоматически создавать рабочие списки образцов для тестирования, пипетировать и разводить образцы, дозировать все реактивы и определять время инкубации при желаемой температуре, проводить отмывку, считывать и хранить конечные результаты. Большинство производителей автоматических устройств поставляют и программное обеспечение для анализа и ведения данных пациента, а также для мониторинга качества проводимого тестирования. Многие приборы могут соединяться интерфейсом с госпитальными лабораторными информационными системами для непрерывной передачи результатов. Количество и выбор автоматизированных приборов зависит в основном от объема тестируемых образцов и их количества. Некоторые приборы узкоспециализированные, другие автоматические анализаторы представляют собой открытые платформы, которые можно программировать для постановки проб от различных производителей. Автоматизация вирусных серологических проб может быть полезной для лаборатории, где не хватает квалифицированного среднего лабораторного персонала, надо снизить затраты или ускорить получение результатов.

Таблица 9.3

## Избранные автоматические иммуносистемы для вирусной серологии

Производитель	Доступное оборудование	Платформа <sup>a</sup>	Веб-сайт <sup>b</sup>
Abbott Laboratories	AxSYM/AxSYM Plus, Architect i2000, Architect i200SR, Commander, Prism, Quantum II	Закрытая 	www.abbottdiagnostics.com
Adaltis	Eclectica, NexGen Four, Personal Lab	Открытая	www.adaltis.com
Beckman Coulter	Access 2, UniCel DxI 600 Access, UniCel DxI 800 Access, UniCel DxС 600i, Synchron Access	Закрытая	www.beckman.com
BioMerieux-Vitek	Vidas, mini vidas, vidia	Закрытая	www.biomerieux-diagnostics.com
Bio-Rad Laboratories	BioPlex 2200, Evolis, Elite	Закрытая (BioPlex), открытая Evolis, Elite	www.bio-rad.com
Diamedix	MAGO Plus, DSX, DS 2	Закрытая (MAGO), открытая (DSX, DS 2)	www.diamedix.com
Dynex Technologies	DSX, DS 2	Открытая	www.dynextechnologies.com
Grifols-Quest	TRITURIS	Открытая	www.grifols.com
Luminex	Luminex 100 IS, Luminex 200	Открытая	www.luminexcorp.com
Ortho-Clinical Diagnostics	Vitros ECiQ, Vitros 3600, Vitros 5600	Закрытая 	www.orthoclinical.com
Roche Diagnostics	ELECSYS 2010, Cobas e411, Cobas e601	Закрытая	www.roche-diagnostics.com
Siemens Healthcare Diagnostics	ADVIA Centaur XP & CP, Immulite 2500, 2000 & 1000	Закрытая	www.dadebehring.com
Zeuss Scientific	AtheNA Multi-Lyte	Открытая	www.zeusscientific.com

<sup>a</sup> В закрытых системах используются иммунопробы только производителя. Открытые системы можно запрограммировать на иммунопробы других производителей.

<sup>b</sup> Чтобы получить полное описание и подробное тест-меню конкретного анализатора иммунопробы, следует связаться с производителем

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для диагностики первичной вирусной инфекции может служить сероконверсия уровня IgG-антител с отрицательного на положительный в сыворотках острой фазы и фазы выздоровления. Четырехкратное и более повышение титров IgG-антител в парных сыворотках может свидетельствовать о недавней вирусной инфекции в результате реактивации или реинфекции. Выявление вирусспецифичных IgG в единственном образце сыворотки или отсутствие разницы в уровне антител между сыворотками острой фазы и выздоровления свидетельствует о контакте с вирусом ранее или ответе на вакцинацию. На основании негативных титров сывороточных антител можно исключить вирусную инфекцию.

Идентификация вирусспецифичных антител в СМЖ может подтвердить диагноз вирусного энцефалита [11]. Однако появление вирусспецифичных антител в СМЖ может затягиваться на 2–4 нед., а их наличие может оказаться следствием пассивного перехода сывороточных антител сквозь нарушенный гемато-энцефалический барьер. Следует использовать методы, позволяющие определить и сравнить соотношение вирусспецифичных антител в СМЖ или сыворотке с аналогичным соотношением для установленного маркера, такого как альбумин [11]. Поскольку альбумин не синтезируется в центральной нервной системе, его высокая концентрация в СМЖ свидетельствует о загрязнении белками сыворотки и нарушении гемато-энцефалического барьера. Демонстрация интактности гемато-энцефалического барьера на фоне высоких уровней выявляемых вирусспецифичных антител в СМЖ отражает их внутритекальное образование и считается доказательством вирусной инфекции центральной нервной системы.

При диагностике у плода или новорожденного врожденных вирусных инфекций наличие вирусспецифичных IgM свидетельствует об инфекции, поскольку IgM-антитела не преодолевают плацентарный барьер. Для тестирования плода на IgM кровь следует брать после 22 нед. гестации, поскольку синтез антител у плода начинается в 20 нед. и через 1–2 нед. может еще не достичь выявляемого уровня. Определение у плода или новорожденного IgG менее информативно и редко позволяет поставить диагноз, поскольку активный перенос материнских антител через плаценту начинается с 18 нед. гестации. У беременной с симптомами вирусного заболевания первичная материнская инфекция диагностируется по наличию одинаковых вирусспецифичных IgM или положительной сероконверсии IgG-антител. У беременных с наличием вирусспецифичных IgG- и IgM-антител отличать первичную инфекцию от давней и прогнозировать инфекцию плода лучше по результатам определения avidности IgG. Тестирование на специфичные антитела к гликопротеину G HSV может дать ценную информацию у беременных без симптомов, но с факторами риска генитального герпеса в анамне-

зе [35, 36]. Выявление вируса при отсутствии специфического ответа матери и новорожденного или плода указывает на отсутствие инфекции. Однако отрицательный результат исследования антител у матери и ребенка может быть результатом ранней фазы первичной инфекции матери и отсутствия специфичных антител. Если при тестировании новорожденного на вирусспецифичные IgG титры IgG-антител на один вирус-возбудитель окажутся повышенными, тестируют парную сыворотку матери и новорожденного — тогда интерпретация результатов будет точнее. Если количество вирусспецифичных антител у новорожденного меньше, чем в соответствующей материнской сыворотке, можно говорить о пассивном переносе антител, если выше — об активном их образовании. Если уровни одинаковые, следует дополнительно взять сыворотку у младенца через 1–2 мес. и затем периодически брать до возраста 6–9 мес. и сравнивать с более ранними данными. Если младенец не имеет врожденной инфекции, уровень тестируемых антител будет постепенно снижаться. Такое тестирование в полном объеме проводится редко. В целом серологическая диагностика врожденных инфекций может оказаться исключительно сложной, и это не всегда понимают заказчики. Для точного тестирования необходимо правильно забирать образцы от матери, новорожденного или плода, проводить корректную интерпретацию результатов с пониманием полезности и ограничений этих тестов [72, 73].

Результаты серологических тестов для выявления вирусспецифичных антител следует интерпретировать с осторожностью, поскольку измерение ответа антител на вирусную инфекцию осложняется рядом факторов. Сывороточных IgM или IgG может не быть или они появляются с задержкой, особенно у новорожденных, пожилых, иммунокомпрометированных и лиц с агаммаглобулинемией. IgM-антитела могут персистировать в течение длительного времени после первичной инфекции и могут присутствовать при реактивации латентных вирусных инфекций. Не всегда наблюдается значительное повышение IgG в результате рекуррентных инфекций или экзогенной реинфекции. Вирусспецифичные IgG-антитела могут присутствовать у лиц, которым был внутривенно введен иммуноглобулин или недавно перелита кровь, а также у новорожденных младенцев, имеющих материнские антитела — и это затрудняет интерпретацию IgG-тестов. Повышение титров либо IgM-, либо IgG-антител к определенным вирусам также может быть неспецифичным и возникать в ответ на недавнюю инфекцию, вызванную другими вирусами. В особенности это относится к герпесвирусам, поскольку в этой группе много общих эпитопов, против которых могут продуцироваться антитела. Из-за сложностей, связанных с серологической диагностикой вирусных инфекций, по мере возможности следует использовать выделение вируса в культуре или прямые методы выявления вирусных антигенов или нуклеиновых кислот.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cowan KM. Antibody response to viral antigens. *Adv Immunol* 1973; 17:195–253.
2. Ogra PL, Morag A, Tiku ML. Humoral immune response to viral infections. In: Notkins AL, ed. *Viral Immunology and Immunopathology*. New York, NY: Academic Press, 1975:57.
3. James K. Immunoserology of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:132–152.
4. Carpenter AB. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Vol. 1. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007:257–270.
5. Leland DS. Concepts of immunoserological and molecular techniques. In: Leland DS, ed. *Clinical Virology*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1996:21–49.
6. Wasilak SG, Bernier RH, Herrmann KL, et al. Measles seroconfirmation using dried capillary blood specimens in filter paper. *Pediatr Infect Dis* 1984; 3:117–121.
7. Branson BM. State of the art for diagnosis of HIV infection. *Clin Infect Dis* 2007; 45:S221 – S225.
8. Hodinka RL. Human immunodeficiency virus. In: Truant AL, ed. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:100–127.
9. Varnier OE, Lillo FB, Reina S, et al. Whole blood collection on filter paper is an effective means of obtaining samples for human immunodeficiency virus antibody assay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1988; 4:131–136.
10. Sarge-Njie R, Schim van der Loeff M, Ceessay S, et al. Evaluation of the dried blood spot filter paper technology and five testing strategies of HIV-1 and HIV-2 infections in West Africa. *Scand J Infect Dis* 2006; 38:1050–1056.
11. Andiman WA. Organism-specific antibody indices, the cerebrospinal fluid-immunoglobulin index and other tools: A clinician's guide to the etiologic diagnosis of central nervous system infection. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10:490–495.
12. Jayashree S, Bhan MK, Kumar R, et al. Serum and salivary antibodies as indicators of rotavirus infection in neonates. *J Infect Dis* 1989; 158:1117–1120.
13. Parry JV, Perry KR, Panday S, et al. Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. *J Med Virol* 1989; 28:255–260.
14. Perry KR, Brown DWG, Parry JV, et al. Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. *J Med Virol* 1993; 40:235–240.
15. Adler SP, Wang JB. Salivary antibodies to cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B accurately predict CMV infections among preschool children. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2632–2634.
16. Elsans S, Sikuler E, Yaari A, et al. HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol* 1998; 55:24–27.
17. Thieme T, Yoshihara P, Piacentini S, et al. Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1076–1079.
18. Martinez PM, Torres AR, de Lejarazu RO, et al. Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and Western blot as-

- says using serum, gingival-crevicular transudate, and urine samples. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1100–1106.
19. Hodinka RL, Nagashunmugam T, Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:1–8.
  20. Takahashi S, Machikawa F, Noda A, et al. Detection of immunoglobulin G and A antibodies to rubella virus in urine and antibody responses to vaccine-induced infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:24–27.
  21. Perry KR, Parry JV, Vandervelde EM, et al. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. *J Med Virol* 1992; 38:265–270.
  22. Joshi MS, Walimbe AM, Arankalle VA, et al. Hepatitis E antibody profiles in serum and urine. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:137–142.
  23. Koopmans M, Sanchez-Martinez D, Patton J, et al. Evaluation of antigen and antibody detection in urine specimens from children with congenital human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1995; 46:321–328.
  24. Sarkies N, Gregor Z, Forsey T, et al. Antibodies to herpes simplex virus type 1 in intraocular fluids of patients with acute retinal necrosis. *Br J Ophthalmol* 1986; 70:81–84.
  25. Suttorp-Schulten MSA, Zaai MJW, Luyendijk L, et al. Aqueous chamber tap and serology in acute retinal necrosis. *Am J Ophthalmol* 1989; 108:327–328.
  26. Kemeny DM, Challacombe SJ. *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays. Theoretical and Practical Aspects*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1988.
  27. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem* 1990; 36: 1408–1427.
  28. Leland DS. Enzyme immunoassay. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:93–104.
  29. Nakamura RM, Bylund DJ. Fluorescence immunoassays. In: Rose NR, Conway de Marcario E, Folds JD, Lane EC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed. Washington, DC: ASM Press, 1997:39–48.
  30. Kricka LJ. Chemiluminescence immunoassays. In: Rose NR, Conway de Marcario E, Folds JD, Lane EC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed. Washington, DC: ASM Press, 1997:49–53.
  31. Kassler WJ, Haley C, Jones WK, et al. Performance of a rapid, on-site human immunodeficiency virus antibody assay in a public health setting. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2899–2902.
  32. Stetler HC, Granade TC, Nunez CA, et al. Field evaluation of rapid HIV serologic tests for screening and confirming HIV-1 infection in Honduras. *AIDS* 1997; 3:369–375.
  33. Sato K, Ichiyama S, Iinuma Y, et al. Evaluation of immunochromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody, Dainacreen HbsAg and Dainacreen Ausab. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1420–1422.
  34. Ashley RL, Wald A, Eagleton M. Pre-market Evaluation of the POCKIT HSV-2 type-specific serologic test in culture-documented cases of genital herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Dis* 2000; 27: 266–269.
  35. Ashley RL. Performance and use of HSV type-specific serology test kits. *Herpes* 2002; 9:38–45.

36. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis* 2002; 35:S173 — S182.
37. Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36:234–238.
38. Wu S-J L, Paxton H, Hanson B, et al. Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:106–110.
39. Rossier E, Miller HR, Phipps PH. *Rapid Viral Diagnosis by Immunofluorescence: An Atlas and Practical Guide*. Ottawa, Canada: University of Ottawa Press, 1989.
40. Schutzbank TE, McGuire R. Immunofluorescence. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:69–78.
41. Kasahara Y. Agglutination immunoassays. In: Rose NR, Conway de Marcario E, Folds JD, Lane EC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1997:7–12.
42. Young SA, McLaren LC. Hemadsorption and hemagglutination inhibition. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:135–139.
43. Stark LM, Lewis AL. Complement fixation test. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:112–126.
44. Ballew HC. Neutralization. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:127–134.
45. Ledue TB, Garfin DE. Immunofixation and immunoblotting. In: Rose NR, Conway de Marcario E, Folds JD, Lane EC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed. Washington, DC: ASM Press, 1997:54–64.
46. Timmons TM, Dunbar BS. Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol* 1990; 182: 679–688.
47. Meads MB, Medveczky PG. Application of Western blotting to diagnosis of viral infections. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:182–187.
48. van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337:317–319.
49. Chaudhary RK, MacLean C. Evaluation of first- and second-generation RIBA kits for detection of antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2329–2330.
50. Hjelle B, Jenison S, Torrez-Martinez N, et al. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:600–608.
51. Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, et al. Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:757–762.
52. Ludolfs D, Schilling S, Altenschmidt J, et al. Serological differentiation of infections with dengue virus serotypes 1 to 4 by using recombinant antigens. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4317–4320.
53. Bodeus M, Feyder S, Goubau P. Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from nonprimary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Clin Diagn Virol* 1998; 9:9–16.

54. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis* 1997; 175: 944–946.
55. Hofman J, Liebert UG. Significance of avidity and immunoblot analysis for rubella IgM-positive serum samples in pregnant women. *J Virol Methods* 2005; 130:66–71.
56. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, et al. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4:469–473.
57. Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, et al. Delayed acquisition of high-avidity anti-cytomegalovirus antibody is correlated with prolonged antigenemia in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 1998; 178:1145–1149.
58. Prince HE, Leber AL. Validation of an in-house assay for cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:824–827.
59. Curdt I, Praast G, Sickinger E, et al. Development of fully automated determination of marker-specific immunoglobulin G (IgG) avidity based on the avidity competition assay format: application for Abbott Architect cytomegalovirus and Toxo IgG Avidity assays. *J Clin Microbiol* 2009; 47:603–613. doi: 10.1128/JCM.01076-08.
60. Martins TB, Litwin CM, Hill HR. Evaluation of a multiplex fluorescent microsphere immunoassay for the determination of Epstein-Barr virus serologic status. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:34–41.
61. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA, et al. Evaluation of a multiplex flow immunoassay for detection of Epstein-Barr virus-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1410–1413.
62. Gu A-D, Mo H-Y, Xie Y-B, et al. Evaluation of a multianalyte profiling assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for serological examination of Epstein-Barr virus-specific antibody responses in diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1684–1688.
63. Wong SJ, Demarest VL, Boyle RH, et al. Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *J Clin Microbiol* 2004; 42:65–72.
64. Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:108–115.
65. Drummond JE, Shaw EE, Antonello JM, et al. Design and optimization of a multiplex anti-influenza peptide immunoassay. *J Immunol Methods* 2008; 334:11–20.
66. Watson DS, Reddy SM, Brahmakshatriya V, et al. A multiplexed immunoassay for detection of antibodies against avian influenza virus. *J Immunol Methods* 2009; 340:123–131.
67. Martins TB. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:41–45.
68. Erdman DD. Immunoglobulin M determinations. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000:146–153.



69. Meurman O. Detection of antiviral IgM antibodies and its problems — a review. *Curr Top Microbiol Immunol* 1983; 104:101–131.
70. Wiedbrauk DL, Chuang HYK. Managing IgM serologies: Getting the IgG out. *Lab Manage* 1988; 26:24–27.
71. Hodinka RL. Automated immunoassay analyzers. In: Truant AL, ed. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:324–335.
72. Andrews JI. Diagnosis of fetal infections. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16:163–166.
73. Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, et al. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod Toxicol* 2006; 21:350–382.



# 10 ХИРУРГИЧЕСКАЯ ПАТОЛОГИЯ И ЦИТОЛОГИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**Дж.Л. Карузо, Дж.М. Чайлдс**

James L. Caruso and John M. Childs, United States Navy and Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.

**Д.Н. Хоуэлл**

David N. Howell, Duke University Medical Center and Veterans Affairs Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Световая микроскопия гистологических срезов и цитологических препаратов занимает большое место в диагностике вирусов. Традиционная световая микроскопия как инструмент выявления и идентификации вирусов уступает ряду других методик (иммуногистохимия, гибридизация *in situ*, методы молекулярной диагностики, такие как ПЦР) и по специфичности, и по чувствительности. Однако эти недостатки компенсируются несколькими преимуществами.

Первое и самое главное — способность традиционной световой микроскопии выявлять широкий диапазон патологических процессов. Биопсии и цитологические образцы часто берут у пациентов, если дифференциальный диагноз включает множество вирусных и других инфекций, а также неинфекционные нарушения. В некоторых случаях ткани оказываются пораженными многими патологическими процессами — у иммунокомпрометированных пациентов нередко встречается смешанная инфекция. Световая микроскопия в настоящее время — самый лучший метод в решении столь сложных диагностических проблем.

Помимо выявления инфекций световая микроскопия дает информацию об их тяжести и клиническом соответствии. Часто она позволяет дифференцировать латентные или малозначимые от клинически важных. Гистологическое изучение тканей, в которых протекает более одного патологического процесса, может дать информацию о сравнительной роли этих процессов в поражении ткани.

Традиционные гистология и цитология могут стать ценным подспорьем другим методам вирусной диагностики. Заливки тканей и цитологические препараты можно зондировать на вирусы иммунохимическим методом и проводить гибридизацию *in situ*; в продаже имеются антитела, специфичные для большинства обсуждаемых в этой главе ДНК- и многих РНК-вирусов, созданные для применения на препаратах тканей, фиксированных формалином и заключенных в парафин. Первоначально с помощью световой микроскопии можно отбирать антитела или зонды для исследования нуклеиновых кислот для специфических вирусов и выбирать области для изучения поражения

тканей вспомогательными методами. Контрольные светомикроскопические срезы также используются при выборе образцов тканей для дальнейшего изучения под электронным микроскопом (ЭМ) [1].

В некоторых случаях парафиновый блок фиксированной в формалине ткани или цитологический препарат может оказаться единственным доступным для изучения образцом. Примеры: биопсии пациентов без клинических признаков вирусных инфекций, а также полученные при скрининге цитологические образцы шейки матки. Гистопатологический анализ на вирусные инфекции также применим для архивных парафиновых блоков, хранящихся в большинстве медицинских центров.

Поэтому очень важно, чтобы гистопатологи, цитопатологи и вирусологи-диагносты были знакомы с особенностями поражения тканей при вирусных инфекциях. В данной главе делается обзор таких особенностей; дополнительную информацию можно получить в ссылках в главах по отдельным вирусам второй части этой книги и в труде по патологии инфекционных болезней [2]. Большинство патогенов собрано в разделах, посвященных ДНК- и РНК-вирусам; в каждом разделе вирусы перечислены в алфавитном порядке. В некоторых случаях вирусы разных таксономических групп вызывают схожие формы системной патологии — они сведены в отдельный раздел в конце главы.

## ПОДГОТОВКА И ДЕЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

### Сравнение гистопатологии и цитопатологии

Патологи пользуются двумя главными способами подготовки образцов для световой микроскопии. Для гистопатологии из твердого образца ткани изготавливают тонкие срезы и помещают их на предметные стекла. Перед изготовлением срезов образцы делают непластичными либо замораживанием, либо пропитывая такими веществами, как парафин или эпоксидные смолы. Цитопатический образец состоит из одиночных клеток или небольших кластеров клеток, снятых с поверхности тканей или полученных из тканей путем аспирации тонкой иглой. Они непосредственно наносятся на предметные стекла (*препарат «мазок»*), либо с помощью центрифугирования (*цитоцентрифугирование*), либо аспират наносится на фильтры и переносится на стекла. На финальном этапе гистологические и цитологические препараты обрабатываются красителями, позволяющими видеть и различать различные компоненты клеток и тканей. Методические подробности приводятся в нескольких руководствах [3–5].

И гистопатология, и цитопатология пригодны для выявления вызванных вирусом изменений на клеточном уровне, но у обоих методов есть свои сильные и слабые стороны. Изучение срезов тканей позволяет точнее оценить реакцию пациента на инфекцию (например, воспаление, некроз) и тяжесть инфекции по сравнению с цитологически-

ми препаратами. Серийные срезы тканей, подозреваемых на вирусные инфекции — надежный субстрат для иммуногистохимии и молекулярной диагностики. Большинство гистологических методов связано с большими временными затратами (от нескольких часов до нескольких дней) — и это негативная сторона. (Замороженные срезы готовятся быстрее, но обычно дают больше артефактов, чем методы пропитки.) Также могут остаться незамеченными очаговые вирусные инфекции, если образец взят неправильно.

Цитологические исследования, напротив, выполняются довольно быстро (препарат Цанка — цитологический мазок материала с кожного поражения — готовится и изучается в течение нескольких минут). Забор цитологических образцов можно проводить с большей площади по сравнению с биопсией тканей, например мазок шейки матки по Папаниколау берут со всей окружности, а биопсии ограничены небольшими секторами. Но цитопатология неспособна выявить и количественно определить многие формы связанных с вирусами тканевых поражений и иных процессов (например, отторжение трансплантата), которые могут присутствовать в некоторых образцах. Эксфолиативная цитология может не выявить инфекции глубже поверхности ткани (например, цитомегаловирусную инфекцию эндотелия сосудов).

Учитывая эти соображения, выбор цитологических или гистологических методов исследования должен соотноситься с конкретной клинической ситуацией. В некоторых случаях (например, гистологический анализ бронхоскопической биопсии и цитологический анализ бронхоальвеолярных смывных жидкостей) совместное использование обоих методов улучшит диагностику вирусных инфекций. В других случаях выявленные при скрининговом цитологическом исследовании изменения, вызванные вирусом (например, HPV-индуцированная цервикальная дисплазия на ПАП-мазке), могут стать показанием к последующей биопсии тканей.

Деление образцов твердых тканей зависит от их размеров, срочности диагноза и необходимости специального окрашивания или процедур микроскопии. Гистологические срезы замороженной ткани или цитологические препараты, полученные легким надавливанием ткани на предметные стекла («отпечатки»), можно сделать за минуты, но идентифицировать вирусную инфекцию на таких препаратах зачастую сложно. Оставшиеся блоки замороженной ткани можно оттаять и обработать для парафиновых срезов или хранить замороженными (предпочтительно при  $-70^{\circ}\text{C}$ ) для последующих исследований.

Практически для всех образцов биопсий часть материала (обычно большую) фиксируют в формалине на нейтральном буфере, заливают (обычно в парафин), делают срезы и окрашивают их гематоксилин-эозином (Г-Э); быстрый метод обработки небольших образцов биопсий позволяет проделать это меньше чем за 6 ч [6]. Часть образца можно оставить в фиксаторе для возможной ЭМ (лучше в глутаральдегиде,

но допустима смесь глутаральдегид/формалин); такие ткани затем можно обработать для ЭМ или залить в парафин для рутинной световой микроскопии, если исходные гистологические срезы не позволяют поставить диагноз.

## ОБЩИЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ВИРУСОВ В ТКАНЯХ

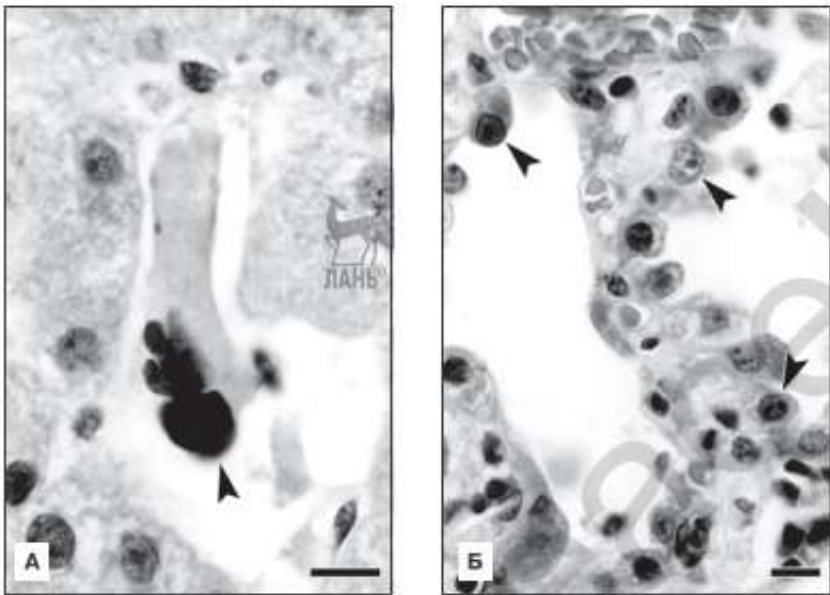
Хотя идентификация специфических вирусов в тканях часто зависит от мелких нюансов, существует нескольких общих принципов, которые помогают определиться с первоначальным скринингом на вирусную инфекцию. Такой скрининг может лечь в основу более тщательного гистологического исследования или использоваться для выбора других, более специфичных диагностических тестов.

Вирусная инфекция вызывает ряд *изменений клеточной морфологии* (цитопатический эффект), выявляемых на уровне световой микроскопии [7–9]. В некоторых случаях кластеры реплицирующихся вирусных частиц становятся настолько большими, что выявляются при световой микроскопии как тельца-включения [8]. Включения вирусной ДНК в целом расположены внутри ядра, а РНК — в цитоплазме; исключения из этого правила перечислены ниже. Крупные внутриядерные включения, связанные с периферической границей хроматина, называются «включения Кодри А». В целом их описывают как эозинофильные, но на практике их свойства варьируют в зависимости от ряда факторов: стадии инфекции, метода изготовления препарата и тонкостей процедуры окрашивания.

Более мелкие и менее четкие сгустки внутриядерного и внутрицитоплазматического материала, классически описанные как включения Кодри В, часто не связаны с вирусной инфекцией. Внутри ядра под вирусные включения могут маскироваться ядрышки и сгустки хроматина. Зачастую они больше распространены, чем подлинные вирусные включения (см. ниже).

Вирусная репликация также может приводить к изменению или нарушению нормальной цитологической картины. Например, репликация ДНК-вирусов часто приводит к тому, что в пораженных клетках ядрышки выглядят как прозрачное «матовое стекло» или имеют плотную гиперхромазию. Отличать такие клетки от нормальных клеток с подобными цитологическими признаками (мегакарициты, рис. 10.1, А) надо с большой осторожностью. К другим, менее специфичным видам вирус-индуцированного поражения относятся геморагия, некроз и слияние клеток с образованием многоядерности; при наличии этих признаков без иной явной причины следует заподозрить вирусную инфекцию.

Вследствие *тканевого тропизма* вирусы, как правило, заражают только часть органов и образующих их тканей. Этот принцип позволил составить список потенциальных вирусных опасностей для отдельных органов. Примеры приведены в табл. 10.1. Для большинства



**Рис. 10.1.** Элементы, которые можно перепутать при вирусологической диагностике. **А.** Мегакариоцит в печеночном синусе. Крупное гиперхромное ядро неправильной формы (показано острием стрелки) можно легко принять за вирусный цитопатический эффект. **Б.** Диффузное повреждение альвеол на трансбронхиальной биопсии у пациента с пересаженным легким. Все клетки альвеолярной выстилки реактивны, во многих имеются заметные ядрышки (показаны острием стрелки), которые можно принять за вирусные включения (штрихи 10 мкм)


вирусов органоспецифичное распределение поддерживается у людей и с нормальным, и с ослабленным иммунитетом. Однако некоторые вирусы (цитомегаловирус, вирус простого герпеса, вирус варицелла зостер и аденовирус) могут вызывать диффузные мультисистемные инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом.

Тканевым тропизмом определяется, какой(ие) тип(ы) клеток в пределах конкретного органа подвержен(ы) инфекции. Этот принцип подскажет патологу, какие зоны органа стоит особенно пристально изучить на вирусные цитопатические эффекты. Это поможет отличить вирусную инфекцию от других менее селективных процессов (например, ишемического некроза) и от процессов, селективно поражающих *другие* ткани данного органа. Иллюстрацией может служить гистопатология печеночных трансплантатов: острому отторжению подвержены эндотелий сосудов и эпителий желчных протоков, вирусы гепатита имеют тропизм к гепатоцитам. Тканевой тропизм проще всего определять на ранних стадиях инфекции, пока не возникло коллатерального повреждения смежных тканей.

В пределах круга пораженных тканей, определяемого тканевым тропизмом, вирусная инфекция в целом является *неоднородной*

Таблица 10.1

## Тканевой/органный тропизм патогенных вирусов

Печень вирусы гепатита желтая лихорадка	
Легкие/верхние дыхательные пути аденовирус вирус кори вирус гриппа вирус парагриппа респираторно-синцитиальный вирус	
Центральная нервная система вирус простого герпеса вирус полиомы (JC) вирус бешенства вирус кори (подострый склерозирующий панэнцефалит)	
Мочевые пути вирус полиомы (BK)	
Гематолимфоидная ткань парвовирус B19 вирус Эпштейна—Барр	
Кожа/слизистые поксивирус вирус папилломы человека вирус простого герпеса вирус варицелла зостер	
Широко распространенные* (особенно у иммунокомпromетированных лиц) аденовирус цитомегаловирус вирус простого герпеса вирус варицелла зостер	

\* Включая легкие, печень, ЖКТ и мочевые пути, но не только

и имеет *случайное распределение*. В большинстве случаев затрагивается только часть (часто меньшая) ткани. Напротив, при других видах поражение тканей (например, токсическое или ишемическое) имеет диффузный характер. Например, вирусные инфекции легких типично очаговые, а при других формах альвеолярного поражения, как при синдроме острого респираторного дистресса, часто диффузные (рис. 10.1, Б).

Вирусные инфекции часто индуцируют приток *клеток воспаления* — их наличие может послужить полезным диагностическим ключом. Тщательное изучение клеток и тканей в очаге воспаления и вокруг него может выявить специфические вирусные цитопатические изменения. Некоторые особенности воспаления, не будучи вирусспецифичными, могут указать на наличие конкретного вирусного патогена (например, порталы лимфоидные скопления при гепатите С, микроглиальные узелки при энцефалите, атипичные лимфоидные

инфильтраты при инфекции EBV). Если особенности воспаления при гистологическом исследовании не совпадают с клиническим течением болезни пациента, следует думать о вирусной инфекции. Хотя большинство воспалительных процессов с острым клиническим течением вызывает инфильтрацию нейтрофилами, острые вирусные инфекции могут провоцировать преимущественно моноклеарный воспалительный ответ, а у лиц с ослабленным иммунитетом воспаление может быть слабым или отсутствовать.

Помимо описанных выше изменений, многие вирусы играют известную или предполагаемую роль в генезе опухолей. Поэтому выявление вирус-ассоциированного предопухолевого состояния или опухоли может быть ключом к наличию самого вируса. Некоторые вирусы, включая вирус Эпштейна—Барр (EBV), герпесвирус человека-8 (HGV-8), некоторые штаммы вируса папилломы человека (HPV) и вирус Т-лимфоцитов человека (HTLV), непосредственно индуцируют генетические изменения, отвечающие за неопластическую трансформацию клеток-мишеней. Напротив, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает состояние глубокого дефицита Т-клеток, что ускоряет инфекцию другими онкогенными вирусами и может ослабить иммунный контроль и разрушение появляющихся опухолей. В конечном счете некоторые вирусы, особенно вирусы гепатита, усиливают возникновение опухолей, создавая условия хронического воспаления. Опухоли, четко ассоциированные с вирусами, перечислены в табл. 10.2. Более исчерпывающую информацию можно получить из множества обзорных статей [10–14].

Таблица 10.2

## Ассоциации вирус—опухоль

Вирус папилломы человека	Сквамно-клеточная карцинома шейки матки, кожи и других зон со сквамозной слизистой
Герпесвирус человека-8	Саркома Капоши, первичная выпотная лимфома, мультицентрическая болезнь Кастельмана
Вирус Эпштейна—Барр	Посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, диффузная крупноклеточная В-лимфома, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, назофарингеальная карцинома, трансплантат-ассоциированные новообразования гладкой мускулатуры
Т-лимфотропный вирус человека	Т-клеточная лейкемия/лимфома взрослых
Вирус иммунодефицита человека	HPV-, HGV-8- и EBV-связанные опухоли
Вирусы гепатитов В и С	Гепатоклеточная карцинома



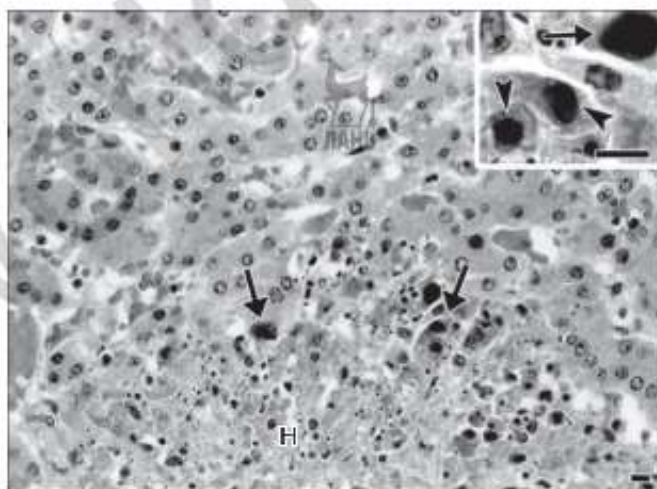
## ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИНФЕКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ВИРУСАМИ

### ДНК-вирусы

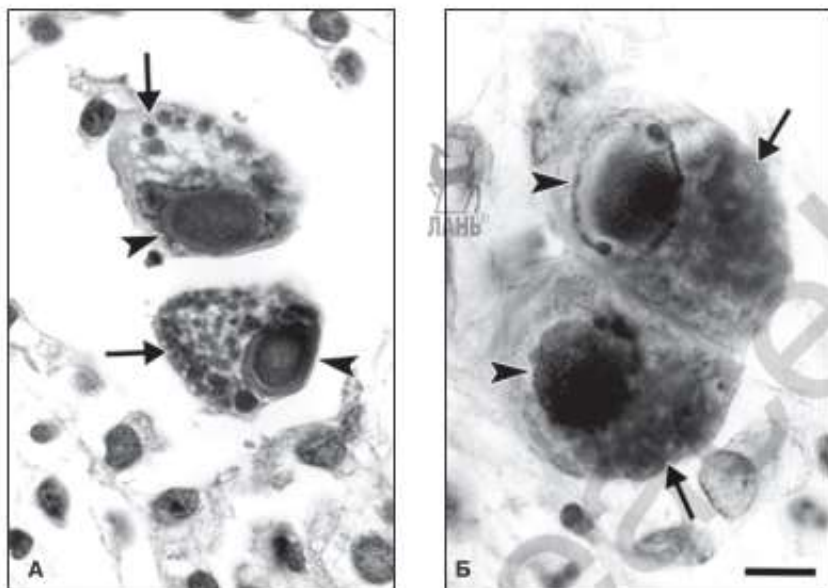
#### Аденовирус

Аденовирусы обычно вызывают самоограниченные респираторные инфекции у лиц без поражения иммунной системы, особенно у детей [15]. Сообщалось об инфекциях, вызывающих острую респираторную недостаточность у здоровых взрослых [16]. У иммунокомпрометированных лиц аденовирус может инфицировать множество органов, в том числе легкие, печень, желудочно-кишечный тракт и мочевые пути. У пациентов с тяжелым иммунодефицитом иногда развиваются разрушительные мультисистемные инфекции.

Внутриядерная репликация аденовирусов приводит к скоплению частиц, которые выявляются при световой микроскопии как тельца-включения. На ранних стадиях репликации вируса эти включения мелкие, эозинофильные или амфифильные на срезах, окрашенных Г-Э. Перемещение хроматина ядра к периферии может приводить к образованию светлой зоны вокруг некоторых включений. Увеличивающиеся частицы становятся более базофильными, а ядерная мембрана дегенерирует. Образующиеся в результате «клетки-кляксы» (*smudge cells*) с нечеткими ядерно-цитоплазматическими границами видны и на гистологических (рис. 10.2), и на цитологических препаратах (рис. 10.3).



**Рис. 10.2.** Аденовирусная инфекция в ткани печени. Рядом с зоной некроза (н) видно несколько зараженных вирусом клеток (показаны стрелками). На врезке видны включения в двух клетках (показаны острием стрелки) рядом с характерной «клеткой-кляксой» (показана стрелкой) (штрихи 10 мкм)



**Рис. 10.3.** Цитомегаловирусная инфекция на биопсии почечного трансплантата (А) и мазке шейки матки по Папаниколау (Б). Зараженные клетки больше окружающих и содержат внутриядерные включения в виде гало (показаны острием стрелки) и цитоплазматические включения (показаны стрелками). Штрихи 10 мкм, увеличение одинаково для обеих панелей. Источник: Розалинд Уэллес, Медицинский центр университета Дьюка

### Цитомегаловирус

Клинически выраженные цитомегаловирусные (CMV) инфекции отмечаются у лиц с нарушением иммунитета, хотя вирус может вызывать похожий на мононуклеоз синдром у лиц с нормальной иммунной функцией [19]. Типичные зоны инфекции — надпочечники, легкие, желудочно-кишечный тракт, центральная нервная система, сетчатка глаз, но затронут может быть практически любой орган. Небольшое количество зараженных клеток может быть случайной находкой на биопсии пациентов с неинфекционным первичным заболеванием.

У зараженных CMV клеток увеличены ядро и цитоплазма — отсюда и название «цитомегалия». Обычно имеются внутриядерные включения с различными свойствами. На ранних стадиях их легко спутать с включениями других герпесвирусов. Созревая, тельца становятся круглыми или овальными, с ровными границами. Часто имеются краевое скопление хроматина и светлая зона вокруг включения (такая особенность на гистологических (рис. 10.3, А) и цитологических (рис. 10.3, Б) препаратах называется «глаз совы»). Кластеры готовых вирионов часто видны как множественные базофильные гранулярные

включения — уникальная находка для CMV среди всех герпесвирусов (см. рис. 10.3).

Цитомегаловирус может заражать клетки самых разных типов, в том числе эндотелий сосудов, эпителий желез, гистиоциты, нейроны и фибробласты. Признаки инфекции варьируют в зависимости от органа. На биопсиях ЖКТ наиболее распространенная зона инфекции — эндотелий сосудов (в *lamina propria*). В печени заражаются гепатоциты, но могут заразиться и другие типы клеток. Зараженные гепатоциты часто окружены кластерами нейтрофилов. В ткани легких мишень — дыхательный эпителий, но могут быть также стромальные и эндотелиальные клетки в бронхиальной *lamina propria*.

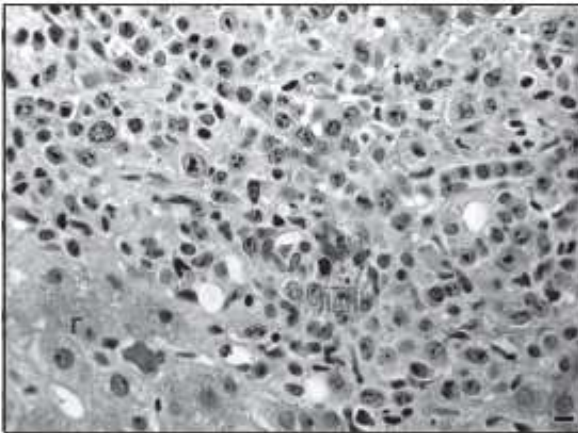
На фоне отчетливых классических цитопатических изменений, ассоциированных с CMV, в некоторых образцах могут отсутствовать характерные включения, особенно если они взяты у лиц с умеренной иммуносупрессией (например, у пациентов после трансплантации органов) на очень ранних или поздних стадиях цикла репликации. Поэтому рекомендуется пользоваться вспомогательными методиками (иммунопероксидазное окрашивание) для пациентов с высокой вероятностью CMV-инфекции.

### Вирус Эпштейна—Барр

У пациентов с нормальным иммунитетом вирус Эпштейна—Барр (EBV) вызывает инфекционный мононуклеоз (в целом доброкачественное и самоограниченное системное инфекционное заболевание), назофарингеальную карциному (эндемичная африканская форма лимфомы Беркитта) и значительное количество лимфом Ходжкина. У реципиентов после трансплантации органов или костного мозга EBV оказывается причиной посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (ПТЛР) и мезенхимных новообразований, лейкомиосарком [20]. У ВИЧ-инфицированных пациентов повышен риск возникновения EBV-ассоциированных расстройств, в том числе волосатой лейкоплакии полости рта (незлокачественное поражение) [21] и множества В-лимфом, включая первичную лимфому ЦНС, диффузную крупноклеточную В-лимфому и первичную выпотную лимфому [22].

При инфекционном мононуклеозе EBV инфицирует эндотелий слюнных желез, а затем В-лимфоциты. Зараженные В-лимфоциты ускоряют пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, которые становятся крупными, с вакуолизированной цитоплазмой и неправильным контуром ядра. Эти «атипичные» Т-лимфоциты чаще всего выявляются в мазках периферической крови, но их обнаруживают также при биопсии лимфоидных и других органов; их следует четко отличать от неопластических клеток, на которые они похожи.

Проллиферирующие клетки при ПТЛР являются вирус-трансформированными В-лимфоцитами. Встречается целый спектр нарушений от доброкачественных поликлональных пролифераций до явных



**Рис. 10.4.** Посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение в трансплантате печени. Пролиферация атипичных лимфоцитов расширяет порталный тракт; пролиферирующие клетки имеют ядра неправильной формы, во многих из них имеются ядрышки. Смежные гепатоциты (г) имеют нормальный вид (штрих 10 мкм)

В-лимфом. Гистологический маркер — инфильтрат лимфоидных клеток с разной степенью клеточной атипии. Чтобы различить ПТЛР (преобладание В-лимфоцитов) и отторжение трансплантата (преобладание Т-лимфоцитов), полезно провести иммунопероксидазное окрашивание на В- и Т-клеточные маркеры. Участки поражения включают сами трансплантаты (рис. 10.4) и другие органы, в том числе головной мозг.

Волосатая лейкоплакия полости рта — уникальное поражение из всех EBV-ассоциированных в том плане, что литическая инфекция играет главную роль в его патогенезе. Зараженный эпителий полости рта подвергается гиперплазии, в его верхних слоях видны похожие на койлоциты клетки с внутриядерными включениями Кодри типа А [21]. При других EBV-ассоциированных состояниях в латентно инфицированных или трансформированных клетках нет специфических включений или цитопатического эффекта; их можно выявить с помощью методик иммуногистохимии или хромогенной гибридизации *in situ*.

#### Вирус простого герпеса и вирус варицелла зостер

Вирус простого герпеса (HSV) — распространенная причина пузырьчатых инфекций кожи и слизистых оболочек, может также вызывать фарингит, эзофагит и энцефалит (чаще всего поражаются височные доли). Вирус варицелла зостер (VZV) вызывает ветрянку и герпес зостер (опоясывающий лишай) [23]. У лиц с нарушенным иммунитетом и младенцев оба вируса иногда ассоциированы с тяжелыми пневмони-

ями, гепатитами или рассеянной инфекцией. Инфекция может быть первичной или возникнуть в результате реактивации латентного вируса в нервных окончаниях и ганглиях, иннервирующих поверхность кожи или слизистых.

В зараженных HSV-1, HSV-2 или VZV клетках наблюдаются цитопатические изменения, неразличимые при световой микроскопии. Внутри клеточных ядер имеются округлые эозинофильные включения Кодри типа А. Однако зачастую нуклеоплазма приобретает вид матового стекла без отчетливых включений. Некоторые исследователи высказывали предположение, что включения Кодри чаще возникают при вторичных инфекциях HSV, чем при первичных; другие же оспаривают такую гипотезу [7]. Цитомегалии одноядерных клеток обычно не наблюдается. Однако во многих случаях образуются гигантские многоядерные синцитиальные клетки благодаря слиянию нескольких зараженных вирусом клеток (рис. 10.5). Чаще всего поражается многослойный слущивающийся эпителий. Помимо отмеченных выше цитопатических эффектов в зараженном эпителии происходит множество неспецифических изменений, в том числе гиперплазия, внутриклеточный отек, баллонная дегенерация базального слоя и образование пузырьков. При тяжелой инфекции возможно изъязвление и субэпителиальные воспалительные инфильтраты. Вирусы герпеса считаются провоцирующим фактором мультиформной эритемы — дерматита с мишеневидными высыпаниями; герпес-ассоциированная мультиформная эритема (ГАМЭ) считается наиболее распространенной формой нарушения [24].

Иногда воспаление и вирусные включения можно увидеть в ганглиях, связанных с активным герпесом зостер. При HSV-гепатите



**Рис. 10.5.** Инфекция простого герпеса в мазке шейки матки по Папаниколау. Зараженные клетки многоядерные, хроматин в ядрах выглядит, как «матовое стекло». Некоторые ядра содержат мелкие глыбки темноокрашенного материала, но явных вирусных включений нет (штрих 10 мкм). *Источник:* фото Розалинд Уэллес, Медицинский центр Университета Дьюка

у пациентов с нарушенным иммунитетом часто имеются обширные зоны некроза; вирусные цитопатические изменения чаще всего выявляются по краям таких поражений, подтверждение можно делать с помощью иммуногистохимических красителей. Латентная инфекция HSV и VZV не выявляется при обычной световой микроскопии.

### *Герпесвирусы человека 6, 7 и 8*

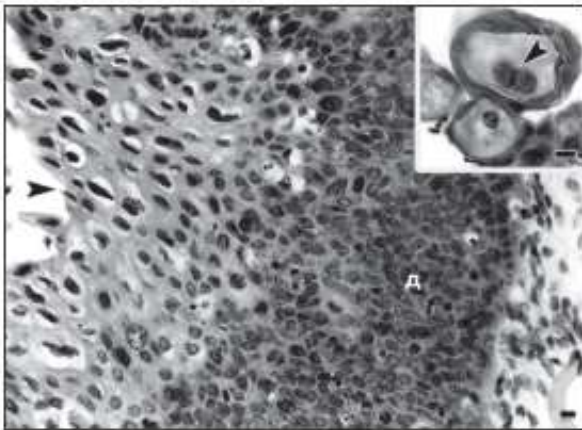
Герпесвирус человека (HGV)-6 вызывает внезапную экзантему (младенческая розеола, шестая болезнь) — кожную сыпь, связанную с энцефалитом, лихорадкой и супрессией костного мозга у взрослых с подавленным иммунитетом [25]. Возможно также, что иногда HGV-7 становится причиной экзантемы. HGV-6 и HGV-7 считаются вероятными провоцирующими факторами розового лишая — другой доброкачественной экзантемы, проходящей без лечения, хотя точная связь до сих пор не установлена [26]. Материал генома HGV-8 впервые был выделен из поражений саркомы Капоши — злокачественного новообразования сосудистого происхождения; причинная роль этого вируса в патогенезе данной опухоли надежно доказана. С вирусом HGV-8 связаны первичная выпотная лимфома и мультицентрическая болезнь Кастельмана, возникающие преимущественно у пациентов с заболеваниями иммунной системы [27, 28].

Биопсию редко используют для диагностики причин возникновения экзантемы или розового лишая, но она играет ключевую роль в диагностике связанных с HGV-8 опухолей, каждая из которых имеет отчетливые гистологические и иммуногистохимические признаки. HGV-6, HGV-7 и HGV-8 не дают специфических цитопатических эффектов в биопсийных или цитологических образцах; HGV-8 в тканях биопсии можно выявить с помощью иммунопероксидазных красителей.

### *Вирус папилломы человека*

Вирус папилломы человека (HPV) заражает клетки слущиваемого эпителия, выстилающего различные поверхности слизистых и кожи: ротовую полость, глотку и аногенитальную область. Зараженные HPV клетки имеют базофильную нуклеоплазму, они темноокрашенные, изредка встречаются тельца-включения. И в гистологических, и в цитологических препаратах ядра зараженных клеток часто сморщенные, окружены перинуклеарным светлым гало. Это явление, называемое «койлоцитоз», особенно распространено в генитальных бородавках (остроконечных кондиломах). Во многих образцах отмечаются двуядерные клетки (рис. 10.6).

Часто наблюдается бурная пролиферация эпителиальных клеток с увеличенной папиллярной конфигурацией; в кожных бородавках выражен кератоз. Зараженные вирусом папилломы человека клетки могут подвергаться череде неопластических изменений, включая дисплазию различной степени (рис. 10.6), сквамозно-кле-

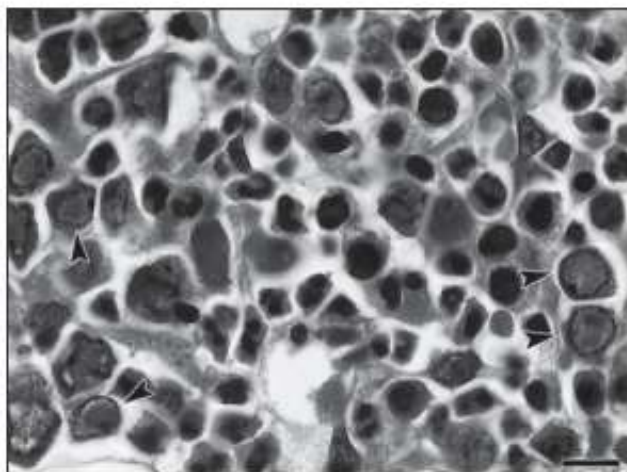


**Рис. 10.6.** Инфекция вируса папилломы человека в биопсии шейки матки и мазке по Папаниколау. В поверхностных слоях эпителия взятой на биопсии ткани видны койлоциты со сморщенными ядрами и светлым перинуклеарным пространством (показано острием стрелки); в более глубоких слоях видны признаки дисплазии (д). На мазке по Папаниколау (врезка) также видны два койлоцита; один из них двуядерный (показан острием стрелки) (штрихи 10 мкм). Источник: фото д-ра Стенли Роббоя (биопсия) и Розалинд Уэллес (мазок по Папаниколау), Медицинский центр Университета Дьюка

точную карциному *in situ* и инвазивную сквамозно-клеточную карциному [29]. Помимо непосредственного изучения ткани рутинно выполняются молекулярные тесты для выявления инфекции шейки матки [30]. В продаже имеются иммуногистохимические красители на HPV, включая суррогатные маркеры инфекции (избыточная экспрессия p16).

### Парвовирус

Парвовирус В19 ассоциирован с поражением кожи (инфекционная эритема, или «пятая болезнь», и пурпура, называемая «синдромом перчаток и носков»), артропатиями, аплазией эритроцитов и внутриутробной инфекцией, ассоциированной с водянойкой плода [31]. Инфекция клеток-мишеней требует наличия Р-антигена группы крови, первично экспрессируемого клетками эритроидной линии и в некоторой степени тромбоцитами и клетками некроветворных органов [32]. Парвовирусная инфекция костного мозга или участков внедуглярного гемопоэза вызывает эритроидную гипоплазию с гигантскими прономобластами. Ядра пораженных эритробластов часто имеют стеклянистый вид с глыбчатым периферическим хроматином и эозинофильными включениями разного размера (рис. 10.7). Миелоидное созревание обычно нормальное, хотя может наблюдаться небольшая периферическая нейтропения и тромбоцитопения [32].



**Рис. 10.7.** Инфекция парвовируса В19 в костном мозге. Видны многочисленные гигантские пронормобласты с внутриядерными включениями (показаны остриями стрелок) (штрих 10 мкм)

Другой парвовирус, бокавирус человека, недавно был признан потенциальной причиной острых респираторных расстройств, особенно у детей [33]. Гистологические признаки инфекции этим вирусом пока не установлены.

### *Вирус полиомы*

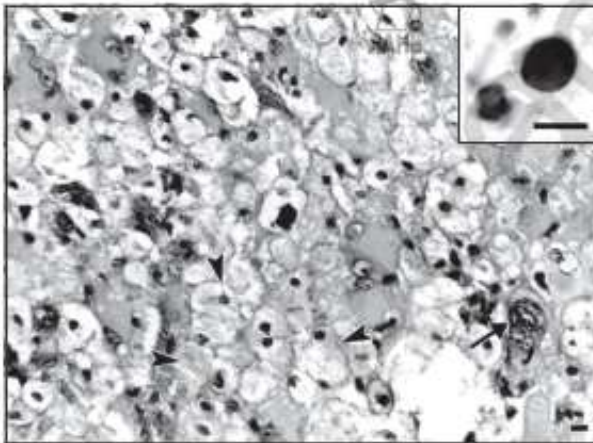
Два хорошо описанных вируса полиомы человека связаны с инфекциями, выявляемые при световой микроскопии. JC-вирус вызывает тяжелую инфекцию ЦНС, называемую прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией (ПМЛ) [34], а ВК-вирус поражает мочевые пути [35]. Клинически значимые инфекции обоими вирусами отмечаются почти исключительно у пациентов с нарушенным иммунитетом. ПМЛ — причина гибели многих пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), онкогематологических пациентов и пациентов, лечившихся от аутоиммунных расстройств антиинтегриновыми моноклональными антителами. ВК-вирусные инфекции распространены у лиц со СПИДом или получающих химиотерапию; за последние 10 лет они стали существенной проблемой у пациентов с пересаженной почкой. Необычное кожное нарушение у иммунокомпрометированных пациентов, триходисплазия, приписывается вирусу полиомы, отличному от JC и ВК [36].

Зараженные вирусом полиомы клетки имеют множество изменений ядра, включая его увеличение, нуклеоплазму типа матового стекла, амфифильные внутриядерные включения различного размера и дегенерацию ядерной мембраны с образованием «клетки-кляксы».



Цитоплазматические включения при световой микроскопии не выявляются, отсутствуют гигантские синцитиальные клетки.

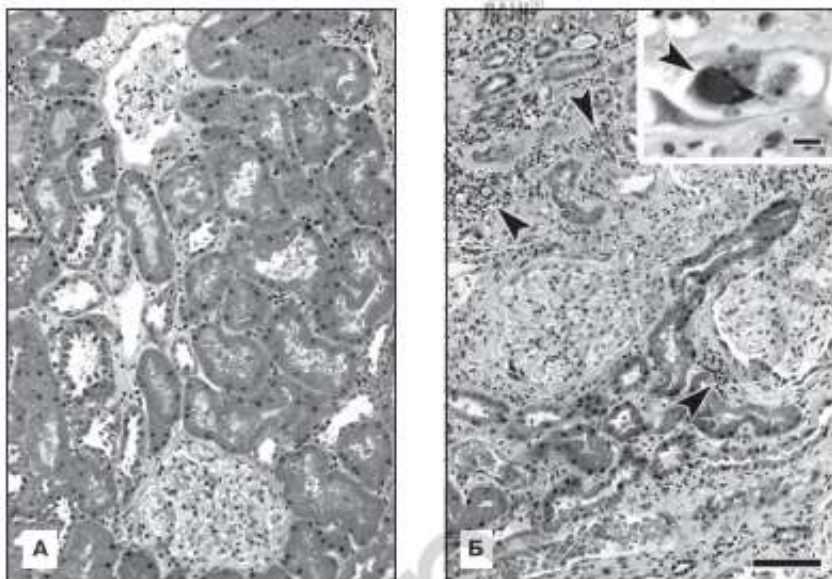
Клетками-мишенями для вируса JC являются олигодендроциты белого вещества (рис. 10.8). Наблюдается прогрессирующая демиелинизация пораженных зон; обычно много нагруженных липидами фагоцитов, называемых «клетки-решетки» (*gitter cells*). Во многих случаях также имеются реактивные астроциты, у них могут наблюдаться причудливые изменения морфологии ядер. Может присутствовать периваскулярный мононуклеарный воспалительный инфильтрат, но чаще воспаление минимальное за исключением воспалительного синдрома восстановления иммунной системы [34].



**Рис. 10.8.** Прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия. Видны крупные кластеры заполненных липидами «клеток-решеток» (острия стрелок), а также астроциты с крупными причудливыми ядрами (показан стрелкой). Иногда при большем увеличении (врезка) видны зараженные JC-вирусом клетки, гомогенный хроматин которых имеет вид матового стекла (штрихи 10 мкм)

В нативной почке первичной мишенью вируса BK является переходный эпителий, выстилающий мочевой пузырь, мочеточники и почечную лоханку; в результате обычно возникает геморрагический цистит. У пациентов с пересаженной почкой и изредка без пересадки может поражаться эпителий трубочек, что в некоторых случаях приводит к интенсивному тубулоинтерстициальному нефриту, который может закончиться потерей трансплантата (рис. 10.9). У этой формы инфекции есть ряд признаков, общих с клеточным отторжением аллотрансплантата: мононуклеарное воспаление и лимфоцитарная инфильтрация трубочек; полезные отличительные признаки BK-нефрита включают цитопатические изменения ядер зараженных вирусом клеток, пятнистое распределение и явный плазматитарный компонент в воспалительном инфильтрате. Слученные пораженные BK-вирусом

клетки можно обнаружить в моче при цитологическом исследовании; они получили название «клетки-ловушки» (*decoy cells*).



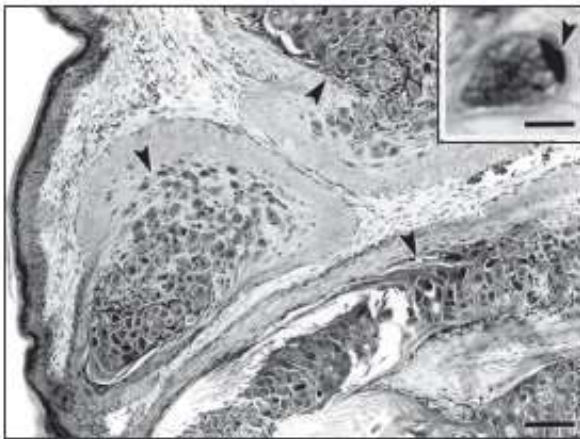
**Рис. 10.9.** Полиомавирусная инфекция в трансплантате почки. Два поля одной и той же биопсии показывают корковый слой с минимальными аномалиям (А) и обширное интерстициальное воспаление (острия стрелок, Б) (штрих 100 мкм, увеличение одинаковое на обеих панелях). На врезке видна зараженная вирусом клетка эпителия трубочек, содержащая внутриядерное включение (острия стрелки) (штрих 10 мкм)

### Поксивирус

С искоренением оспы наиболее распространенной поксивирусной инфекцией человека, отмеченной патологоанатомами, является контагиозный моллюск — в целом безвредная инфекция клеток эпидермиса [37]. Иногда у человека возникают кожные инфекции, вызванные различными поксивирусами животных [38]; один из них, вирус оспы обезьян, был завезен в США в 2003 г. в результате цепи инфекций, включавшей африканских грызунов и луговых собачек, ввезенных в качестве домашних животных [39].

В отличие от других патогенных ДНК-вирусов, поксивирусы реплицируются в цитоплазме, продуцируя множество телец-включений, называемых «тельцами Гарнери» при оспе и «моллюсковыми тельцами» при контагиозном моллюске. В последнем случае включения изначально видны как эозинофильные внутрицитоплазматические тельца в мальпигиевом слое над базальным слоем кератиноцитов. Все зараженные клетки поднимаются к поверхности эпителия, включе-

ния увеличиваются, смещая ядро, и становятся базофильными. Проллиферирующий эпидермис смещается вниз в дерму (дольчатый паттерн), обычно с минимальной воспалительной реакцией (рис. 10.10).



**Рис. 10.10.** Контагиозный моллюск на биопсии кожи. Гнезда клеток, содержащих моллюсковые тельца (показаны остриями стрелок), покрытые эпидермальным слоем, смещены в дерму. В единичной зараженной клетке при большем увеличении (врезка) видно смещение ядра (показано острием стрелки) крупным моллюсковым тельцем (штрих на основной панели 100 мкм, на врезке — 10 мкм). Источник: фото д-ра Виктора Прието, Медицинский центр Университета Дьюка

## РНК-вирусы

### Энтеровирусы

Энтеровирусы — многообразная группа мелких РНК-вирусов, ассоциированных с клиническими синдромами, варьирующими от умеренного острого самоограниченного гастроэнтерита до угрожающих жизни инфекций сердца, печени и центральной нервной системы. Довысокачественная самоограниченная вирусная экзантема (заболевание кистей, стоп и ротовой полости) также вызывается энтеровирусами. Хотя световая микроскопия играет небольшую роль в диагностике энтеровирусных инфекций, некоторые факты заслуживают краткого обсуждения.

В первой половине прошлого века вирус полиомиелита был причиной сезонных эпидемий, приводящих у некоторой небольшой части больных к параличу. Полиовирусная инфекция как центральной, так и периферической нервной системы дает комбинацию гистологических находок, включая поражение нейронов в виде некроза, реактивный глиоз и инфильтрацию клетками воспаления. Раннее накопление нейтрофилов сменяется мононуклеарным воспалением, часто с образованием агрегатов глиальных клеток и лимфоцитов (микроглиаль-

ные узелки). Может возникнуть фагоцитоз пораженных нервных клеток (нейрофагия) [40, 41].

Другие члены семейства энтеровирусов, в том числе вирусы Коксаки групп А и В, а также эховирусы, имеют этиологическую связь с тяжелыми заболеваниями, такими как менингит, энцефалит, миокардит, глазные и системные инфекции [42]. Хотя гистологические находки при этих расстройствах не являются специфическими, биопсия тканей иногда оказывается полезной, чтобы отличить их от других патологических процессов и оценить динамику болезни. Например, биопсия эндокарда иногда имеет значение для диагностики и определения стадии миокардита, ассоциированного с вирусом Коксаки и другими — особенно вместе с методиками иммуногистохимии молекулярной диагностики [43].

### *Ретровирусы человека*

Выявленный в 1979 г. Т-лимфотропный вирус человека (HTLV)-1 был первым из описанных ретровирусов человека и первой инфекционной причиной лейкемии человека, Т-лейкемии/лимфомы взрослых (ТЛЛВ). ТЛЛВ преобладает в Японии, странах Карибского бассейна и некоторых частях Южной Америки и Африки (где эндемична HTLV-1-инфекция). Для заболевания характерны лейкоцитоз, лимфаденопатия, кожные проявления, органомегалия и гиперкальцемия. При HTLV у лейкозных клеток, получивших название «клетки-цветы», извилистые и многодольчатые ядра. Иногда злокачественные клетки имеют морфологию клеток Ходжкина. Специфические вирусные включения не выявляются, диагноз базируется на морфологической картине тканей и других вспомогательных тестах [44, 45]. Инфекция HTLV-1 (возможно, и родственного вируса HTLV-2) может вызвать хроническую энцефаломиелопатию, называемую HTLV-1-ассоциированной миелопатией или тропической спастической парезией (АМ/ТСП) [46].

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) вызывает СПИД. Как уже отмечено, оппортунистические вирусные инфекции (в ряде случаев и вызываемые ими опухоли) являются источником высокой заболеваемости и смертности у пациентов со СПИДом. Описано несколько патологических изменений, непосредственно приписываемых ВИЧ-1. Лимфоузлы у инфицированных ВИЧ претерпевают ряд изменений, начиная с фолликулярной гиперплазии и заканчивая инволюцией. Часто наблюдаются промежуточные состояния. ВИЧ-1-инфекция макрофагов/микроглии в нервной системе играет роль в патогенезе нескольких осложнений, в том числе когнитивных расстройств, вакуолярной миелопатии (форма дегенерации спинного мозга) и сенсорной нейропатии [47]. ВИЧ-1-инфекция клеток почечных трубочек и клубочков — причина ВИЧ-ассоциированной нефропатии, имеющей отношение и к коллапсному гломерулярному склерозу, и к тубулоинтерстициальной дегенерации [48].

### *Вирусы гриппа и парагриппа*

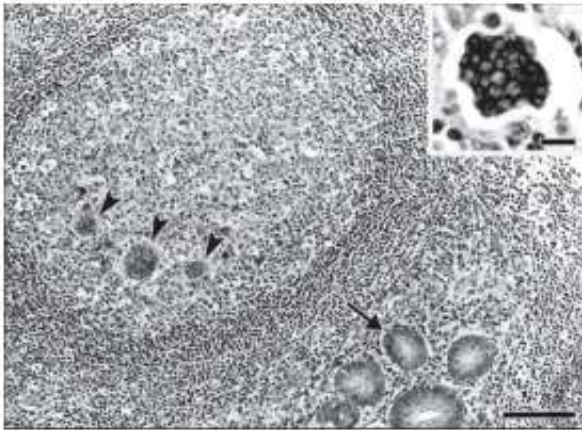
Вирусы гриппа реплицируются в эпителии всех дыхательных путей, вызывая лихорадочные заболевания — от трахеобронхита до пневмонии. При инфекциях верхних дыхательных путей поражение эпителия трахеи и бронхов сопровождается воспалением подслизистой и скоплением секретов в просвете. Регенерация эпителия может сопровождаться сквамозной метаплазией. Признаки гриппозной пневмонии включают микроваскулярный тромбоз, интерстициальный отек и геморрагию, а также диффузное поражение альвеол с образованием гиалиновых мембран. Инфильтрация нейтрофилами часто отсутствует или слабая, особенно на ранних стадиях инфекции; большое количество нейтрофилов указывает на бактериальную суперинфекцию [49].

Вирусы парагриппа также вызывают разнообразные респираторные синдромы, включая круп (острый ларинготрахеобронхит), бронхиолит и пневмонию. Подобно вирусам гриппа они нацелены на клетки дыхательного эпителия. Зараженные эпителиальные клетки могут образовывать гигантские синцитиальные клетки, часто выделяется белковый экссудат [50].

### *Вирус кори*

Вирус кори вызывает лихорадочное заболевание, характеризующееся макулопапулярной сыпью, симптомами поражения верхних дыхательных путей и конъюнктивитом. Вирус использует дыхательные пути как входные ворота и распространяется гематогенно во многие лимфоидные и другие органы. Хотя корь сама по себе заболевание доброкачественное и проходит без лечения, изредка у детей возникают осложнения со стороны центральной нервной системы, включая острый демиелинизирующий энцефаломиелит, коревой энцефалит с включениями и подострый склерозирующий панэнцефалит, часто приводящие к гибели [51].

Нуклеокапсиды вируса кори, в отличие от большинства РНК-вирусов, выявляются в ядре и цитоплазме. В результате при световой микроскопии выявляются внутриядерные и цитоплазматические включения. Внутриядерные включения в целом эозинофильные и часто окружены прозрачным гало; цитоплазматические включения обычно более мелкие и менее заметные. Коревая инфекция часто приводит к образованию гигантских синцитиальных клеток. В инкубационный период такие клетки, называемые клетками Вартина—Финкельдея, могут присутствовать в лимфоидной ткани (рис. 10.11), позволяя поставить предварительный диагноз. В легких вирус кори может вызывать интерстициальную пневмонию с гигантскими клетками, содержащими включения.



**Рис. 10.11.** Червеобразный отросток ребенка с корью. В лимфоидном фолликуле видно несколько клеток Вартина—Финкельдея (показаны остриями стрелок); к фолликулу прилегает кластер слизистых желез. При большем увеличении (врезка) видна многоядерность клеток Вартина—Финкельдея (штрих на главной панели 100 мкм, штрих на врезке — 10 мкм). Источник: фото д-р Джимми Грин, Медицинский центр Военно-морских сил США, Портсмут, Вирджиния

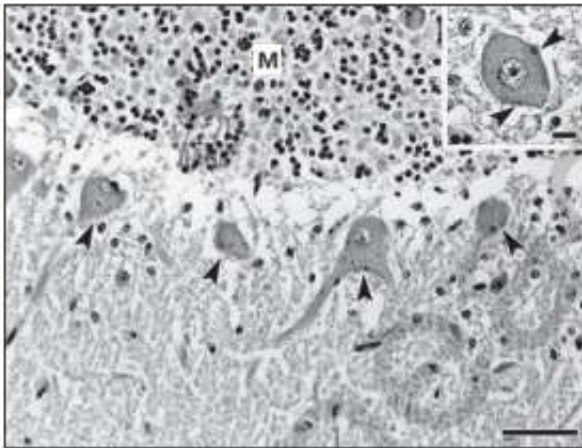
### Вирус эпидемического паротита

Вирус эпидемического паротита является оболочным РНК-вирусом, вызывает характерное припухание околоушных слюнных желез. Помимо слюнных желез могут поражаться гонады, поджелудочная железа, сердце, почки, дыхательные пути и центральная нервная система. Иногда, особенно у взрослых, возникают тяжелые мультисистемные инфекции. Характерной для вируса цитопатологии нет; в пораженных органах — интерстициальный отек и лимфоцитарная инфильтрация, изредка — геморрагия, инфаркт и некроз. Сообщалось также о вакуолизации и отшелушивании эпителия протоков с их набуханием и обструкцией [52]. Многоядерные гигантские клетки и эозинофильные цитоплазматические включения наблюдались в культуре ткани, на гистологических срезах их не было.

### Вирус бешенства

Вирус бешенства и другие представители рода *Lyssavirus* вызывают бешенство — почти однозначно фатальный энцефаломиелит. В странах с эффективной вакцинацией домашних животных бешенство ограничивается дикими и одичавшими животными, но в развивающихся странах заболевание важная (и, возможно, недооцененная) проблема здравоохранения и ветеринарии [53]. В прошлом диагностика бешенства базировалась в основном на гистологической идентификации вирусных включений, называемых тельцами Негри (эозинофильные

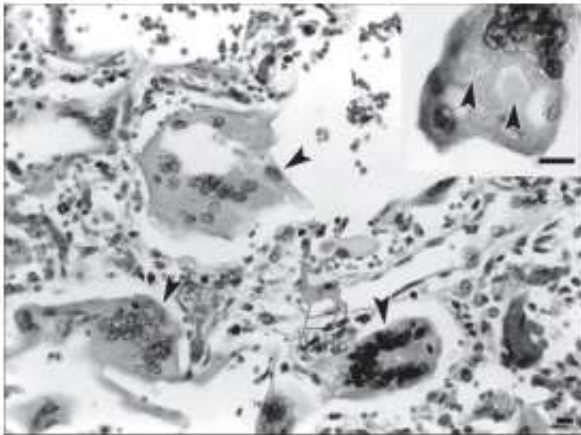
цитоплазматические включения чаще всего выявляются в крупных нейронах Аммонова рога гиппокампа и в клетках Пуркинье мозжечка (рис. 10.12) [54]. Благодаря повышенной чувствительности прямой метод флуоресцентных антител вытеснил гистологическое выявление телец Негри при первичной диагностике вируса бешенства в тканях [53, 54].



**Рис. 10.12.** Энцефалит бешенства в мозжечке лошади. Крупные пирамидальные клетки (показаны остриями стрелок), прилегающие к молекулярному слою (M), содержат многочисленные цитоплазматические включения (тельца Негри). Единичная зараженная клетка при большем увеличении (врезка) содержит несколько телец Негри (показаны остриями стрелок) (штрих на главной панели 100 мкм, штрих на врезке — 10 мкм). Источник: фото д-ра Глен Сэндберг и д-ра Кимберли Гир, Институт патологии Вооруженных сил США

### *Респираторно-синцитиальный вирус*

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) — крупный РНК-вирус, вызывающий инфекции верхних и нижних дыхательных путей, чаще всего у младенцев и маленьких детей. Большому риску тяжелых инфекций подвержены младенцы более раннего возраста, люди с врожденными сердечно-легочными аномалиями и поражением иммунной системы. В таких случаях микроскопия легких выявляет слущенный эпителий, слизь и детрит в мелких воздушных путях с последующим перерастяжением дистальных отделов легких. Как следует из названия, инфекция связана с присутствием гигантских синцитиальных клеток в альвеолярных пространствах [55]. Эпителиальные клетки могут содержать цитоплазматические включения, окруженные тонким периферическим гало (рис. 10.13). При более легких формах инфекции, включая большую часть того, что наблюдается в биопсиях легочных трансплантатов, гистологические находки в целом неспецифические.



**Рис. 10.13.** Респираторно-синцитиальная инфекция в легочной ткани. Видны несколько гигантских многоядерных клеток (показаны остриями стрелок). При большем увеличении (врезка) в гигантских клетках видны бледные цитоплазматические включения, окруженные гало (штрихи 10 мкм) Источник: фото д-ра Виктора Рогли, Медицинский центр Университета Дьюка

### Вирус краснухи

Постнатальный контакт с вирусом краснухи вызывает доброкачественную детскую экзантему, но внутриутробная инфекция может вызвать тяжелые врожденные аномалии [56]. При осмотре младенца или плода, контактировавшего с вирусом краснухи в первом триместре беременности, могут выявляться пороки сердца, задержка роста или патологии глаз; также повышается риск самопроизвольного аборта. При микроскопии могут выявляться интестициальная пневмония, гепатит, минерализация мозговых артериол и хроническое воспаление структур внутреннего уха. В плаценте возможен лимфогистиоцитарный виллит, в трофобласте и эндотелиальных клетках выявлялись эозинофильные цитоплазматические включения. В большинстве случаев отчетливой вирусной цитопатии не было.

### Системные заболевания, связанные с различными группами вирусов

#### Арбовирусный энцефалит

Разнообразная группа вирусов, переносимых членистоногими, способна вызывать энцефалит. В группу арбовирусов входят члены семейств *Flaviviridae*, *Alphaviridae*, *Bunyaviridae* и *Reoviridae*.

Большинство дает схожую гистологическую картину: периваскулярная и менингеальная инфильтрация преимущественно мононуклеарными клетками воспаления. Может отмечаться вариабельный некроз нейронов, часто ассоциированный с кластерами клеток воспаления. Микроглиальные узелки связывали с вирусным энцефали-



том, но специфичность этой находки для вирусной инфекции не ясна. Восточный конский энцефалит часто ассоциирован с более тяжелой острой формой поражения тканей, включая распространенный некроз и нейтрофильные инфильтраты [57–59]. В последние десятилетия во многих частях западного полушария эпидемических масштабов достиг вирус лихорадки Западного Нила (см. ниже).

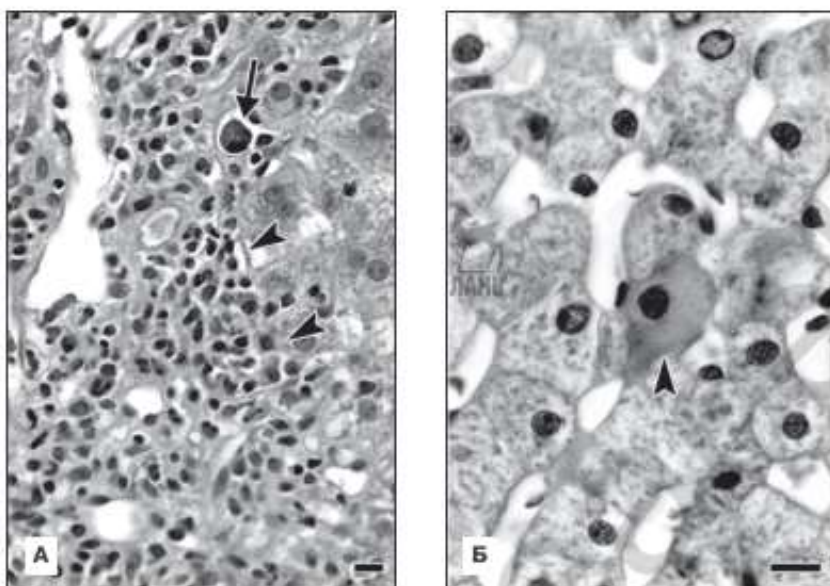
### Вирусы гастроэнтерита



Гастроэнтерит вызывают пикорнавирусы, калицивирусы, ротавирус и коронавирусы. Связанные с этими патогенами изменения на светомикроскопическом уровне неспецифичны: разрушение кишечных ворсинок, повышение количества клеток воспаления в *lamina propria*, дегенеративные изменения в клетках кишечного эпителия [60]. При тяжелой инфекции возможны обширное воспаление и некроз. При подозрении на вирусный гастроэнтерит редко делают биопсию, предпочитая менее инвазивные и более чувствительные способы диагностики. Гистопатологические признаки вирусного энтерита пересекаются с признаками отторжения трансплантата тонкой кишки — потенциальный источник путаницы при биопсиях трансплантата [61].

### Вирусы гепатита

Вирусы гепатита — разнообразная группа ДНК- и РНК-вирусов со специфическим тропизмом к ткани печени. Эти патогены вызывают широкий спектр клинических проявлений: от острой фульминантной печеночной недостаточности до хронической прогрессирующей дисфункции печени и цирроза. Хронические инфекции вирусами гепатита В и С (HBV и HCV) приводят к возникновению гепатоклеточной карциномы [10, 11, 14]. Первичное выявление и идентификация специфических вирусов гепатита проводится методами серологической или молекулярной диагностики. Однако гистопатология играет жизненно важную роль в оценке течения и прогрессирования этих инфекций. Все вирусы гепатита заражают гепатоциты. При острых инфекциях гистологические изменения первично происходят в долях и включают гибель гепатоцитов (с обязательным образованием безъядерных эозинофильных остатков, называемых «ацидофильными тельцами», «тельцами Каунсилмена»), репаративную активность (митозы, многоядерность, вариабельность размера ядра) и инфильтрацию клетками воспаления различных линий. Гистологическая картина при хроническом гепатите обычно обусловлена вторичными изменениями в портальных триадах и около них, включая скопление мононуклеаров, фиброз и повреждение перипортальных гепатоцитов (рис. 10.14, А) [62]. Помимо воздействия на печень HCV связан с различными системными проявлениями, включая смешанную криоглобулинемию II типа и несколько почечных гломерулярных расстройств.



**Рис. 10.14.** Вирусный гепатит. **А.** Печень с инфекцией гепатита С. Портальный тракт с венулой расширен воспалительным инфильтратом, затрагивающим пор털но-гепатоцитный интерфейс (показано остриями стрелок). Рядом с интерфейсом виден гепатоцит с апоптозом — ацидофильное тельце (показано стрелкой). **Б.** Печень с инфекцией гепатита В. Виден гепатоцит с цитоплазмой типа «матовое стекло» (острия стрелок) (штрихи 10 мкм). *Источник:* фото **Б** — д-р Пол Килленберг, Медицинский центр Университета Дьюка

Дифференциация вирусных гепатитов друг от друга и от гепатитов другой этиологии (например, лекарственно-токсических, аутоиммунных метаболических расстройств) зачастую невозможна по одной лишь гистологии. Инфекции HBV и HCV — два наиболее распространенных типа в биопсийном материале — иногда вполне различимы гистологически. Для хронической инфекции HCV по сравнению с HBV характерно наличие портальных лимфоидных скоплений, воспалительное поражение эпителия желчных протоков и дольковый стеатоз [64]. При хронической HBV-инфекции из-за накопления поверхностного антигена (HBsAg) в цитоплазме гепатоцитов на окрашенных Г-Э срезах она иногда бывает похожа на матовое стекло (рис. 10.14, Б). Эту находку следует подтвердить иммунопероксидазным окрашиванием на HBsAg, поскольку богатая гликогеном цитоплазма может иметь схожий вид.

### *Вирусные геморрагические лихорадки*

Вирусные геморрагические лихорадки вызываются вирусами четырех семейств: Flaviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae и Filoviridae. В пе-

редаче этих заболеваний участвуют членистоногие как переносчики и грызуны как резервуар; у некоторых вирусов лесной или джунглевый цикл, включающий москитов и нечеловекообразных приматов. Вирусы геморрагических лихорадок могут поражать широкий спектр клеток, включая компоненты иммунной системы (макрофаги, моноциты, дендритные клетки), эндотелиальные клетки, гепатоциты и клетки коры надпочечников. Разрушение иммунной системы позволяет вирусам бесконтрольно реплицироваться, медиаторы воспаления работают несогласованно, и возникают шокоподобный синдром и дефекты в каскаде свертывания. Эти факторы наряду с непосредственной эндотелиальной репликацией приводят к повреждению сосудов, нарушениям коагуляции и геморрагии [65, 66].

Не существует четких диагностических признаков вирусных геморрагических лихорадок методами световой микроскопии, хотя некоторые из этих возбудителей могут вызывать более обширное поражение определенных органов. Большинство вызывает мультисистемный сосудистый тромбоз различной степени, геморрагии, отек и некроз тканей, часто при минимальном воспалении. Некроз гепатоцитов, часто с межзональным характером, преобладает при желтой лихорадке, но также отмечался и при других геморрагических лихорадках, включая лихорадку денге [67]. Ниже описаны две формы хантавирусной инфекции, мишенью которой являются почки и легкие.

### *Новые вирусные инфекции*

Хотя большинство описанных в этой главе вирусов за долгие годы хорошо охарактеризованы, недавно было описано несколько новых возбудителей, способных вызывать угрожающие жизни инфекции. Многие из них — зоонозные патогены, получившие способность заражать хозяев-людей. Несколько патологоанатомов непосредственно сталкивались с этими вирусами. Некоторые инфекции у людей встречаются редко и/или имеют ограниченное географическое распространение; для других обычным стандартом диагностики являются серология или тесты нуклеиновых кислот, а не биопсия. Далее следует краткое знакомство с некоторыми из новых вирусов, приводятся ссылки на современную литературу для дополнительной информации.

Хантавирусы — члены семейства *Bunyaviridae* — переносятся грызунами и вызывают у человека поражение кровеносных сосудов с выходом плазмы [68, 69]. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая группой хантавирусов Старого Света, характеризуется лихорадкой с последующими фазами гипотензии, олигоурии и диуреза. На образцах биопсии пациентов с ГЛПС виден острый интерстициальный нефрит, первично поражающий мозговой слой [68]. Хантавирусный легочный синдром (ХЛС), вызываемый хантавирусами Нового Света, впервые был признан в 1993 г., хотя ретроспективные анализы архивных тканей документально подтвер-

дили более ранние случаи инфекции. У пациентов с ХЛС к поражению легочных сосудов присоединяется отек, часто фатальный.

Вирус лихорадки Западного Нила — передаваемый москитами флавивирус — вызывает целый спектр нарушений ЦНС, включая менингит, энцефалит и полиомиелит [70, 71]. Этот вирус, впервые обнаруженный в 1937 г., быстро распространялся в западном полушарии с 1999 г. Его гистологические проявления включают периваскулярное воспаление, микроглиальные узелки, некроз и утрату нейронов. Повреждение передних рогов мотонейронов спинного мозга, по-видимому, лежит в основе вялого паралича, наблюдаемого у некоторых пациентов [70, 71].

Тяжелый острый респираторный синдром (SARS), впервые документированная в 2002 г. коронавирусная инфекция, и птичий грипп H1N1, ставший значительной угрозой в конце 1990-х гг., связаны с тяжелой инфекцией нижних дыхательных путей с картиной диффузного поражения альвеол [72–74]. При SARS поражение альвеол и гиалиновых мембран сопровождается разнообразными гистологическими признаками, включая многоядерные гигантские клетки и сосудистые поражения; сообщалось о фазе выздоровления с фиброзом воздушных путей, похожим на бронхолитическую облитерационную пневмонию (BOOP) [72, 74]. Для птичьего гриппа описана более агрессивная, некротическая картина альвеолярного поражения с последующим фиброзом в интерстиции [73, 74].

Парамиксовирусы Nipah [75] и Hendra [75, 76] могут поражать многие системы органов. Преимущественно поражается нервная система, но они могут вызывать также пневмонию у человека и/или животных. Оба вируса имеют тропизм к эндотелию сосудов, где вызывают несколько видов клеточных и тканевых нарушений, включая многоядерность и некроз. Сообщалось о цитоплазматических и ядерных вирусных включениях в клетках, пораженных вирусом Nipah [76]. Вирус Nipah также может заражать эпителиальные клетки легких у свиней, что повышает вероятность передачи инфекции от животных [76].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Сьюзен Ривс и д-ру Саре Миллер за помощь в подготовке микрофотографий и рисунков. Д-ра Карузо и Чайлдс — практикующие терапевты ВМФ США. Высказанные здесь мнения принадлежат исключительно их авторам и не представляют официальную политику военно-морского департамента США, департамента обороны США или правительства США.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Miller SE, Levenson RM, Aldridge C, et al. Identification of focal viral infections by confocal microscopy for subsequent ultrastructural analysis. *Ultrastruct Pathol* 1997; 21:183–193.

2. Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, et al. Pathology of Infectious Diseases. Stamford, CT: Appleton & Lange, 1997.
3. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques, 5th ed. London, U. K.: Churchill Livingstone, 2002.
4. DeMay RM. The Art & Science of Cytopathology. Chicago, IL: ASCP Press, 1996.
5. Keebler CM. Cytopreparatory techniques. In: Bibbo M, ed. Comprehensive Cytopathology. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co., 1997:889-917.
6. Kok LP, Boon M. Microwaves for the Art of Microscopy. Leiden: Coulomb Press, 2003.
7. Gupta PK. Microbiology, inflammation, and viral infections. In: Bibbo M, ed. Comprehensive Cytopathology. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1997:125-160.
8. Netherton C, Moffat K, Brooks E, et al. A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res* 2007; 70:101-182.
9. Nuovo GJ. The surgical and cytopathology of viral infections: Utility of immunohistochemistry, in situ hybridization, and in situ polymerase chain reaction amplification. *Ann Diagn Pathol* 2006; 10(2):117-131.
10. Boccardo E, Villa LL. Viral origins of human cancer. *Curr Med Chem* 2007; 14(24):2526-2539.
11. Butel JS. Viral carcinogenesis: Revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):405-426.
12. Damania B. DNA tumor viruses and human cancer. *Trends Microbiol* 2007; 15(1):38-44.
13. Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: An integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett* 2007; 247(2):182-196.
14. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(3):127-150.
15. Langley JM. Adenoviruses. *Pediatr Rev* 2005; 26(7):244-249.
16. Hakim FA, Tleyjeh IM. Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: A case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(2):153-158.
17. Hogg JC, Hegele RG. Adenovirus and Epstein-Barr virus in lung disease. *Semin Respir Infect* 1995; 10:244-253.
18. Emoyon OE, Lin A, Howell DN, et al. Refractory adenovirus infection after simultaneous kidney-pancreas transplantation: Successful treatment with intravenous ribavirin and pooled human intravenous immunoglobulin. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(11):2436-2438.
19. Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician* 2003; 67(3):519-524.
20. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:375-404.
21. Fowler CB, Reed KD, Brannon RB. Intranuclear inclusions correlate with the ultrastructural detection of herpes-type virions in oral hairy leukoplakia. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(2):114-119.
22. Grogg KL, Miller RF, Dogan A. HIV infection and lymphoma. *J Clin Pathol* 2007; 60(12): 1365-1372.
23. Dwyer DE, Cunningham AL. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Med J Aust* 2002; 177(5):267-273.
24. Weston WL. Herpes-associated erythema multiforme. *J Invest Dermatol* 2005; 124(6):xv - xvi.

25. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(1):217-245.
26. Broccolo F, Drago F, Careddu AM, et al. Additional evidence that pityriasis rosea is associated with reactivation of human herpesvirus-6 and -7. *J Invest Dermatol* 2005; 124(6):1234-1240.
27. Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr., et al. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3):439-464.
28. Du MQ, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 2007; 60(12):1350-1357.
29. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York, NY: Springer, 2002:253-324.
30. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111(1):1-14.
31. Vafaie J, Schwartz RA. Parvovirus B19 infections. *Int J Dermatol* 2004; 43(10):747-749.
32. Florea AV, Ionescu DN, Melhem MF. Parvovirus B19 infection in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(5):799-804.
33. Schildgen O, Muller A, Allander T, et al. Human bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(2):291-304, table of contents.
34. Korálnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name? *Ann Neurol* 2006; 60(2):162-173.
35. Randhawa P, Brennan DC. BK virus infection in transplant recipients: An overview and update. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2000-2005.
36. Osswald SS, Kulick KB, Tomaszewski MM, et al. Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: A case report and review. *J Cutan Pathol* 2007; 34(9):721-725.
37. Smith KJ, Skelton H. *Molluscum contagiosum*: Recent advances in pathogenic mechanisms, and new therapies. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3(8):535-545.
38. Xu X, Erickson LA, Elder DE. Diseases caused by viruses. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL Jr., Murphy GF, eds. *Lever's Histopathology of the Skin*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:651-679.
39. Bayer-Garner IB. Monkeypox virus: Histologic, immunohistochemical and electron-microscopic findings. *J Cutan Pathol* 2005; 32(1):28-34.
40. Love S, Wiley CA. Viral diseases. In: Graham DI, Lantos PL, eds. *Greenfield's Neuropathology*, Vol. 2. London, U. K.: Arnold, 2002:1-105.
41. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, et al. Viral encephalitis: A review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12(5):331-343.
42. Zeichhardt H, Grunert H-P. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackie viruses, echoviruses and enteroviruses 68-71. In: Cohen J, Powderly WG, eds. *Infectious Diseases*, Vol 2. Edinburgh, UK: Mosby, 2004:1993-2005.
43. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3:127-155.
44. Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol* 2007; 60(12):1373-1377.
45. Ohshima K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. *Cancer Sci* 2007; 98(6):772-778.

46. Araujo A, Hall WW. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol* 2004; 56(1):10-19.
47. McArthur JC, Brew BJ, Nath A. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol* 2005; 4(9):543-555.
48. Wyatt CM, Rosenstiel PE, Klotman PE. HIV-associated nephropathy. *Contrib Nephrol* 2008; 159: 151-161.
49. Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 2008; 3:499-522.
50. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2):242-264.
51. Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 2006; 208(2):199-214.
52. Henson D, Siegel S, Strano AJ, et al. Mumps virus sialoadenitis. An autopsy report. *Arch Pathol* 1971; 92:469-474.
53. Nel LH, Markotter W. Lyssaviruses. *Crit Rev Microbiol* 2007; 33(4):301-324.
54. Iwasaki Y, Tobita M. Pathology. In: Jackson AC, Wunner WH, eds. *Rabies*. Amsterdam, The Netherlands: Academic Press, 2002:283-306.
55. Neilson KA, Yunis EJ. Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series. *Pediatr Pathol* 1990; 10:491-502.
56. Dwyer DE, Robertson PW, Field PR. Broadsheet: Clinical and laboratory features of rubella. *Pathology* 2001; 33(3):322-328.
57. Esiri MM, Kennedy PGE. Viral diseases. In: Graham DI, Lantos PL, eds. *Greenfield's Neuropathology, Vol. 2*. London, U. K.: Arnold, 1997:3-63.
58. Rennels MB. Arthropod-borne virus infections of the central nervous system. *Neurol Clin* 1984; 2:241-254.
59. Reyes MG, Gardner JJ, Poland JD, et al. St. Louis encephalitis. Quantitative histologic and immunofluorescent studies. *Arch Neurol* 1981; 38:329-334.
60. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(4):247-262.
61. Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, et al. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40(3):328-333.
62. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:1409-1417.
63. Kamar N, Izopet J, Alric L, et al. Hepatitis C virus-related kidney disease: An overview. *Clin Nephrol* 2008; 69(3):149-160.
64. Lefkowitz JH, Schiff ER, Davis GL, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: A multicenter comparative study with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 104:595-603.
65. Lacy MD, Smego RA. Viral hemorrhagic fevers. In: Aronoff SC, Hughes WT, Kohl S, Wald ER, eds. *Advances in Pediatric Infectious Diseases, Vol. 12*. St. Louis, MO: Mosby, 1997:21-53.
66. Marty AM, Jahrling PB, Geisbert TW. Viral hemorrhagic fevers. *Clin Lab Med* 2006; 26(2):345-386, viii.
67. Leong AS, Wong KT, Leong TY, et al. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol* 2007; 24(4):227-236.
68. Ferluga D, Vizjak A. Hantavirus nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(9):1653-1658.
69. Simmons JH, Riley LK. Hantaviruses: An overview. *Comp Med* 2002; 52(2):97-110.

70. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8):1174–1179.
71. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol* 2007; 6(2):171–181.
72. Gu J, Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Pathol* 2007; 170(4):1136–1147.
73. Korteweg C, Gu J. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *Am J Pathol* 2008; 172(5):1155–1170.
74. Ng WF, To KF, Lam WW, et al. The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5N1 — A review. *Hum Pathol* 2006; 37(4):381–390.
75. Wong KT, Shieh WJ, Zaki SR, et al. Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. *Springer Semin Immunopathol* 2002; 24(2):215–228.
76. Hooper P, Zaki S, Daniels P, et al. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 2001; 3(4):315–322.





# 11 ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

**С.Э. Миллер**

Sara E. Miller, Department of Pathology, Duke University  
Medical Center, Durham, North Carolina, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Электронная микроскопия (ЭМ) — важное подспорье другим диагностическим тестам в вирусологии. В некоторых случаях она может быть единственно возможной процедурой: когда выявляемый вирус не поддается культивированию или недоступны биохимические пробы. Даже если биохимические тесты существуют, их выбор и применение требуют понимания, какой(ие) вирусный(е) возбудитель(и) имеется. Кроме того, перекрестные реакции могут давать ложноположительный результат.

Негативное окрашивание жидких образцов — наиболее широко используемая методика выявления вирусов при помощи ЭМ, поскольку образцы жидкостей организма получить просто, а методика быстрая. Более того, не нужны специфические реактивы, такие как антитела, белковые стандарты или пробы нуклеиновых кислот. Даже при необходимости концентрирования образца вся процедура занимает 1–2 ч. Получение тонких срезов для изучения клеток и тканей — более длительная процедура, но ее также можно рутинно провести за пару дней, а в неотложных случаях за 3–4 ч.

Идентификация вирусов и методология подробно описаны [1–11] и здесь не детализируются. Скорее представлены общие процедуры обработки образцов, наиболее вероятные лабораторные образцы и типы вирусов, чаще всего обнаруживаемые в них. Примечательно, что все микрофотографии тонких срезов напечатаны при увеличении 20 000×, чтобы показать взаимоотношения вирусов и клеток-хозяев. Все врезки и микрофотографии негативного окрашивания приводятся при 100 000×, чтобы показать детали вируса и непосредственно сравнивать их размеры. Опубликована дополнительная информация по идентификации вирусов на основе морфологических групп и аффинности образцов [5, 7, 11].

## МЕТОДЫ

### Негативное окрашивание

*Красители и характеристики окрашивания*

Дисперсный материал, такой как суспензия вирусов, можно контрастировать солями тяжелых металлов [4]. В вирусологической диагно-

стике чаще всего используются водные растворы: 0,5–2% -й уранилацетат, 1–2% -ая фосфорновольфрамовая кислота (ФВК) или 0,5–5% -й молибдат аммония. Уранилацетат дает более мелкую зернистость, чем ФВК, и также действует как фиксатор, сохраняющий структуру вируса. ФВК может активно разрушать некоторые вирусы; просматривать надо незамедлительно — в течение нескольких часов на окрашенных ФВК сетках вирионы могут развалиться — если они предварительно не зафиксированы (1%-м глутаровым альдегидом) и не отмыты перед окрашиванием. ФВК имеет преимущество, она не радиоактивна и в некоторых случаях лучше очерчивает поверхностные выросты оболочечных вирусов. Молибдат аммония дает более мелкозернистый фон и меньший контраст по сравнению с уранилацетатом; иногда он используется с 1%-м углеводом (глюкоза или трегалоза) для поддержания структуры во время высушивания. Он хорош для комковатых частиц, не осаждается солями и не вызывает сморщивания вируса. Все эти красители стоит иметь в наличии.

Негативное окрашивание основано на обтекании красителя вокруг образцов и трещин на их поверхности. Если краска свяжется непосредственно с компонентом образца (позитивное окрашивание), что иногда происходит из-за электростатических взаимодействий, результат может быть сомнительным. Можно довести pH ФВК до 7 (это наивысшая изоэлектрическая точка для большинства белков, когда и краска, и белки отрицательно заряжены) — положительное окрашивание при этом сводится к минимуму. Уранилацетат (катион) осаждается при pH 7 и обычно используется при ~4,5–5,0, когда он и большинство белков положительно заряжены, а электростатические взаимодействия между краской и белком незначительны. Однако уранилацетат имеет высокую аффинность к фосфатным и карбоксильным группам в ДНК, липидам и некоторым белкам, что может приводить к позитивному окрашиванию. Позитивно окрашенные вирионы кажутся более темными и мелкими по сравнению с негативно окрашенными, и это плохо, поскольку во многих случаях вирусы идентифицируют по их размеру. Следует измерять только негативно окрашенные вирионы. Иногда уранилацетат дает как позитивное, так и негативное окрашивание на одной сетке.

Вид сетки зависит от характера распределения образца и красителя, а это в свою очередь зависит от гидрофильности образца и пленки-подложки. Обычно хороши сетки со свежим углеродным покрытием, а более старые надо подвергать обработке в вакуумном испарителе (30–60 с), чтобы зарядить и добиться ровного распределения. Или же можно провести 5-минутную обработку 1%-м ализановым синим, 0,01–0,25%-м поли-L-лизинном или 0,05%-м бацитрацином с последующей промывкой водой — это облегчит распределение образца. Краска должна быть однородной и мелкозернистой. Если она скапливается в одном месте и не прокрашивает другие или же у нее гладкий, стеклянистый или аморфный вид, перед нанесением образца на сетку ее стоит обработать.

### *Пленки-подложки*

Суспензионный материал следует помещать на тонкую пластичную пленку (формвар или коллодий), нанесенную в вакуумном испарителе с тонким слоем углерода для проводимости и стабилизации в луче (детально описано у Хайят и Миллер [4]). Сетки с пленками-подложками можно приобрести у поставщика ЭМ, но неизвестно, когда они изготовлены и гидрофильны ли они.

### *Концентрирование вируса*

Концентрация вирусов должна составлять  $10^5$ — $10^6$  частиц/мл, чтобы их можно было выявить. Вирусы гастроэнтерита выделяются в количествах, достаточных для выявления без концентрирования; вирусы в образцах таких жидкостей, как моча, спинномозговая жидкость (СМЖ), в смывах и аспиратах надо концентрировать. Вирусы осаждают ультрацентрифугированием ( $\sim 50\,000\text{ g}$  в течение 45 мин) или обработкой на Airfuge (давление 30 г/кв. дюйм, 30 мин; Бекман, Пало Альто, Калифорния). Последнюю можно оснастить ротором EM-90, предназначенным для осаждения вирусов непосредственно на подложку сетки [12]. Перед ультрацентрифугированием необходимо удалить клеточный детрит путем осветления на малой скорости (1000 g). Для центрифугирования на EM-90 нужна большая скорость осветления (например, при 10 000 g в течение 1–5 мин); однако при этом вирусы в кластерах могут осесть, их концентрация на сетке уменьшится — найти их будет трудно. Концентрировать вирусы можно также при помощи процедур диффузии в агаре [13] и псевдореплики [14].

### *Иммуноагрегация*

Если доступна нужная антисыворотка, можно использовать иммуноагрегацию как для концентрирования вирусов в разведенных суспензиях, так и для дифференциации морфологически схожих вирусов. Их можно агрегировать и осадить при небольших g [15] или прикрепить к сетке путем обработки антисывороткой по методикам «сыворотка в агаре» или твердофазной иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ) [1].

Чтобы использовать антитела (или другие биохимические зонды), нужно знать тип вируса или по крайней мере сузить диапазон возможных вариантов. Эти процедуры применяли для документального подтверждения вирусных инфекций сывороткой выздоровевших, отслеживания эпидемий, серотипов вирусов известной антисывороткой и тестирования антисыворотки на реактивность в отношении известных вирусов. Если образец может содержать неизвестный вирус, стоит попытаться сконцентрировать его с помощью пула гамма-глобулинов в конечной концентрации порядка 1:100. Конечно, для успеха обязательно наличие в сыворотке специфических антител против этого вируса.

### *Хранение образцов*

Если просмотр проводится не сразу, образцы можно запечатать во избежание высыхания и хранить при 4 °С. Длительное хранение возможно при -70 °С или в жидком азоте; повторное замораживание—оттаивание, как в саморазмораживающемся морозильнике, не рекомендуется (Конференция центров по контролю и профилактике заболеваний, 1989).

### *Морфология вируса при негативном окрашивании*

Существует две главные морфологические категории вирусов: «голые» и оболочные. «Голые» человеческие вирусы все имеют вид икосаэдра (грубосферические при негативном окрашивании) и по размеру делятся на три категории (65–90 нм, 40–55 нм и 22–35 нм) (рис. 11.1, А–В). Выпадающие из этих диапазонов сферические частицы не являются человеческими патогенами. Таким образом, очевидна важность правильного увеличения микроскопа.

Другая крупная морфологическая группа — оболочные вирусы (рис. 11.1, Г–Е): их нуклеокапсид окружен липопротеиновой мембраной (она образуется, когда вирус прорывается сквозь клеточную мембрану хозяина, исключение — поксивирусы). Нуклеокапсиды оболочных вирусов могут быть сферическими (рис. 11.1, Г, ср. с А), спиралевидными, как «Slinky» (рис. 11.1, Д), или морфологически не выраженными (рис. 11.1, Е); некоторые из оболочных вирусов с икосаэдрическими нуклеокапсидами при негативном окрашивании могут быть морфологически нераспознаваемыми (например, тогавирусы).

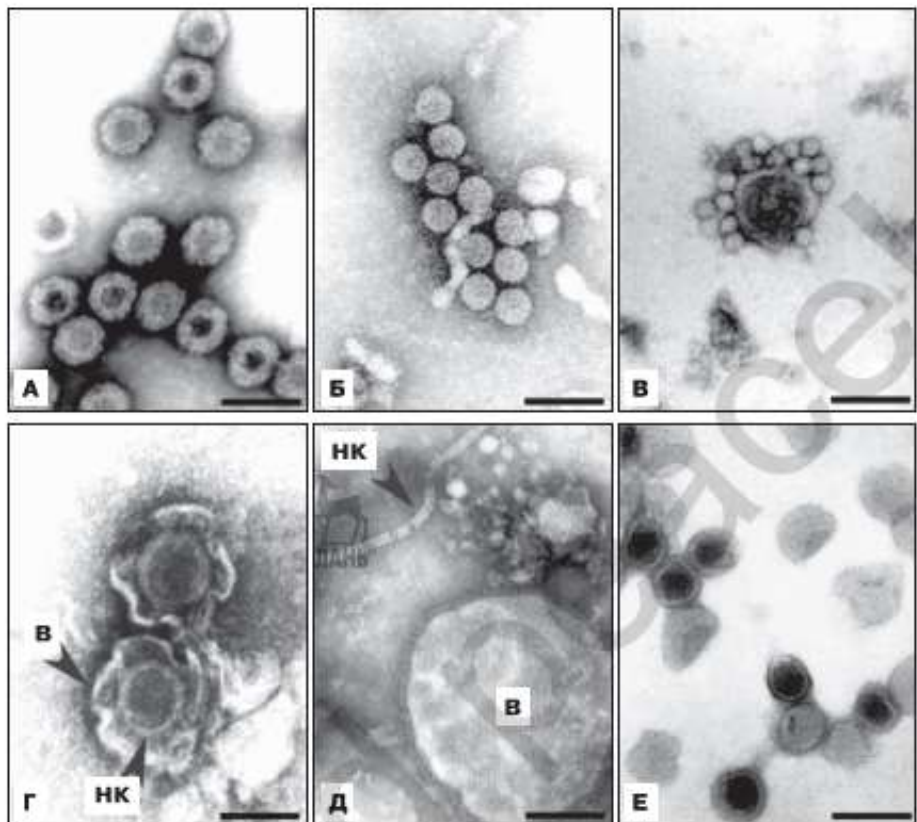


### **Изготовление тонких срезов**

#### *Методика*

Клетки и твердые ткани изучают в электронном микроскопе на тонких срезах. Негативное окрашивание водных экстрактов гомогената инфицированной ткани дает низкий выход, и такая диагностика ненадежна.

Образцы, подозреваемые на наличие вирусов, достаточно подвергнуть рутинной процедуре фиксации глутаральдегидом, осмием и часто уранилацетатом [7]. Сохранность ультраструктуры в материале, хранимом в формалине, обычно приемлемая — его надо перенести в глутаральдегид и следовать стандартной методике. Некоторые вирусы, такие как крупные икосаэдрические, переносят извлечение из парафиновых блоков или восковых срезов на стеклах. В этих образцах ультраструктура ткани сохраняется плохо: более мелкие вирусы (например, пикорнавирусы) и многие оболочные вирусы с нечетким нуклеокапсидом (например, флавивирусы) невозможно отличить от глыбчатых и деградировавших клеточных структур.



**Рис. 11.1.** Негативное окрашивание «голых» вирусов (А–В) и оболочных вирусов (Г–Е). **А** — реовирус, крупная (70–75 нм) икосаэдрическая частица. **Б** — вирус полиомы, икосаэдрическая частица среднего размера (40 нм). **В** — мелкий округлый вирус (25–30 нм) из стула, вероятно, пикорнавирус. **Г** — герпесвирус с икосаэдрическим нуклеокапсидом (нк) внутри полного оболочного вириона (в); выросты на поверхности настолько короткие, что практически незаметны. **Д** — вирус кори со спиральным нуклеокапсидом (нк) и оболочный вирион (в) с поверхностными выростами длиной 8–9 нм. **Е** — вирус краснухи — оболочный вирус с нераспознаваемым нуклеокапсидом и незаметными поверхностными отростками. *Источник:* микрофотография **Е** от д-ра Роберта Симмонса, Университет штата Джорджия, Атланта. Штрихи 100 нм

Для рутинной фиксации обычно используются эпоксидные смолы, чаще всего это заменитель эпона и Spurr, которые можно приобрести у любого поставщика ЭМ. Описаны быстрые методы [16–18], когда используются очень тонкие сколы тканей, время обработки меньше, а доза катализатора больше (например, двойная), время затвердения при более высоких температурах меньше (например, 25 мин при 95 °С). Альтернативный вариант — обработка микроволнами [19]. Срезы докрашиваются уранилацетатом и свинцом

[20]. Широко используемые в световой микроскопии для выявления и идентификации вирусов методики иммуноокрашивания и гибридизации *in situ* с некоторым успехом были использованы и в ЭМ. Однако они связаны с большими временными затратами, ограничениями в плане доступности реактивов, поэтому их полезность для диагностики не доказана.

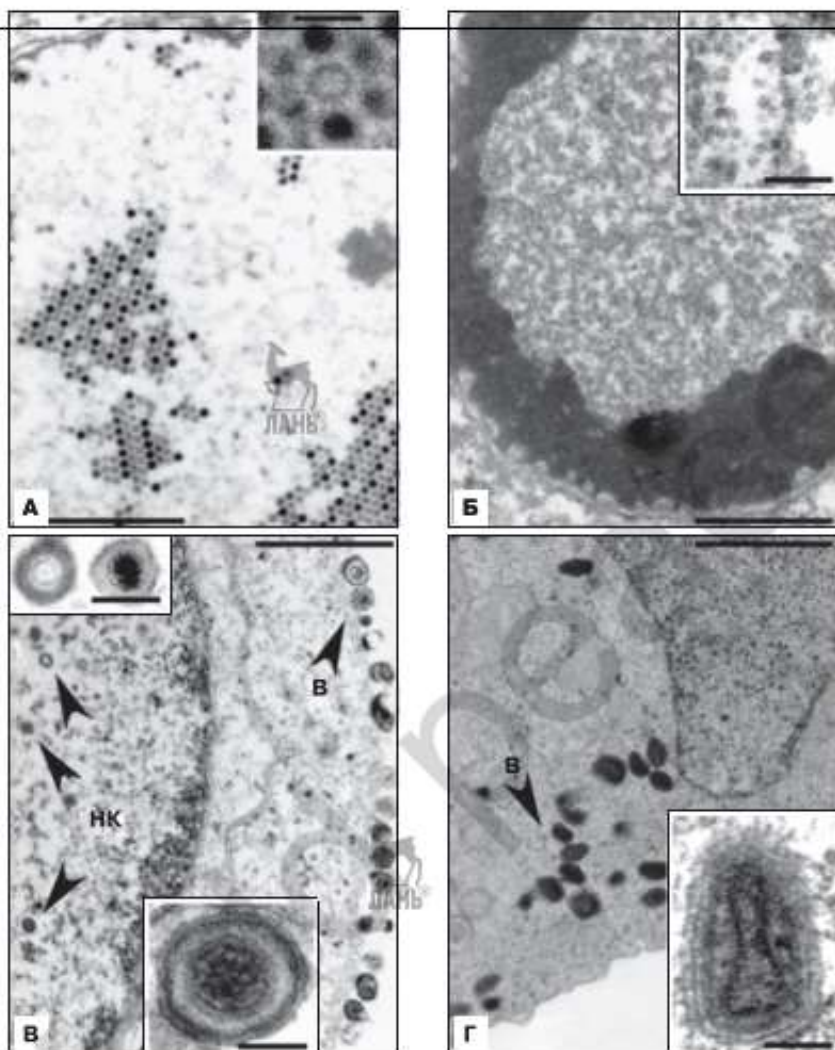
Разработано несколько методик, позволяющих обходить связанные с тонкими срезами ограничения [8]. При помощи светового микроскопа выбираются подходящие области повреждений для дальнейшей обработки и изучения с применением ЭМ. В одной из таких методик используется лазерная конфокальная микроскопия для просмотра срезов влажной ткани, сделанных вибрирующим микротомом. Можно выявить области с необычной архитектурой (воспаление, некроз, геморрагия, увеличенные клетки, многоядерные клетки или увеличенные ядра) и вырезать их для заливки и изготовления ультратонких срезов [8].

### Морфология вирусов на тонких срезах

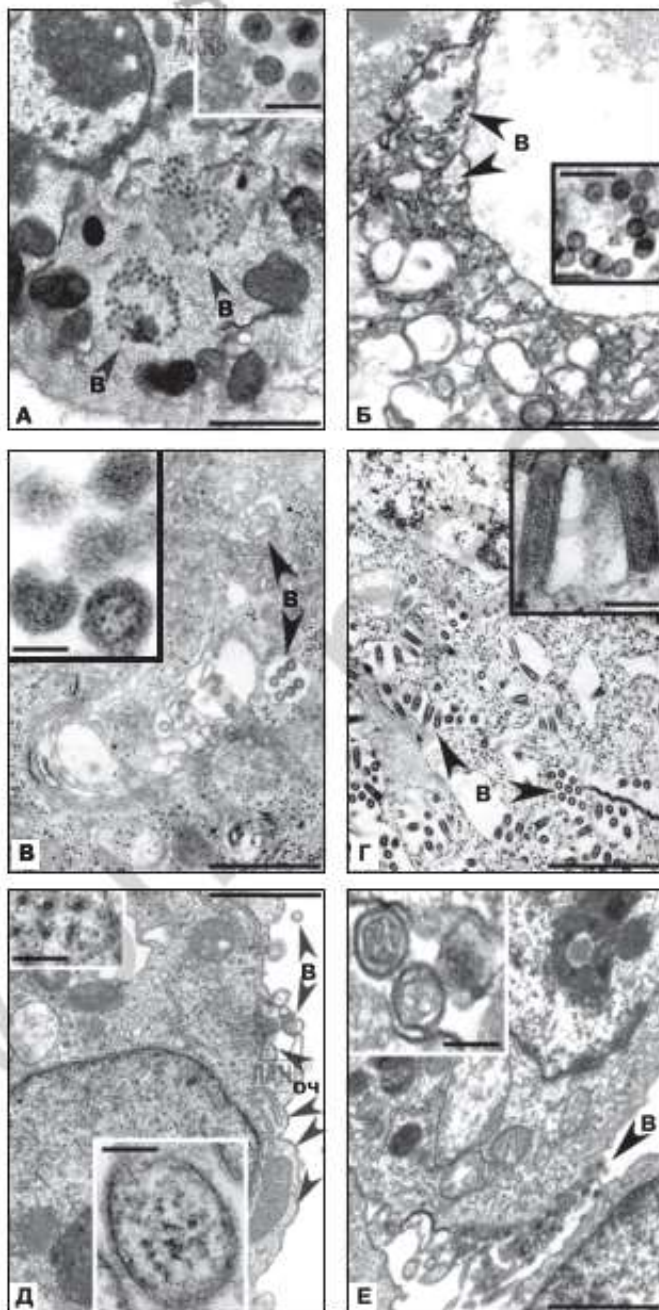
Локализация вируса в клетках — ключ к их идентификации. Большинство ДНК-вирусов проходит сборку в ядре (рис. 11.2, А и С); исключение — поксивирусы (рис. 11.2, Г). На рис. 11.2, А и Б показаны «голые» ДНК-вирусы: на рис. А — самый крупный, Б — самый мелкий. «Голые» вирусы выходят из клеток, лизируя их на поздних стадиях инфекционного процесса; ДНК-вирусы можно увидеть по всей клетке после того, как ядерная мембрана разрушена. Нуклеокапсиды оболочных ДНК-вирусов (герпесвирусы) выявляются преимущественно в ядре, хотя некоторые могут выходить через ядерные поры в цитоплазму. Полных (оболочных) вирионов не видно в ядре — они выявляются в цитоплазме или во внеклеточном пространстве (рис. 11.2, В). Поксивирус, являющийся ДНК-вирусом, — исключение; он развивается в цитоплазме (рис. 11.2, Г). Его оболочка скорее синтезируется *de novo*, хотя иногда вирион может получать дополнительный слой клеточного происхождения.

Большинство РНК-вирусов проходят сборку в цитоплазме (рис. 11.3, А–Г). Исключение — нуклеокапсид вируса кори (но не полные оболочные частицы) иногда может выявляться в ядре. Некоторые процессы репликации ортомиксовирусов проходят в ядре — это можно показать иммуногистохимическим методом, однако инфекционный процесс происходит в цитоплазме. На рис. 11.3, А и Б показаны «голые» РНК-вирусы в цитоплазме зараженных клеток. Оболочные РНК-вирусы могут получать свою наружную оболочку либо сливаясь с внутренними везикулами (рис. 11.3, В), либо выходя наружу сквозь клеточную мембрану (рис. 11.3, Г–Е).

Для идентификации оболочных вирусов важные характеристики — форма и размер нуклеокапсида. Как и икосаэдрические «голые» вирусы (рис. 11.2, А и Б), икосаэдрические нуклеокапсиды обо-



**Рис. 11.2.** ДНК-вирусы на тонких срезах зараженных клеток. **А** — аденовирус, крупный (70–90 нм) «голый» икосаэдрический вирус; примечательны паракристаллические линии частиц в ядре. На врезке — частицы при большом увеличении (срезы разных планов). **Б** — парвовирус, очень мелкий «голый» вирус, невидимый при малом увеличении; центр ядра заполнен вирусным материалом, выталкивающим хроматин к границе (вид кольца). На врезке при большом увеличении показаны бледные 22-нм сферы, едва различимые среди глыбчатого ядерного материала. **В** — герпесвирус с ~100-нм икосаэдрическим нуклеокапсидом (нк) и оболочными вирионами (в) на поверхности клетки. Полный вирус обнаруживается в цитоплазме (не показано). Нуклеокапсиды (верхняя врезка) и полный оболочный вирион (нижняя врезка) показаны при большом увеличении. **Г** — вирус коровьей оспы (в), оболочный ДНК-вирус (~200×200×250 нм) со сложным нуклеокапсидом. Оболочка собирается *de novo* в цитоплазме, хотя иногда вирионы получают дополнительный мембранный слой клеточного происхождения. Зрелая сердцевина имеет вид гантели (см. врезку). Штрихи при малом увеличении (20 000×) соответствуют 1 мкм; при большом (100 000×) на врезках — 100 нм



**Рис. 11.3.** РНК-вирусы на тонких срезах зараженных клеток. А и Б — «голые» вирусы; В—Е — оболочные вирусы. Оч — отпочковывающиеся частицы



лочных вирусов на срезе сферические. Спиральные нуклеокапсиды кажутся «червями» (рис. 11.3, Д, верхняя врезка). Некоторые РНК-нуклеокапсиды выглядят просто как электронно-плотный материал, не имеющий характерной формы (рис. 11.3, Е). Ключом к идентификации вирусов может быть тип клеточных мембран, с которыми они ассоциированы: ядерная (герпесвирус), вакуолярная (рис. 11.3, В) или цитоплазматическая (рис. 11.3, Д и Е). Мембраны, имеющие вирусные белки-выросты, могут казаться пушистыми или более плотными по сравнению с клеточными мембранами, не содержащими вирусные белки (см. отпочковывающиеся частицы на рис. 11.3, Д).

## КЛИНИЧЕСКИЕ ОБРАЗЦЫ

### Стул

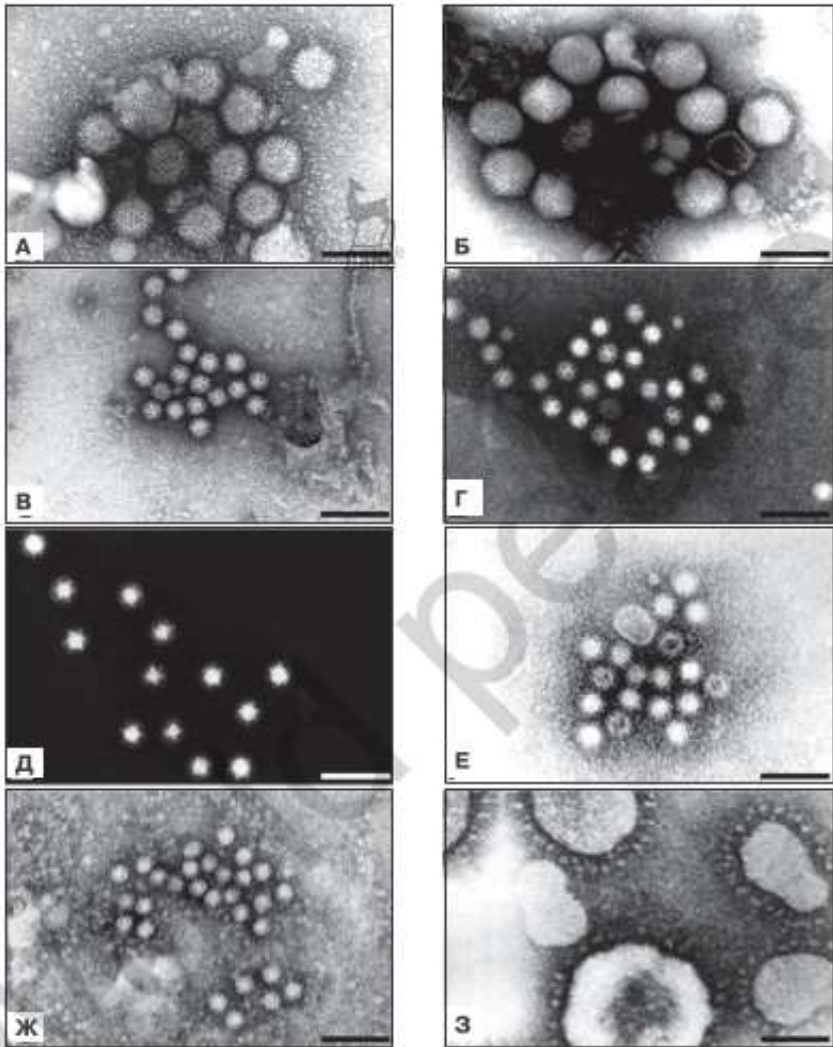
С наибольшим успехом ЭМ применяется для выявления вирусов в образцах стула пациентов с гастроэнтеритом. Все эти вирусы либо сложно культивируются, либо вообще не культивируются рутинно в лаборатории, хотя для некоторых возбудителей описаны специальные методики культивирования. Более того, не всегда доступны специфические биохимические реактивы, а если используется неправильный зонд, результат будет негативным. В стуле вирусов очень много, что затрудняет их выявление методом ЭМ. При некоторых заболеваниях вирусы выделяются в течение короткого времени с момента появления симптомов, поэтому рекомендуется получить образцы быстро. Иногда вероятность выявления вирусов можно повысить, получая образцы несколько раз после появления клинических синдромов.

Для исследования готовят 10–20% суспензию стула на воде или динамичном буфере, таком как ацетат аммония, затем твердый материал осаждают при низкой скорости (1000–2000 *g*). Надосадочную жидкость помещают на сетку и проводят негативное окрашивание, как описано выше. Если ничего не обнаружено, образец подвергают ультрацентрифугированию. Опубликованы дополнительные ЭМ и ИЭМ методы выявления вирусов [15, 21, 22]. На рис. 11.4 показаны вирусы, обнаруженные в образцах стула.

### Ротавирус

Ротавирус (рис. 11.4, А), крупный «голый» икосаэдрический вирус диаметра 65–70 нм, характеризуется трубчатыми капсомерами, уложенными напоподобие колесных спиц (отсюда название «рота-»). Интактный вирион имеет двойную оболочку, иногда присутствуют частицы и с одинарной, и с двойной оболочкой. Иногда видны пластины капсидного материала, похожие на мелкую проволочную сетку.

Ротавирусная инфекция в США носит сезонный характер, обычно появляясь на западе поздней осенью и на востоке зимой. Ее редко диагностируют летом, за исключением пациентов с нарушением им-



**Рис. 11.4.** Вирусы, видимые в стуле при негативном окрашивании. **А** — ротавирус. **Б** — аденовирус. **В** — вирус Норфолк, кальцивирус, кажущийся шершавым, без капсомерной организации. (Препарат вируса предоставлен д-ром Кристин Мо, Университет Эмори.) **Г** — кальцивирус, капсомеры которого образуют чашеобразные впячивания на поверхности. **Д** — астровирус. **Е** — миниреовирус. (Микрофотографии Г, Д и Е любезно предоставлены Марией Шумански, Детская больница, Торонто, США.) **Ж** — энтеровирус, мелкий (27–30 нм) «голый» икосаэдрический вирус без характерной капсомерной организации. **З** — коронавирусы, единственный оболочечный вирус, связанный иногда с гастроэнтеритом. (Микрофотография д-ра Е. О. Кол, Лаборатория здравоохранения Бристоля, Великобритания.) Штрихи 100 нм

мунитета. Ее можно выявить уже за 1–3 сут. до появления диареи и до 9 сут. с момента ее появления. У новорожденных и взрослых выявлено бессимптомное течение, а количество зараженных детей с симптомами увеличивается с возрастом (1–24 мес.) [23].

Выделяют семь серогрупп ротавируса (от А до G) [24]; группы с А по С выявляются у людей, возбудители всех групп встречаются у животных. Самая распространенная группа А обычно наблюдается у детей до 1–2-летнего возраста и у пожилых [25]. У взрослых с нарушенным иммунитетом она обычно вызывает болезнь, длящуюся 2–8 сут. Группа В, выявляемая преимущественно в Китае, более вирулентна; заражаются взрослые и дети, болезнь протекает с сильным обезвоживанием [26]. В развивающихся странах гастроэнтерит — главная причина детской смертности, а ротавирус возглавляет список вирусных инфекций, вызывая свыше 500 000 смертей в год [27].

### Аденовирус

Аденовирус (рис. 11.4, Б) — крупный (70–90 нм) «голый» икосаэдрический вирус, капсомеры которого уложены в виде плоских треугольных фасеток на поверхности. Иногда он может иметь гексагональную форму — в зависимости от того, под каким углом смотреть на сетку. Аденовирус и ротавирус только два безоболочных вируса в этом диапазоне размеров, и они легко различаются по морфологии (ср. рис. 11.4, А и Б).

У аденовируса много штаммов; серотипы 40 и 41 (группа F) считаются первопричиной гастроэнтерита, хотя доля связанных с аденовирусом случаев крайне мала (1–10%) [28–30]. Другие штаммы можно обнаружить в стуле, иногда они проглатываются при респираторных инфекциях. Некоторые из этих штаммов могут размножаться в кишечнике и вызывать диарею. Специалисту ЭМ рекомендуется сообщить о вирусной нагрузке. Если имеется много вирионов на фоне диареи, скорее всего они взаимосвязаны. Только ИЭМ (или другие иммунологические тесты) могут специфически дифференцировать серотипы, поскольку морфологически они идентичны.

### Вирус Норфолк и другие калицивирусы

Семейство *Caliciviridae* имеет два рода, патогенных для человека [24]. К норовирусам (рис. 11.4, В) относится вирус Норфолк (названный в честь города в штате Коннектикут, где он впервые был выявлен) и другие (пустыни Шилд, Гавайи, Лордсдейл, Мексико, Снежных гор и Саутгемптон). Миниреовирус, похожий на мелкий реовирус, на 52% гомологичен вирусу Норфолк [28]. Род *Sapovirus* содержит вирус Саппоро (описанный в Японии) и другие штаммы, изолированные в США (Хьюстон 86 и 90, Парквилль) и в Великобритании (Лондон, Манчестер).

Норовирусная инфекция получила название зимней рвотной болезни. Примерно у 70% пациентов бывают рвота, спазмы, диарея

или лихорадка, но не все симптомы одновременно у одного пациента; также инфекция может быть субклинической. Этот вирус часто наблюдается при эпидемиях (типичные — в кампусах колледжей и на борту круизных лайнеров). Болезнь длится 3–5 сут. с наиболее выраженными клиническими проявлениями в начале заболевания, и через 3 сут. вирус может не обнаруживаться при ЭМ. Иногда эту инфекцию называют острым инфекционным небактериальным гастроэнтеритом.

Вирус Норфолк — мелкий (25–27 нм) круглый структурированный вирус (SRSV). Его морфология при негативном окрашивании обычно не соответствует характерной чашеобразной укладке капсомеров некоторых видов этого семейства. У других калицивирусов (30–35 нм) может быть более выраженный чашеобразный вид капсомеров (4-, 6- или 10-конечная звезда) на поверхности (рис. 11.4, Г), иногда они похожи на астровирусы. В образце эти особенности могут не проявляться; многие вирионы могут выглядеть просто как мелкие круглые вирусы (SRV) или SRSV (см. выше).

### *Астровирус*

Астровирусы (рис. 11.4, Д) — мелкие (27–32 нм) «голые» икосаэдрические частицы, иногда на их поверхности заметны 5- или 6-конечные звезды. Так выглядят не все частицы, звезду можно увидеть только на микрофотографии (но не на экране микроскопа), особенно при ее перепроявке (темная). Поэтому отличить их от других SRV или SRSV бывает невозможно. Астровирусы выделяют в семейство *Astroviridae* [24], на электронных микрофотографиях их можно спутать с калицивирусами, однако у них нет отчетливых чашеобразных зубцов (ср. рис. 11.4, Г и Д). Вирус Марин Каунти, сейчас считающийся астровирусом 5-го типа, раньше относили к калицивирусам.

Астровирусы выявлялись и у детей, и у взрослых с гастроэнтеритом. Болезнь протекает мягче, чем при ротавирусной инфекции. Разнообразные симптомы могут длиться 2–4 дня [32].

### *Мелкие круглые вирусы и мелкие круглые структурированные вирусы*

Часто мелкие вирусы энтерита не имеют отличительных признаков и выглядят просто шершавыми или гладкими. Saul и Appleton [33, 34] предложили схему классификации этих возбудителей. Вирусы с шершавой поверхностью, SRSV, имеют размер от 27 до 40 нм и включают астровирусы, калицивирусы, вирусы Норфолк, Гавайи, Таунтон и Снежных гор, а также возбудителей размером 35–40 нм, таких как миниреовирусы (рис. 11.4, Е), вирусы Саппоро и Отофуке.

Их относят к 22–26-нм SRV-частицам без отличительных признаков (рис. 11.4, Ж); к ним принадлежат вирусы Cockle, W-Ditchling и Parametta. Некоторые исследователи не считают SRV патогенами, некоторые из них трудно отличить от непатогенного парвовируса

(см. ниже). Как можно видеть на микрофотографиях кальцивируса и астровируса, из-за изменчивости паттерна окрашивания шероховатость видна не всегда. Поверхность вируса может быть покрыта антителами, что изменяет ее характер. Некоторые фекальные SRV могут быть энтеровирусами или вирусами Коксаки (семейство пикорнавирусов), а энтеровирусные инфекции других систем органов часто дают вирусы в стуле. При ЭМ-диагностике присутствие множества мелких вирусов на фоне диареи следует отмечать как + (кальцивирус или астровирус, если это очевидно; SRSV или SRV). Не доказана патогенность очень мелких (18–22 нм) парвовирусов, присутствующих в стуле наряду с аденовирусом (аденовирус-ассоциированный вирус, AAV). Аденовирус другой локализации (кровь, амниотическая или суставная жидкость) является патогенным.

Проблема идентификации кишечных вирусов в том, что некоторые бесхвостые бактериофаги могут походить на SRV. В этом случае надо проверить, насколько плотно мелкие круглые частицы связаны с бактериальным детритом (фрагменты стенки, жгутики или пилы). Другой недостаток — липидные, белковые и липопротеидные молекулы могут образовывать мелкие капельки, похожие на SRV/SRSV (см. ниже — Спинномозговая жидкость). Ключом к идентификации вирусов может стать большое количество частиц, кластеры вирусов, а также однородность формы и размеров частиц.

### *Энтеровирусы и другие пикорнавирусы*

Энтеро-, полио-, эховирусы, вирусы Коксаки и гепатита А относятся к семейству Picornaviridae [24]; все они выводятся со стулом [35]. Морфологически они выглядят, как SRV (рис. 11.4, Ж), их нельзя различить методом ЭМ без специфической антисыворотки. Передаются фекально-оральным путем; некоторые из них могут обладать аффинностью к другим органам.

Полиовирус обитает в мотонейронах центральной нервной системы, вызывая паралич; вирусы Коксаки выявляются при заболеваниях сердца и диабете; эховирусы вызывают респираторное заболевание. Эти «голые» икосаэдрические вирусы особенно невосприимчивы к таким методам дезинфекции, как УФ-облучение и хлорирование.

### *Вирусы гепатита*

Вирус гепатита А (HAV), или энтеровирус 72, начинает выделяться в стуле в ранней фазе заболевания (~неделя после заражения), продолжая в течение 2 нед. — 1 мес. до появления желтухи. HAV — пикорнавирус [24], при негативном окрашивании выглядит, как SRV [36]. Вирус гепатита Е (HEV) — кальцивирус, при негативном окрашивании выглядит, как SRSV [37]. У человека описаны его четыре штамма: HEV1 (Бирма), HEV-2 (Мексика), HEV-3 (Менг) и HEV-4. Инкубационный период обычно длиннее, чем у HAV, а период выделения в стуле составляет 4–5 нед., начиная со второй. Для ЭМ-

идентификации необходима реакция с антисывороткой (см. иммуноагрегацию); инфекция обычно диагностируется серологически. Передаваемый при переливании крови (ПП-вирус, TTV) — крошечный (17–20 нм) вирус семейства *Circoviridae* [24], был обнаружен в стуле, слюне и крови [38]. При ЭМ он выглядит просто как очень маленький SRV без отличительных признаков.

### *Коронавирус и коронавирусоподобные частицы (KHPV, CVLP)*

Коронавирусы (рис. 11.4, 3) подразделяются на три группы, две из которых патогенны для человека [24]. Их размер 75–160 нм, оболочка имеет 20-нм булавовидные выросты, называемые пепломерами. Роль коронавирусов при гастроэнтерите спорная, поскольку их находили и у бессимптомных пациентов, и у больных с диареей. Однако вирус SARS (тяжелый острый респираторный синдром), относящийся ко 2-й группе, вызывает диарею у некоторых пациентов. Следует отметить, что ЭМ сыграла огромную роль в классификации этого возбудителя как коронавируса [39, 40]. Кроме того, другие коронавирусы вызывают респираторные симптомы, иногда сопровождающиеся болью в животе и диареей. Абдоминальные симптомы чаще отмечаются у детей. Коронавирусы ассоциировались с неонатальным некротизирующим энтероколитом.

Торовирусы (*Torovirus* — род семейства коронавирусов) генетически идентичны коронавирусам [41], но отличаются по морфологии: при негативном окрашивании похожи на тор (в форме пончика), почку или палочку. Их диаметр 120–140 нм, есть булавовидные пепломеры, но они не столь отчетливые, как у других коронавирусов. Трубочатый нуклеокапсид размером 35–170 нм может иметь вид булавы или быть искривленным внутрь, образуя открытый тор [24]. Сначала их обнаружили у домашнего скота и кошек, но сообщалось, что они есть и у людей [42]. Вирус Breda, впервые описанный в Айове (США), вызывает гастроэнтерит и респираторное заболевание у крупного рогатого скота и свиней, у человека обнаружены антитела. Вирус Берн — аналогичный возбудитель у лошадей в Швейцарии. Похожие частицы описаны в стуле людей из Бирмингема (Англия) и Бордо (Франция). Мы идентифицировали методом ЭМ похожий вирус у новорожденного с диареей (неопубликованные наблюдения).

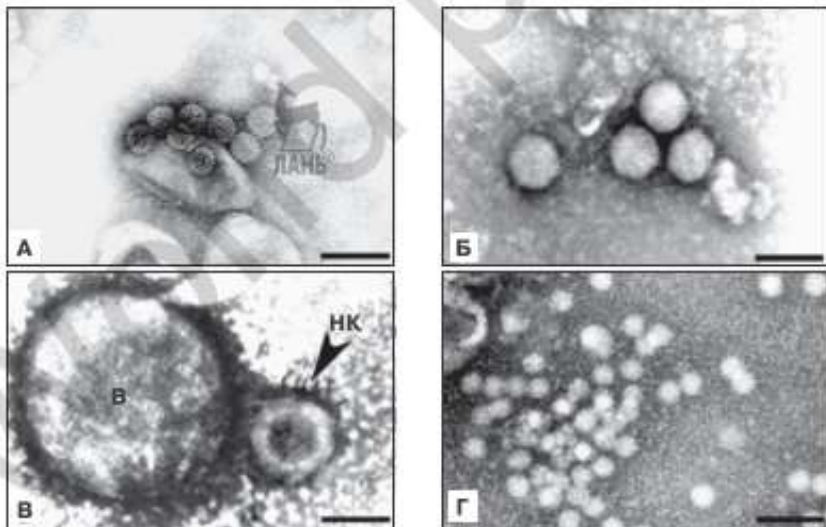
### *Другие вирусы в стуле*

Сообщалось о двух дополнительных вирусах в стуле пациентов с гастроэнтеритом. Один из них — икосаэдрический вирус размером 35–37 нм с двуцепочной РНК, напоминающий мелкий бирнавирус [43, 44]. В другом отчете сообщалось об антигенах пестивируса, выявленных в стуле детей с гастроэнтеритом [45]. В последнем случае ЭМ была неподходящим методом поиска этих флавириусов из-за отсутствия отчетливой морфологии.

## Моча

Вирусы, чаще всего встречающиеся в моче, представлены на рис. 11.5. Дифференциальная диагностика вирусов в моче обычно проводится между ВК-вирусом полиомы (рис. 11.5, А), который плохо растет в культуре, и аденовирусом (рис. 11.5, Б). Их можно легко различить по размеру вирионов. Дифференциальная диагностика очень важна, поскольку терапия этих двух вирусов разная: аденовирусную инфекцию у реципиентов костного мозга можно контролировать с помощью рибавирина до трансплантации костного мозга [46], а вирус полиомы у реципиентов почки можно контролировать, модифицируя иммунодепрессанты, возможна терапия цидофовиром [47]. Полиомавирусы могут провоцировать выраженную гематурию, но их также выявляли в моче бессимптомных беременных и пациентов с нарушениями иммунитета без явного заболевания мочевых путей. Эти вирусы — важная причина отторжения трансплантата почки; при раннем выявлении и модификации иммуносупрессии его вероятность можно уменьшить [47].

ЭМ — метод выбора для обнаружения вирусов в образцах мочи, быстрый и неинвазивный, обладающий существенной чувствительностью. Хотя по чувствительности ЭМ уступает полимеразной цепной



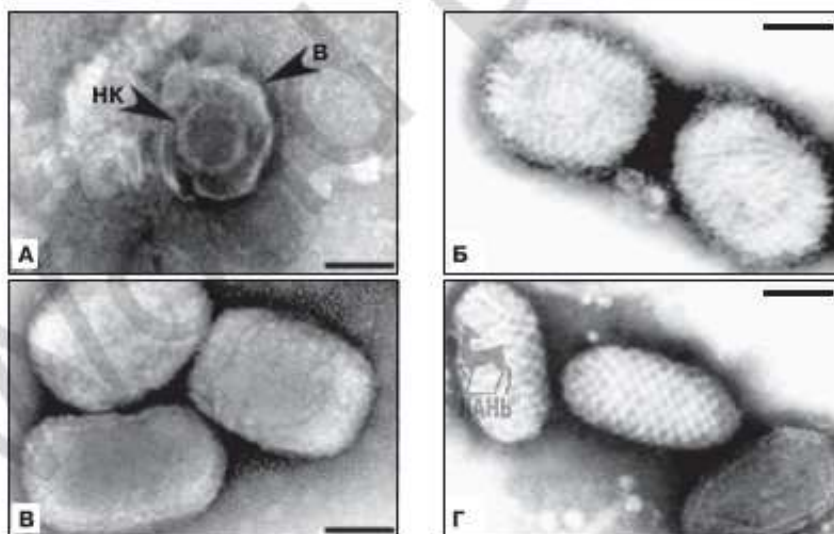
**Рис. 11.5.** Вирусы, наблюдаемые в моче при негативном окрашивании. **А** — вирус полиомы, «голая» икосаздрическая частица среднего размера (~40 нм) со «вздутиями» на поверхности. **Б** — аденовирус, крупный (70–90 нм) «голый» икосаздрический вирус с треугольными фасетками. **В** — цитомегаловирус, крупный (120–200 нм) оболочный вирус (в) с 90–100-нм сферическим нуклеокапсидом (нк). **Г** — энтеровирус, мелкий (25–30 нм) круглый вирус из семейства пикорнавирусов с неидентифицируемыми чертами поверхности. Штрихи 100 нм

реакции (ПЦР), выявляемое количество вирусов в моче свидетельствует о повышении титров. Анализ мочи методом ПЦР может оказаться проблематичным, поскольку 80% взрослых контактировали с вирусом: результат может быть положительным, когда реальное количество вируса незначительно для болезни. ПЦР лучше использовать для определения вирусов в крови (виремия).

В моче также могут содержаться CMV (рис. 11.5, В), вирус герпеса и изредка вирус краснухи, особенно при врожденных инфекциях. Вирус краснухи трудно обнаружить в клинических образцах при негативном окрашивании из-за отсутствия отчетливой морфологии поверхности. При эпидемическом паротите и кори (см. рис. 11.1, Д) возбудители, относящиеся к пармиксовирусам, могут обнаруживаться в моче (вирурия). Энтеновирусы и коксакивирусы (SRV, см. рис. 11.5, Г) могут вызывать гемолитико-уремический синдром (ГУС); возбудители выглядят, как SRV, их дифференцируют с помощью специфической антисыворотки.

### Жидкость волдырей

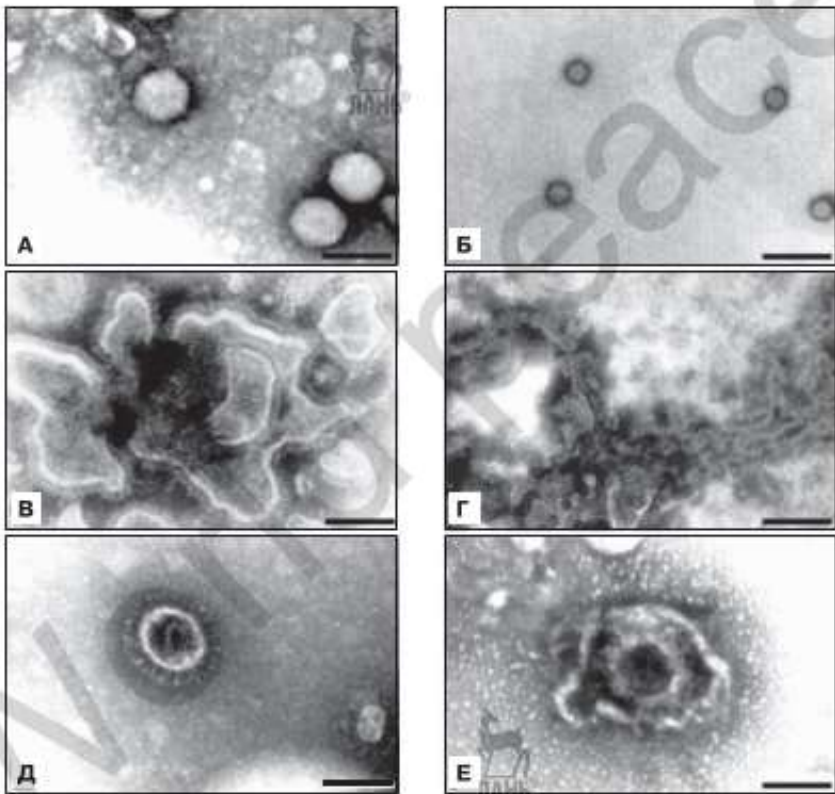
Вирусные поражения кожи можно легко и быстро изучить методом ЭМ. Приготовленные из кожных поражений водные суспензии или пузырьную жидкость можно негативно окрасить [48]. Биопсии можно изучать на тонких срезах (см. ниже — Ткани). В большинстве



**Рис. 11.6.** Вирусы, выявляемые при кожных поражениях, при негативном окрашивании. **А** — вирус простого герпеса, 120–200-нм оболочный вирус (в) со сферическим 990–100-нм нуклеокапсидом (нк). **Б–Г** — вирусы оспы. **Б** — контагиозный моллюск (~220×250×200 нм). **В** — вирус коровьей оспы (~220×200×250 нм). (Культура предоставлена д-ром Дэвидом Пикапом.) **Г** — вирус orf из семейства Paparox (220–300 нм × 140–170 нм). Штрихи 100 нм



случаев приходится дифференцировать вирусы герпеса (рис. 11.6, А) и поксивирусы (рис. 11.6, Б–Г). Кроме того, в ЭМ-лабораториях должны уметь отличить Orthorox- (рис. 11.6, В) от Pararox-вирусов (рис. 11.6, Г). Благодаря способности быстро выявлять вирусы оспы ЭМ стоит на переднем краю контроля за биотерроризмом [49]. Некоторые пикорнавирусы (например, вирусы Коксаки и энтеровирусы) могут вызывать везикулярную сыпь. В ЭМ эти возбудители выглядят, как SRV (см. рис. 11.1, В; 11.4, Ж; 11.5, Г; 11.7, Б и 11.8, В). Иногда на срезах кожных поражений выявлялись вирусы кори, полиомы и парвовирусы, но эти поражения обычно не были везикулярными.



**Рис. 11.7.** Респираторные вирусы при негативном окрашивании. **А** — аденовирус, крупный (70–90 нм) «голый» икосаэдрический вирус. **Б** — вирус Коксаки — пикорнавирус (27–30 нм). **В** — респираторно-синцитиальный вирус, оболочный вирус семейства парамиксовирусов; обратите внимание на пушок вокруг вирионов. **Г** — спиральные нуклеокапсиды респираторно-синцитиального вируса. (Микрофотографии В и Г предоставлены Марией Шумански, Детская больница, Торонто, США). **Д** — коронавирусы, оболочный вирус с длинными 20-нм шипами на поверхности. **Е** — цитомегаловирус, оболочный вирус с короткими поверхностными выростами (настолько короткими, что в клиническом материале их обычно не видно; икосаэдрический нуклеокапсид имеет размер 90–100 нм). Штрихи 100 нм

## Кровь и сыворотка крови

Вирус гепатита В (HBV) можно выявить в сыворотке зараженных пациентов на ранних этапах инфекции [50], но диагноз обычно ставится на основании серологии. Вирус гепатита дельта — РНК-возбудитель внутри поверхностной оболочки HBV. Его размер варьирует от 28 до 39 нм, но методом ЭМ он не диагностируется.

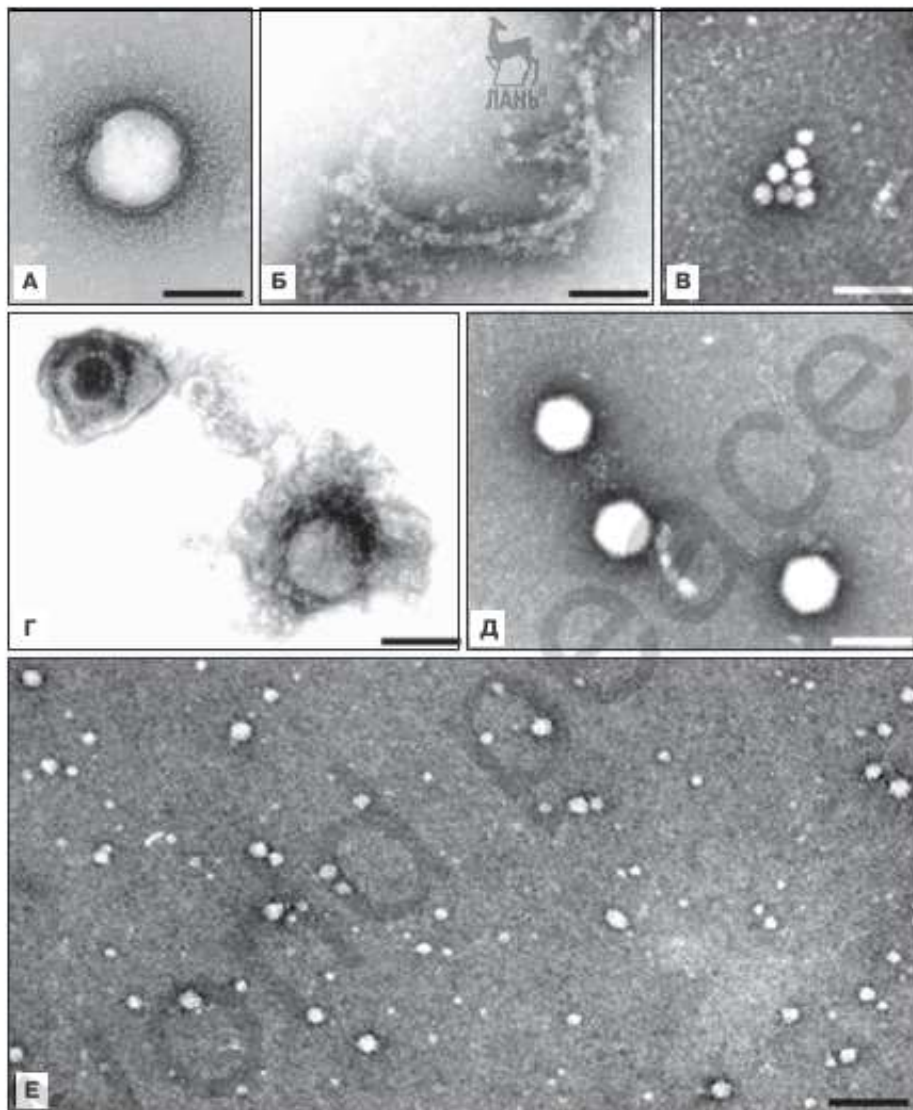
Парвовирус В19 (рис. 11.9, Б) вызывает инфекционную эритему (пятая болезнь) — детскую болезнь с сыпью и лихорадкой. Методом ЭМ вирус обнаруживается в крови [51, 52], амниотической и суставной жидкостях. Иногда в крови можно обнаружить SRV (энтеро- и коксакивирусы — см. рис. 11.1, В; 11.4, Ж; 11.5, Г; 11.7, Б; 11.8, В и 11.9, В); с большой осторожностью их следует отличать от липопротеинов (рис. 11.8, Е) на основании соответствующего размера, а также однородности размера и формы (см. ниже — Спинномозговая жидкость).

Вирус герпеса человека 6 (HGV-6) можно выделить из моноцитов периферической крови пациентов с внезапной экзантемой; герпесвирусы распознаются ЭМ, но в данном случае предпочтительно культивировать вирус. В крови циркулируют арбовирусы и аренавирусы, но при негативном окрашивании выявить их непросто. Также циркулируют ретровирусы, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус Т-клеточной лейкемии/лимфомы человека (HTLV), но их титры невелики. Они не распознаются методом ЭМ, поскольку шипы их оболочки короткие, а нуклеокапсид нечеткий. В крови находят филовирусы, но для диагностики ЭМ не требуется.

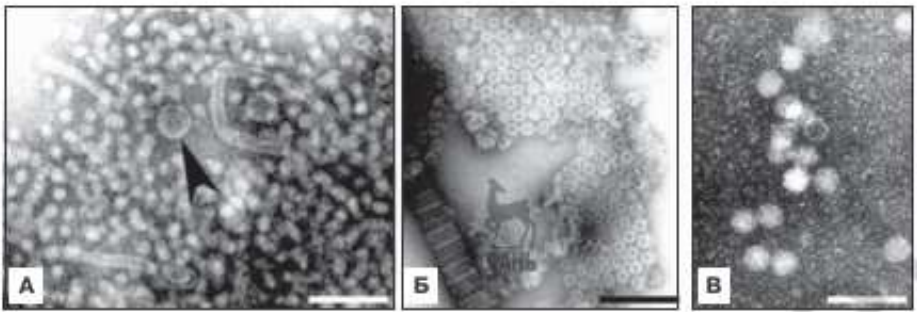
## Назофарингеальные жидкости, легочные смывы, плевральные выпоты

Инфекции дыхательных путей вызываются многими вирусами [53, 54]. Вирусы, выявляемые в респираторных образцах при негативном окрашивании, показаны на рис. 11.7. В секретах дыхательных путей бывают видны аденовирусы (рис. 11.7, А), SRV (энтеровирусы, риновирусы, вирусы Коксаки (рис. 11.7, Б), орто- и парамиксовирусы (вирусы гриппа, парагриппа, кори, эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный (рис. 11.7, В и Г), а также коронавирус (рис. 11.7, Д). Орто- и парамиксовирусы следует отличать от клеточного детрита (митохондрий), но друг от друга их отличить сложно. Ортомиксовирусы могут быть яйцевидными (~100 нм) или длинными (~100×1500 нм), а размер парамиксовирусов варьирует (от ~100 нм до ~300 нм), но они не образуют длинных частиц. Коронавирусы имеют более длинные выросты на поверхности оболочки. У пациентов с нарушенным иммунитетом можно выявить вирусы герпеса, особенно CMV (рис. 11.7, Е) и HSV. Изредка можно увидеть вирусы полиоми (рис. 11.1, Б и 11.5, А).

Эти образцы могут содержать слизь, затрудняющую обзор; их разжижают спутолизин (Sputolysin—Behring Diagnostics, Inc., Сомервилль, Нью-Джерси) и подвергают ультрацентрифугированию для



**Рис. 11.8.** Вирусы, выявляемые в СМЖ при негативном окрашивании. **А** — вирус эпидемического паротита, парамиксовирус с шипами на поверхности. **Б** — спиральный нуклеокапсид вируса эпидемического паротита. Ср. А и Б с другими парамиксовирусами на рис. 11.1, Д: 11.7. В и Г. **В** — энтеровирус, мелкий (27–30 нм) круглый вирус из семейства пикорнавирусов; его поверхность нечеткая. **Г** — цитомегаловирус, крупный (120–200 нм) оболочный вирус. Краска проникла в оболочку верхней частицы слева, видно 100-нм нуклеокапсид, но не проникла в другую частицу, одиночную такую частицу распознать невозможно. **Д** — аденовирус, крупная (120–200 нм) «голая» икосаздрическая частица. **Е** — аполипептид, обогащенный ультрацентрифугированием (капельки всплыли на поверхность) СМЖ. Показано, какая путаница может возникнуть при просмотре этого образца и других (стул. кровь). Отметьте непостоянство размера. Штрихи соответствуют 100 нм. (Препарат СМЖ предоставлен Джоном Гайтоном, Медицинский центр Университета Дьюка.)



**Рис. 11.9.** Вирусы, видимые в крови при негативном окрашивании: **А** — вирус гепатита В. Полный 42-нм вирус называется частицей Дэйна (стрелка); филаменты и мелкие (~22 нм) круглые частицы — неинфекционный вирусный поверхностный антиген. (Микрофотография предоставлена Центром по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, США.) **Б** — парвовирус В19, очень мелкие (22 нм) частицы, полученные в данном случае гомогенизацией зараженной ткани печени и водной экстракцией. **В** — энтеровирус, мелкая (~27 нм) икосаэдрическая частица из семейства пикорнавирусов. Штрихи 100 нм

концентрирования вирусов. Маточный раствор спутолизина (1% дитиотрейтол) разводят 1:10 и добавляют одну часть к одной части образца. Смесь инкубируют 30–60 мин при встряхивании и затем ультрацентрифугируют для осаждения вирусов.

### Спинномозговая жидкость

Иногда при инфекциях центральной нервной системы [55] вирусы можно обнаружить в СМЖ. Все образцы СМЖ надо подвергнуть ультрацентрифугированию, и чем больше объем образца, тем больше вероятность выявления вируса. Чаще всего из СМЖ изолируются вирусы кори (рис. 11.8, А и Б) и энтеровирусы (рис. 11.1, В, 11.4, Ж; 11.5, Г; 11.7, Б; 11.8, В и 11.9, В). В СМЖ пациентов с подавленным иммунитетом обнаруживаются вирусы герпеса (VZV, CMV (рис. 11.8, Г) и HSV) и аденовирусы (рис. 11.4, Б; 11.5, Б; 11.7, А и 11.8, Г). Мелкие оболочные вирусы, такие как тога- и флавивирусы, не выявляются при ЭМ: оболочка и нуклеокапсид не имеют четкой морфологии.

### Другие жидкости

Негативное окрашивание и ЭМ применимы и к другим жидким образцам, включая слезы и аспираты плевральной, перикардиальной и асцитной жидкостей. Концентрация вирусов в них обычно низкая, и если объем достаточный, образец надо подвергнуть ультрацентрифугированию. Часть образца надо отправить в культуральную лабораторию для амплификации вируса. В этих образцах чаще всего встречаются аденовирусы (рис. 11.4, Б; 11.5, Б; 11.7, А и 11.8, Д)

и SRV (рис. 11.1, В; 11.4, Ж; 11.5, Г; 11.7, Б; 11.8, В и 11.9, В). SRV могут быть в перикардиальной жидкости (например, вирусы Коксаки). Слезная жидкость может содержать SRV (например, энтеровирусы) или аденовирусы; вирусные болезни глаз обсуждены подробно в [56]. Вирусы герпеса могут присутствовать в слюне, слезах и легочных смывах. Показано, что вирус бешенства и ВИЧ могут содержаться в слюне, но ни один из них не диагностируется методом ЭМ.

## Ткани

Изучению с применением ЭМ можно подвергнуть плотные ткани, особенно образцы от пациентов с нарушениями иммунной системы (дети с врожденным иммунодефицитом, пациенты со СПИДом, пациенты после трансплантации костного мозга или органов и получающие химиотерапию). В то время как светомикроскопическая иммуногистохимия дает большее поле для изучения, а молекулярные методики очень чувствительны, ЭМ может оказаться особенно полезной там, где специфическими зондами вирус не выявляется. Чаще всего в лабораторию ЭМ поступают образцы печени, легких, мозга, кишечника, кожи и почек.

Пытаясь найти человеческие вирусы на тонких срезах, следует помнить, что ДНК-вирусы обычно проходят сборку в ядре, а РНК-вирусы — в цитоплазме. «Голые» икосаэдрические ДНК-вирусы выходят из клетки вследствие лизиса, на поздних стадиях, когда ядерная мембрана повреждена, их можно увидеть в цитоплазме. Нуклеокапсиды оболочных вирусов собираются в ядре и могут отпочковываться от ядерной мембраны, чтобы получить оболочку или пройти сквозь ядерную мембрану без оболочки и получить оболочку от цитоплазматической мембраны (вирусы герпеса). Исключение — поксивирусы (это ДНК-вирусы, которые проходят сборку только в цитоплазме). Исключения есть и у РНК-вирусов: иногда у некоторых парамиксовирусов в цитоплазме бывают видны не целые вирионы, а спиральные нуклеокапсиды. Поэтому когда в цитоплазме видны вирусоподобные структуры, следует проверить, имеются ли они в ядре; если да, то это ДНК-вирус, если нет — скорее всего, это РНК-вирус. «Голые» РНК-вирусы выходят из клетки при ее лизисе. Оболочные вирусы, чтобы получить наружное покрытие, могут пенетрировать через цитоплазматическую мембрану во внеклеточное пространство или через внутренние мембраны.

Искать неизвестные вирусы в любой ткани, особенно в мозге, надо в участках с необычными признаками (воспаление, клетки увеличенного размера) при малом увеличении, а затем при большом увеличении идентифицировать вирус. Описаны методики локализации очаговых инфекций [8, 57]. Следует с большой осторожностью отличать вирусы от нормальных клеточных структур (структуры, которые можно спутать — см. ниже).

## Печень

В печени были выявлены некоторые вирусы, вызывающие гепатит [58], такие как вирус гепатита А (SRV; см. энтеровирус, рис. 11.3, Б, HBV (рис. 11.10, А; 11.10, а; 11.10, а' и 11.10, а''), а также CMV (рис. 11.10, Б), но легче и эффективнее диагностировать их серологически. В печени также можно увидеть аденовирус (рис. 11.10, В). Можно также увидеть вирус Эбола, но для диагностики не требуется ЭМ. При ЭМ можно выявить дефектные или неполные вирусные частицы — полезный способ оценки ответа на противовирусные препараты (рис. 3.42 у Миллер [7]). Вирус гепатита С (флавивирус) оказывается причиной большой доли случаев гепатита в США, но не был выявлен при ЭМ ткани печени.

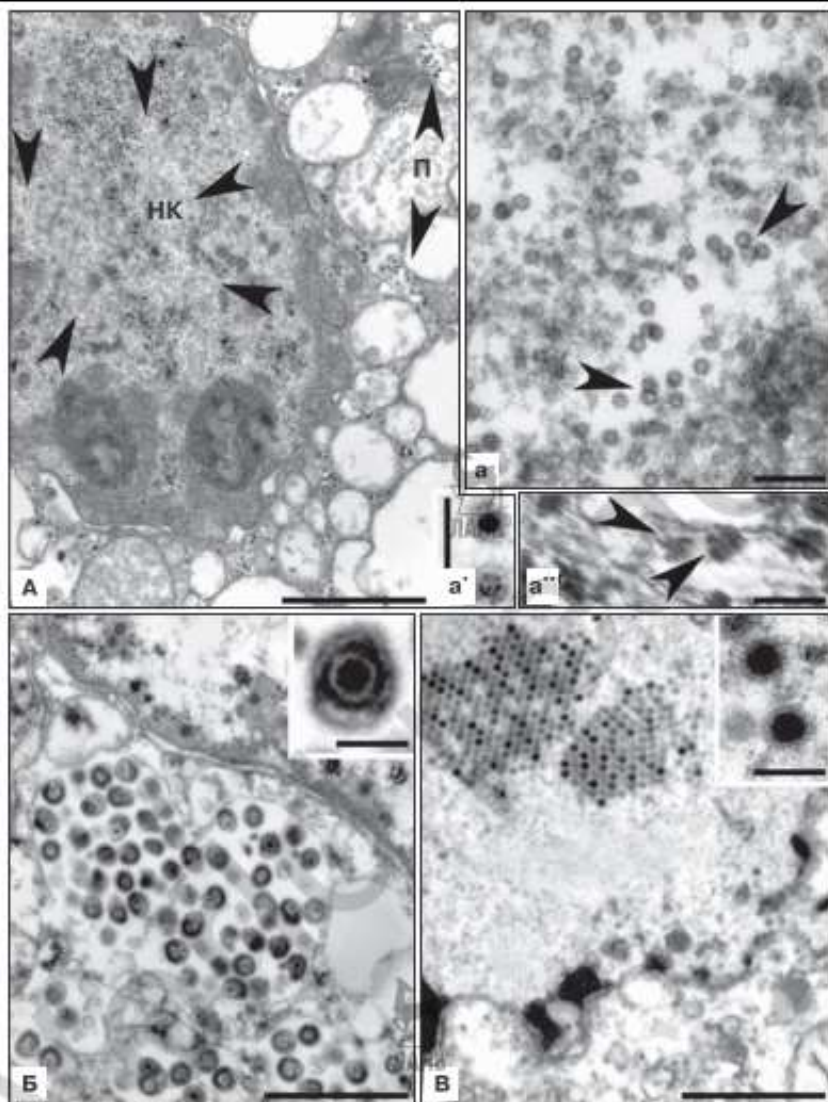
## Легкие и бронхоальвеолярные клетки

Чаще всего в дыхательных путях выявляются аденовирус (рис. 11.2, А), пармиксовирусы, например респираторно-синцитиальный, вирус парагриппа, иногда — вирус кори (рис. 11.3, Д), ортомиксовирусы (вирусы гриппа), CMV (рис. 11.10, Б), коронавирусы (рис. 11.11) и SRV (энтеровирусы, рис. 11.3, Б и риновирусы) [36]. С помощью ЭМ легко идентифицируются аденовирусы (рис. 11.2, А и 11.10, В) и CMV (рис. 11.10, Б); в клетках из бронхолегочного смыва наблюдали вирус полиомы. Для идентификации оболочечных вирусов со спиральным нуклеокапсидом нужен опытный глаз — некоторые клетки имеют выросты на поверхности, похожие на поверхностные шипы миксовирусов. SRV легко спутать с рибосомами и гликогеном.

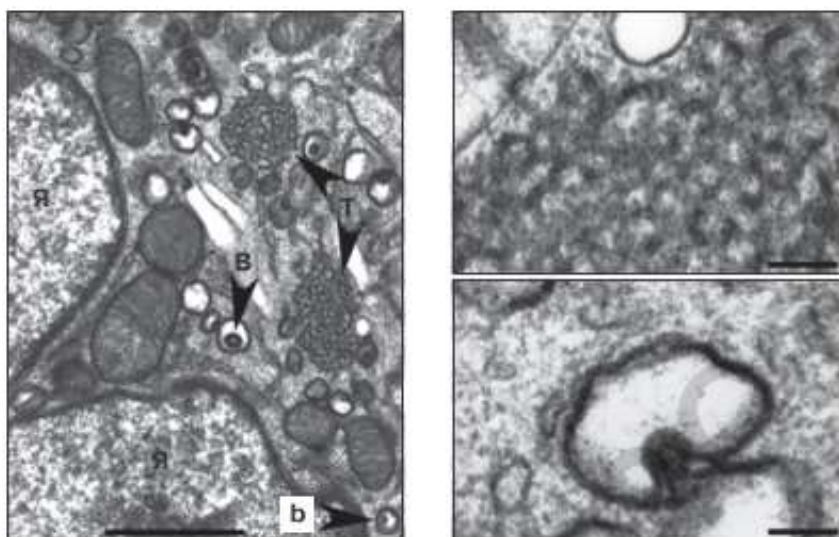
## Ткань центральной нервной системы (головной мозг, оболочки головного мозга)

Получено много данных о вирусных инфекциях центральной нервной системы, вирусном нейротропизме и дифференциальной диагностике [55, 59]. Наиболее вероятные вирусы, выявляемые методом ЭМ в головном мозге, — аденовирусы (рис. 11.2, А и 11.10, В), вирусы герпеса (рис. 11.2, В; 11.10, Б и 11.13, А), а также SRV (рис. 11.3, Б). HSV обычно вызывает поражение височной доли. SRV, не идентифицируемые морфологически, включают энтеро-, коксаки- и эховирусы. ЭМ особенно полезна при диагностике прогрессирующей мультиочаговой лейкоэнцефалопатии, вызываемой вирусом полиомы (JC-вирус) (рис. 11.12, А, а); при световой микроскопии ядерные включения могут походить на аденовирусную инфекцию.

Иногда в мозгу встречаются арбовирусы, например вирус энцефалита Сен-Луи, флавивирусы (рис. 11.12, Б, б), например вирус западного конского энцефалита) и энтеровирусы (рис. 11.3, Б), например полиовирус. Мозг инфицируют также буньявирусы (например, группа вирусов калифорнийского энцефалита) и орбивирус (см. реовирус, рис. 11.3, А), вирус клещевой колорадской лихорадки. Альфавиру-



**Рис. 11.10.** Вирусы гепатита на тонких срезах печени. **А** — вирус гепатита В; 28-нм нуклеокапсиды (нк) в ядре едва различимы при малом увеличении (20 000 $\times$ ). Скопления поверхностных антигенов (п) могут быть связаны с эндоплазматическим ретикулумом. **а** — большое увеличение мелких нуклеокапсидов в ядре. **а'** — большое увеличение 42-нм полных частиц. **а''** — большое увеличение поверхностного антигена (стрелки), связанного с эндоплазматическим ретикулумом. (Микрофотография любезно предоставлена д-ром Джозефом Харбом, Медицинский колледж штата Висконсин, Милуоки.) **Б** — полные вирионы CMV внутри вакуолей в цитоплазме; обратите внимание на множество частиц в везикулах. Ср. с HSV (рис. 11.2, В) — вирусные частицы не образуют крупных агрегатов в цитоплазме. **Врезка.** Большое увеличение полного вириона. **В** — паракристаллиновые образования в ядре. **Врезка.** Большое увеличение двух вирусов. Штрихи на А–В соответствуют 1 мкм, на а, а', а'', врезке Б, врезке В — 100 нм

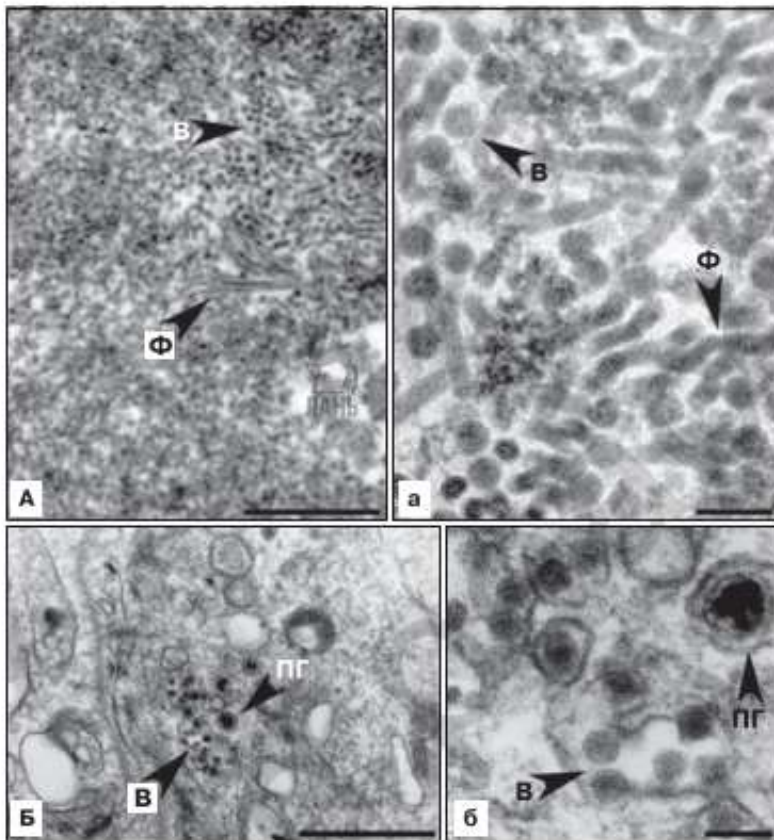


**Рис. 11.11.** Тонкий срез коронавируса; иногда виден в легких. Вирионы прорываются в цитоплазматические везикулы (в); в цитоплазме имеются тубулярные включения (т); слева видны части двух ядер этой синцитиальной клетки. Вверху справа показано тубулярное включение при большом увеличении (100 000 $\times$ ), внизу справа — большое увеличение вируса, отпочковывающегося от цитоплазмы. (Зараженные клетки предоставлены д-ром Ральфом Бариком, Университет штата Северная Каролина, Чейпл Хилл.) Также в легких можно увидеть аденовирус (рис. 11.2, А), вирусы герпеса, например HSV (рис. 11.2, В) и CMV (рис. 11.10, Б), изредка реовирус (рис. 11.3, А); пикорнавирусы, например энтеро- и риновирусы (рис. 11.3, Б), вирус кори (рис. 11.3, Д), вирус полиомы (см. рис. 11.12). Штрих слева (малое увеличение) соответствует 1 мкм, штрихи справа (большое увеличение) — 100 нм

сы — оболочные частицы размера 60–70 нм, они отпочковываются от цитоплазматической мембраны; флавивирусы (рис. 11.12, Б) — оболочные частицы размером 40–50 нм, они не отпочковываются от цитоплазматической мембраны, но их созревание связано с эндоплазматическим ретикулулом. Буньявирусы — оболочные частицы размером 90–100 нм; они попадают в пузырьки аппарата Гольджи. Орбивирусы — безоболочные частицы размером 65–80 нм (см. реовирус, рис. 11.3, А). Мозг поражают также вирус бешенства (рабдовирус, рис. 11.3, Г), но обычно после укуса бешеного животного диагностика проводится методом иммунофлуоресцентной микроскопии.

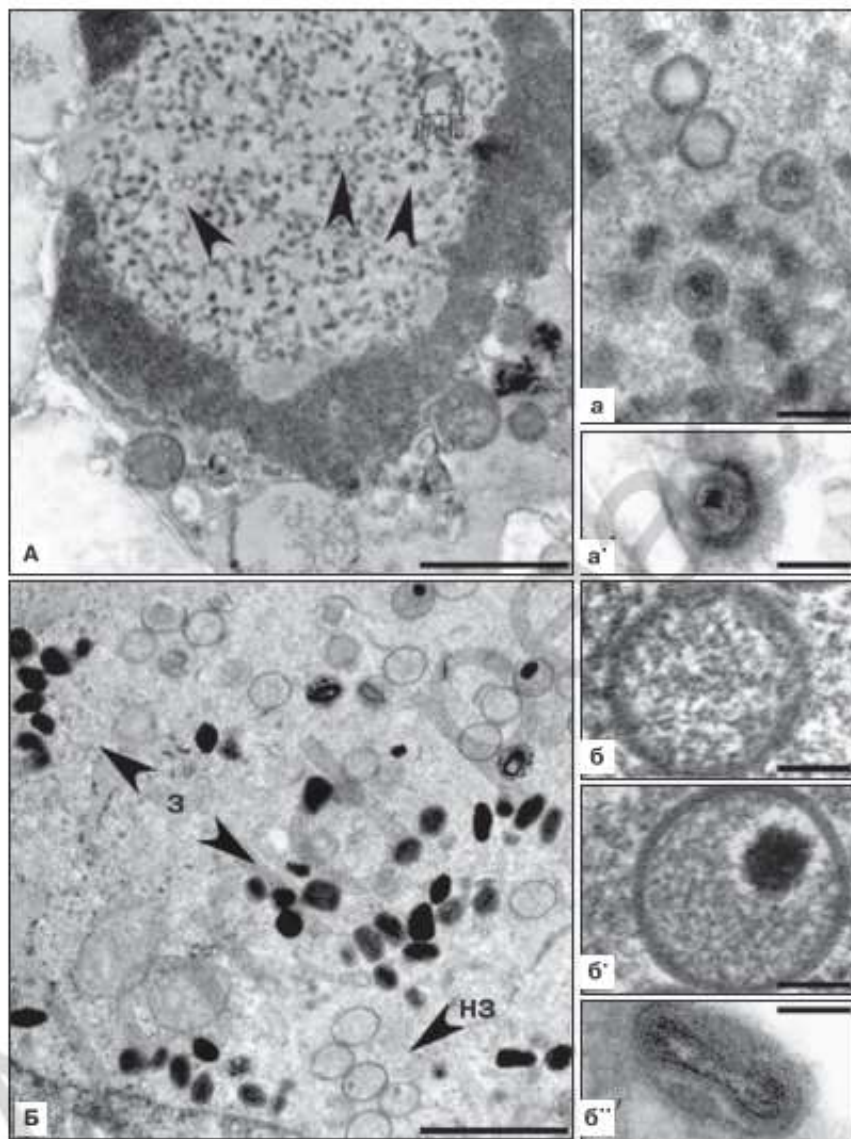
Вирус кори (рис. 11.3, Д) можно увидеть в мозге при хроническом демиелинизирующем заболевании — подостром склерозирующем панэнцефалите (ПСПЭ). При ПСПЭ можно обнаружить спиральные нуклеокапсиды вируса в ядрах — это необычная ситуация, поскольку они РНК-содержащие. Демиелинизирующее заболевание иногда может быть вызвано вирусом краснухи. К счастью, оба вируса сейчас встречаются редко благодаря вакцинации.





**Рис. 11. 12.** «Голый» ДНК- и оболочный РНК-вирус на тонком срезе мозга. **А** — полиомавирус из случая прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии; малое увеличение ядра, заполненного вирусными частицами (В) и филаментами (Ф). Иногда вирусы уложены в паракристаллическую структуру. **а** — филаменты (Ф) и сферические вирионы (В) при большом увеличении. **Б** — флавивирус на биопсии мозга пациента с энцефалитом. Вирионы (В) ассоциированы с эндоплазматическим ретикулумом. Обратите внимание на нейросекреторную гранулу (с плотной сердцевиной) (В) — нормальную органеллу в мозге. **б** — большое увеличение вируса (В) и гранулы с плотной сердцевиной (пг). Штрихи на А и Б соответствуют 1 мкм, на а и б — 100 нм

Хронические дегенеративные заболевания ЦНС, губчатые энцефалопатии вызываются белковыми частицами (прионами), но возможности ЭМ в таких случаях ограничены, поскольку измененные прионные частицы морфологически идентичны нормальным. Некоторые вирусы (например, вирусы кори, ветрянки, эпидемического паротита, EBV, CMV, VZV и гриппа) могут вызывать постинфекционный энцефаломиелит с аутоиммунным компонентом, при этом вирус не виден или его мало.



**Рис. 11.13.** Тонкие срезы вирусов, видимых в кожных поражениях. **А** — нуклеокапсиды вируса варицелла зостер (стрелки) в клеточном ядре. **а** — нуклеокапсиды при большом увеличении. **а'** — полный вирион в цитоплазме при большом увеличении (Ткани предоставлены д-ром Джеймсом Карузо, Медицинский центр Университета Дьюка, Дарэм, Северная Каролина.) **Б** — вирус коровьей оспы из культуры ткани. Незрелые (НЗ) овальные частицы образуются в цитоплазме наряду с плотными зрелыми (З) вирионами в форме кирпича. Внизу слева видна маленькая часть ядра. **б** — незрелая частица при большом увеличении. **б'** — большое увеличение незрелой частицы с конденсирующимся нуклеокапсидом. **б''** — большое увеличение зрелой частицы с сердцевинной в форме гантели. Штрихи на А и Б соответствуют 1 мкм, на а, а', б, б' и б'' — 100 нм

SRV (энтеро- и коксакивирусы, рис. 11.3, Б), вирусы эпидемического паротита (см. вирус кори, рис. 11.3, Д), герпесвирусы (рис. 11.2, В; 11.13, А, а, а') и вирус лимфоцитарного хориоменингита (редкий аренавирус, выделенный от мышей и хомяков) вызывают менингит.



### Кишечник, желудок и пищевод

Большинство желудочно-кишечных вирусов [25, 60] выделяются в количестве, достаточном для выявления при негативном окрашивании фекального материала; аденовирусы (рис. 11.2, А и 11.10, В) и ротавирусы (см. реовирус, рис. 11.3, А) можно увидеть на тонких срезах кишечника. Из пищевода и кишечника пациентов с нарушенным иммунитетом были выделены другие вирусы, такие как CMV (рис. 11.10, Б) и HSV (рис. 11.2, В). В кишечном тракте размножаются энтеровирусы, они могут быть связаны с диареей или нет.

### Кожа

Вирусные поражения кожи могут быть результатом кожной инфекции или вторичной реакцией на вирусную инфекцию других организмов [61]. Вирусы, вызывающие везикулярные сыпи, можно обнаружить в пузырьной жидкости при негативном окрашивании (рис. 11.6). На тонких срезах биопсий кожи можно увидеть также вирусы герпеса (рис. 11.2, В; 11.13, А, а, а') и вирусы оспы (рис. 11.13, Б, б, б'), например контагиозный моллюск и параоспу узлов молочной железы (*parapox of milker's nodes*). ЭМ негативно окрашенных и тонких срезов материала, полученного при вспышке обезьяньей оспы, показала, что это поксвирус [62].

В коже пациентов с нарушенным иммунитетом ЭМ выявила полиомавирусы (рис. 11.12, А, а) [63]. В коже были обнаружены папилломавирусы (морфологически похожие на полиомавирусы), но диагностика полагается скорее на гистологию, чем на ЭМ. Более того, геном вируса папилломы может существовать в клетках, не приводя к образованию полных вирионов, поэтому бывает трудно обнаружить их морфологически. Некоторые другие вирусы, например кори, краснухи, парвовирус, некоторые эховирусы, некоторые вирусы Коксаки, EBV, CMV и вирусы некоторых геморрагических лихорадок вызывают макулопапулярную сыпь, их выявляли на тонких срезах; диагностика не связана с ЭМ.

### Почки

Вирусы мочевого тракта часто можно выявить неинвазивно, при негативном окрашивании мочи. Но поскольку ЭМ-лаборатории хирургической патологии часто берут для исследования почечную ткань, важно знать, какие вирусы там можно увидеть. Потенциальные патогены в этом органе — полиомавирус (рис. 11.12, А, а), аденовирус

(рис. 11.2, А и 11.10, В), CMV и HSV (рис. 11.2, В и 11.10, Б), а также энтеровирусы (рис. 11.3, Б).

### *Другие ткани*

Любую предоставленную ткань можно изучить на вирусы методом ЭМ, но скорее всего, будут получены вышеупомянутые ткани. Редкими образцами могут быть лимфоузлы, слюнные железы, ткань перикарда, а также клетки, осажженные из перикардиальной и суставной жидкостей, смыва из трахей и бронхов. Вероятные вирусы — аденовирус, герпесвирусы, полиомавирусы, парамиксовирусы и SRV. В гематолимфоидной ткани и ткани суставов может быть обнаружен парвовирус B19, вирус кори, HGV-6 и ретровирусы, хотя увидеть ретровирусы сложно, поскольку образец культивируют с восприимчивыми клетками (например, эритроцитами пуповины).

## **ЭМ ПРИ НОВЫХ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЯХ И НАДЗОР ЗА БИОТЕРРОРИЗМОМ**

Инфекционные микроорганизмы появляются и «воскресают» [64], и продолжается разработка реактивов для надзора за ними [65]. Однако в случае нового или необычного дебюта заболевания неизвестного происхождения для выбора молекулярного зонда потребуется время. ЭМ — быстрый метод [4, 66, 67], не требующий специальных реактивов (антител, антигенов, зондов ПЦР, стандартов нуклеиновых кислот, поэтому часто применяется для идентификации неизвестных возбудителей [68, 69]. Вот несколько примеров.

Первая вспышка Эбола в Заире диагностировалась методом ЭМ вируса, изолированного из человеческих образцов [70]. Полиомавирусная инфекция кожи (триходисплазия) впервые был выявлена с помощью ЭМ [63]. При вспышках хенипавирусной инфекции (Hendra, Nipah) в Австралии и Азии с успехом применялась ЭМ [71]. Некоторые хантавирусы (буньявирусы) не дают видимой цитопатологии в клеточных культурах позвоночных [24], у грызунов вызывают персистирующие непатогенные инфекции, которые могут передаваться человеку с мочой и фекалиями. ЭМ дополнила описание возбудителя хантавирусного легочного синдрома на юго-западе США [72]. Идентификация вируса обезьяньей оспы [62, 73] и коронавируса SARS [39, 40] была ускорена ультраструктурными исследованиями в целях установления семейства вирусов.

ЭМ играет решающую роль в надзоре за вирусами-возбудителями, которые могут распространить террористы. Лаборатории быстрого реагирования из Сети лабораторий реагирования (СЛР) сопряжены с учреждениями ЭМ; опубликованы процедуры для работы с потенциальными вирусными возбудителями [69, 74, 75]. ЭМ, как ни один другой метод, за короткое время позволяет анализировать широкий круг потенциально патогенных возбудителей.

## КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

### Мониторинг

Клеточные линии, используемые для изоляции вирусов из клинического материала, сами могут содержать эндогенные возбудители или заражаться персистирующим вирусом; для мониторинга можно применять ЭМ [1, 3, 5]. Примером служат ретровирусы (рис. 11.3, Е), V 40 (вирус полиомы), SV 5 (парамиксовирус — рис. 11.3, Д) и пенные вирусы (ретровирусы, проникающие в эндоплазматический ретикулум) [1]. Эти загрязнители могут изменять исходный цитопатический эффект, создавая свои цитопатические изменения. Они могут препятствовать росту инокулированного вируса, вызывать цитопатологию или вносить путаницу при диагностике (их можно принять за патоген). Клеточные культуры могут загрязняться также микоплазмой и другими бактериями.

### Процедуры

Некоторые вирусные возбудители можно идентифицировать при негативном окрашивании клеточной среды или водного экстракта замороженных и оттаянных клеточных культур. Некоторые ассоциированные с клетками вирусы, микоплазмы и другие бактерии лучше всего видны на тонких срезах.

Для негативного окрашивания клетки в среде подвергают замораживанию на бане из ацетона/сухого льда или в жидком азоте с последующим оттаиванием на бане при 37 °С 2–3 раза. Клеточный детрит удаляют центрифугированием при низких скоростях, надосадочную жидкость наносят на сетку с пленкой и проводят негативное окрашивание, как описано выше. Может понадобиться ультрацентрифугирование осветленного клеточного гомогената, чтобы сконцентрировать вирионы.

Для изготовления тонких срезов монослой клеток быстро промывают средой без сыворотки или буфером, фиксируют 5 мин в глutarовом альдегиде на буфере, соскабливают с субстрата, осаждают на микроцентрифуге. Если культура помутнела, это может свидетельствовать о бактериальном загрязнении или о том, что клетки отошли от субстрата. В этом случае и плавающие, и прикрепленные клетки собирают с помощью микроцентрифуги и фиксируют не менее 30 мин. Если сгусток хорошо сформированный, его можно порезать на миллиметровые кусочки и осторожно обрабатывать, как ткань. Если нет, его заключают в жидкий охлажденный 1% агар для склеивания [5, 17]. Неприлипающие клеточные культуры осаждают и обрабатывают аналогично.

Для заключения в агар сгусток извлекают из пробирки, а если она маленькая и пластиковая, ее можно разрезать лезвием. Затем сгусток помещают на парафильм, подсушивают с помощью уголка фильтровальной бумаги до консистенции «готовой овсянки» и вокруг наносят

агар; клетки следует ресуспендировать в агаре, иначе их сложно будет находить под микроскопом. Можно заключать клетки в агар и без промывки после осаждения в глутаровом альдегиде, но не следует фиксировать глутаровым альдегидом сам агар, поскольку это затруднит проникновение реактивов в него. Далее обрабатывают, как ткань.

## **СТРУКТУРЫ, КОТОРЫЕ МОЖНО ПРИНЯТЬ ЗА ВИРУСЫ**

Наиболее трудная задача при диагностике вирусных инфекций — определить, что необычные структуры являются вирусами, а не сферическими структурами и мембранным детритом при негативном окрашивании или нормальными клеточными органеллами на тонких срезах. Описано множество структур, которые можно спутать [1, 5, 9, 76].

Липиды, липопротеины и бесхвостые бактериофаги могут сильно напоминать мелкие икосаэдрические вирусы при негативном окрашивании (рис. 11.7, E). Клеточный детрит и фрагменты митохондрий могут маскировать оболочные вирусы с шипами.

На тонких срезах оболочные вирусы могут быть похожи на следующие структуры: покрытые клатрином пузырьки, синаптические пузырьки, плотные гранулы и кавеолы. Ядерные гранулы, рибосомы и гликоген можно спутать с мелкими икосаэдрическими вирусами. За крупные икосаэдрические вирусы можно принять ядерные поры, глыбчатый хроматин и гранулы митохондрий. Микротрубочки и промежуточные филаменты могут напоминать спиральные нуклеокапсиды.

Как только установлено, что необычная структура скорее всего не является нормальным клеточным компонентом, следует свериться с атласом вирусов. Имеется несколько превосходных [1, 3, 10, 24, 76, 77].

## **БЕЗОПАСНОСТЬ**

Все образцы следует обрабатывать, соблюдая универсальные меры предосторожности. Нельзя считать, что при негативном окрашивании все вирусы будут убиты; альдегиды не инактивируют прионы. Фиксаторы ЭМ и смолы могут вызывать раздражение кожи, они канцерогенны.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

ЭМ может быть важным подспорьем другим методам идентификации вирусов. Ее достоинства — скорость и отсутствие специфических реактивов. Недостатки — требование высокой плотности вирусов в жидкостях и тот факт, что лишь маленькие области тканей можно изучить на тонких срезах; однако описаны методики, увеличивающие вероятность выявления вирусов. Чаще всего под электронным микроскопом изучают жидкие образцы, поскольку их легко получить, можно быстро посмотреть; часто они содержат вирусы, которые не так просто выявить другими методами. В силу этих причин ЭМ — важ-

ный инструмент надзора за появляющимися заболеваниями и актами биотерроризма.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Doane FW, Anderson N. *Electron microscopy in diagnostic virology. A Practical Guide and Atlas*. New York, NY: Cambridge University Press, 1987.
2. Howell DN, Payne CM, Miller SE, et al. Special techniques in diagnostic electron microscopy. *Hum Pathol* 1998; 29(12):1339–1346.
3. Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML. *Hsiung's Diagnostic Virology: As Illustrated by Light and Electron Microscopy*. New Haven, CT: Yale University Press, 1994.
4. Hayat MA, Miller SE. *Negative Staining: Applications and Methods*. New York, NY: McGraw-Hill, 1990.
5. Miller SE. Detection and identification of viruses by electron microscopy. *J Electron Microscop Tech* 1986; 4:265–301.
6. Miller SE. Evaluation of electron microscopic information available from clinical samples. In: de la Maza LM, Peterson EM, eds. *Medical Virology*, Vol 10. New York, NY: Plenum Press, 1991:21–54.
7. Miller SE. Diagnosis of viral infection by electron microscopy. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. Washington, DC: American Public Health Association, 1995:37–78.
8. Miller SE, Levenson RM, Aldridge C, et al. Identification of focal viral infections by confocal microscopy for subsequent ultrastructural analysis. *Ultrastruct Pathol* 1997; 21(2):183–193.
9. Oshiro LS, Miller SE. Application of electron microscopy to the diagnosis of viral infections. In: Lennette EH, ed. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. New York, NY: Marcel Dekker, 1992:45–68.
10. Palmer EL, Martin ML. *Electron Microscopy in Viral Diagnosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
11. Miller SE. Use of electron microscopy to diagnose viral illnesses. *Ann Saudi Med* 1997; 17:66–76.
12. Hammond GW, Hazelton PR, Chuang I, et al. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14(2):210–221.
13. Anderson N, Doane FW. Agar diffusion method for negative staining of microbial suspensions in salt solutions. *Appl Microbiol* 1972; 24(3):495–496.
14. Lee FK, Takei Y, Dannenbarger J, et al. Rapid detection of viruses in biopsy or autopsy specimens by the pseudoreplica method of electron microscopy. *Am J Surg Pathol* 1981; 5(6):565–572.
15. Kapikian AZ, Dienstag JL, Purcell RH. Immune electron microscopy as a method for the detection, identification, and characterization of agents not cultivable in an in vitro system. In: Rose NL, Friedman H, eds. *Manual of Clinical Immunology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1976:467–480.
16. Doane FW, Anderson N, Chao J, et al. Two-hour embedding procedure for intracellular detection of viruses by electron microscopy. *Appl Microbiol* 1974; 27(2):407–410.
17. Miller SE. Rapid processing of tissues for diagnostic electron microscopy. In: Jones BR, ed. *Electron Microscopy: 41 Exercises by 17 Scientists*. Monroe, NY: Library Research Associates, 1985:316–320.

18. Miller SE, Lang DJ. Rapid diagnosis of herpes simplex infection: amplification for electron-microscopy by short-term in vitro replication. *J Infect* 1982; 4(1):37-41.
19. Kok LP, Boon ME. *Microwave Cookbook for Microscopists. Art and Science of Visualization*, 3rd ed. Leiden: Coulomb Press Leyden, 1992.
20. Bozzola JJ, Russell LD. *Electron Microscopy*. Boston, MA: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 1991.
21. Davies HA. *Electron Microscopy and Immune Electron Microscopy for Detection of Gastroenteritis Viruses*. New York, NY: Marcell Dekker, 1982.
22. Kapikian AZ. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1994.
23. Champsaur H, Questiaux E, Prevot J, et al. Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus shedding. *J Infect Dis* 1984; 149(5):667-674.
24. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. New York: Elsevier Academic Press, 2005:1259.
25. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., eds. *Fields Virology*, Vol 2. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1787-1833.
26. Kelkar SD, Zade JK. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1, have been circulating in Western India since 1993. *Epidemiol Infect* 2004; 132(4):745-749.
27. Rotavirus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82(32):285-295.
28. Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, et al. Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* 1994; 68(5):3391-3396.
29. Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, et al. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1984; 20(3):365-372.
30. Wadell G, Allard A, Johansson M, et al. Enteric adenoviruses. In: Bock G, Whelan J, eds. *Novel Diarrhoea Viruses*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1987:63-91.
31. Atmar RL, Estes MK. Norwalk and related diarrhea viruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:1041-1060.
32. Matsui SM. Astrovirus. In: Richman DD, Whitley RJ, G. HF, eds. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:1075-1086.
33. Appleton H. Small round viruses: Classification and role in food-borne infections. *Ciba Found Symp* 1987; 128:108-125.
34. Caul EO, Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: An interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982; 9(4):257-265.
35. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69(2):357-371.
36. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182(116):1026-1028.
37. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20(1):23-31.



38. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, et al. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 1999; 73(5):3582–3586.
39. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(20):1967–1976.
40. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(20):1953–1966.
41. Smits SL, Lavazza A, Matiz K, et al. Phylogenetic and evolutionary relationships among torovirus field variants: evidence for multiple intertypic recombination events. *J Virol* 2003; 77(17):9567–9577.
42. Jamieson FB, Wang EE, Bain C, et al. Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J Infect Dis* 1998; 178(5):1263–1269.
43. Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, et al. Novel viruses in human faeces. *Lancet* 1988; 2(8602):103–104.
44. Taniguchi K, Wakuda M. [Picobirnavirus]. *Uirusu* 2005; 55(2):297–302.
45. Yolken R, Dubovi E, Leister F, et al. Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet* 1989; 1(8637):517–520.
46. Abe S, Miyamura K, Oba T, et al. Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32(11):1107–1108.
47. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: Interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79(10):1277–1286.
48. CDC. Negative staining electron microscopic protocol for rash illness, 2006. (<https://www.cdc.gov/smallpox/lab-personnel/specimen-collection/negative-stain.html>)
49. Miller SE. Bioterrorism and electron microscopic differentiation of poxviruses from herpesviruses: dos and don'ts. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27(3):133–140.
50. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1(7649):695–698.
51. Cossart YE, Field AM, Cant B, et al. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975; 1(7898):72–73.
52. Brown KE. Detection and quantitation of parvovirus B19. *J Clin Virol* 2004; 31(1):1–4.
53. Treanor J. Respiratory infections. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1997:5–33.
54. Gillim-Ross L, Subbarao K. Emerging respiratory viruses: Challenges and vaccine strategies. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(4):614–636.
55. Booss J, Esiri MM. *Viral Encephalitis in Humans*. Washington, DC: ASM Press, 2003.
56. Miller SE, Howell DN, Proia AD. Viral disease. In: Garner A, Klintworth G, eds. *Garner and Klintworth's Pathobiology of Ocular Disease, Part A*. New York, NY: Informa Health Healthcare, 2008:155–211.
57. Chu CT, Howell DN, Morgenlander JC, et al. Electron microscopic diagnosis of human flavivirus encephalitis: use of confocal microscopy as an aid. *Am J Surg Pathol* 1999; 23(10):1217–1226.
58. Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ. *Viral Hepatitis*, 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2005.

59. Cassady KA, Whitley RJ. Central nervous system infections. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1997:35–53.
60. Bock G, Whelan JE. Novel Diarrhoea Viruses — Ciba Foundation Symposium 128. New York, NY: Wiley, 1987.
61. Vander Straten M, Carrasco D, Tyring SK. Infections involving the skin. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:117–134.
62. Bayer-Garner IB. Monkeypox virus: Histologic, immunohistochemical and electron-microscopic findings. *J Cutan Pathol* 2005; 32(1):28–34.
63. Haycox CL, Kim S, Fleckman P, et al. Trichodysplasia spinulosa — A newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4(3):268–271.
64. Murphy FA. Emerging zoonoses: The challenge for public health and biodefense. *Prev Vet Med* 2008; 86(3–4):216–223.
65. Petrenko VA, Sorokulova IB. Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution. *J Microbiol Methods* 2004, 58(2):147–168.
66. Schroeder JA, Gelderblom HR, Hauroeder B, et al. Microwave-assisted tissue processing for same-day EM-diagnosis of potential bioterrorism and clinical samples. *Micron* 2006; 37(6):577–590.
67. Giberson RT, Austin RL, Charlesworth J, et al. Microwave and digital imaging technology reduce turnaround times for diagnostic electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27(3):187–196.
68. Gentile M, Gelderblom HR. Rapid viral diagnosis: Role of electron microscopy. *New Microbiol* 2005; 28(1):1–12.
69. Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: Present and future. *Micron* 2006; 37(2):91–106.
70. Johnson KM, Lange JV, Webb PA, et al. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1977; 1(8011):569–571.
71. Chua KB, Wong EM, Cropp BC, et al. Role of electron microscopy in Nipah virus outbreak investigation and control. *Med J Malaysia* 2007; 62(2):139–142.
72. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995; 146(3):552–579.
73. Guarner J, Johnson BJ, Paddock CD, et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(3):426–431.
74. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(3):294–303.
75. Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol* 1999; 13(1–2):105–119.
76. Dalton AJ, Hagenau F. *Ultrastructure of Animal Viruses and Bacteriophages: An Atlas*. New York, NY: Academic Press, 1973.
77. Palmer EL, Martin ML. *An Atlas of Mammalian Viruses*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1982.
78. Fleming DO, Hunt DL. *Biological Safety: Principles and Practices*, 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2006.

# 12 ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСОВ В УСЛОВИЯХ ОГРАНИЧЕННЫХ РЕСУРСОВ

**Р. С. Ши**

Rosemary C. She, Department of Pathology, University of Utah  
School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.

**Д. М. Бендер**

Jeffrey M. Bender, Department of Pediatrics, University of Utah  
School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.

**К. А. Петти**

Cathy A. Petti, Department of Pathology, University of Utah  
School of Medicine, Associated Regional University Pathologists  
(ARUP) Laboratories, and Department of Medicine, University of  
Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, U.S.A.

ЛАНЬ

Чтобы ставить и подтверждать клинические диагнозы, а также осуществлять надзор за болезнью в целях профилактики потенциальных эпидемий, необходима мощная лабораторная инфраструктура. В регионах с ограниченными ресурсами выявление заболеваний сталкивается с огромными сложностями, и пациентам часто ставится предварительный диагноз инфекции, основанный только на клинических данных с учетом характерных синдромов. Такая практика зачастую приводит к неправильному диагнозу с плохим результатом и повышенной смертностью [1–5]. В частности, вирусные инфекции диагностируются редко, поскольку в отсутствие лабораторного подтверждения бывает мало эпидемиологических данных для исследования распространенности болезни и выработки клинических алгоритмов синдромной диагностики. В этой связи создание лабораторных мощностей в регионах с ограниченными ресурсами стало важным звеном в борьбе за предотвращение и сокращение инфекционных заболеваний [5–9].

Несмотря на многочисленные трудности в условиях ограниченных ресурсов, созданы инновационные, несложные и не зависящие от культуральных методы диагностики вирусных инфекций, такие как определение антигена. Преимущества быстрых тестов заключаются в том, что большинство из них не требует хранения в холодильнике или использования сложной аппаратуры, они просты, недороги, многие хранятся до года и более. Решение о проведении того или иного теста базируется на местной и региональной распространенности вирусных инфекций, предполагаемого объема тестирования в конкретном месте, навыков персонала лаборатории и гарантии качества. В этой главе обсуждаются показания для вирусологического тестирования в клинических условиях и даются рекомендации по объему

диагностических исследований для лабораторий с ограниченными ресурсами. Критерии рекомендаций выделены в табл. 12.1.

Таблица 12.1

Удачность выбранного метода<sup>a</sup>

Критерии	Баллы
Клиническая применимость	2 — рекомендуется для диагностики; 1 — полезен при определенных обстоятельствах; 0 — не рекомендуется
Стоимость	2 — низкая; 1 — умеренная; 0 — чрезмерно высокая
Простота работы	2 — несложно, требуется минимальная техническая экспертиза; 1 — умеренно сложно, требуется техническая экспертиза; 0 — очень сложно, нужны экспертиза и хорошая подготовка
Общий балл	5–6 — настоятельно рекомендуется (I); 3–4 — рекомендуется (II); 0–2 — не рекомендуется (III)

<sup>a</sup> Эти рекомендации основаны на личном полевом опыте и экспертном мнении

## ВИРУСЫ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ С КРОВЬЮ

## ВИЧ

Большая часть ВИЧ-нагрузки приходится на регионы с ограниченными ресурсами (Африка, Юго-Восточная Азия). Традиционная диагностика ВИЧ проводится путем скрининга антител к ВИЧ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с последующим подтверждением положительного результата второй пробой, например вестерн-блотом или иммунофлуоресцентным тестированием антител. Подтверждающие тесты довольно дороги и требуют технической экспертизы, часто недоступной в условиях ограниченных ресурсов. Поэтому быстрый антигенный анализ зачастую более практичен в таких регионах. Доступные методы включают иммунохроматографию, ИФА и агглютинацию латексных шариков. Чувствительность и специфичность этих проб сравнимы с традиционным тестированием, их просто ставить [7, 10]. Они надежны для индивидуального использования, однако при большом количестве образцов более надежен ИФА — если имеются оборудование и персонал.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала множество документов о работе с наборами для быстрой диагностики, правильной оценке их результатов и гарантии качества в странах с ограниченными ресурсами [6, 11, 12]. ВОЗ рекомендует проводить валидацию используемых наборов, поскольку их работа будет связана с региональными различиями между штаммами ВИЧ и их распространенностью. В зависимости от распространенности ВИЧ в конкретном регионе ВОЗ приводит несколько разных алгоритмов тестирования [6]. В целом алгоритмы предполагают серийное или параллельное использование 2–3 различных наборов быстрого тестирования для выяв-

ления антител против ВИЧ. Пациенты с неопределенным результатом должны пройти повторное тестирование через 2 нед., если результат снова неопределенный — повторные тестирования нужно проводить через 4 нед., 3 мес., 6 мес. и 1 год.

Доступно множество наборов по цене 1,5–5,0 долл. США за тест. В большинстве используется сыворотка или плазма, но в некоторых — цельная кровь из пальца (OraQuick ВИЧ-1/2, Orasure Technologies, Inc., Бетлхэм, Пенсильвания, США; Unigold ВИЧ Trinity Biotech Plc. Bray Co, Уиклоу, Ирландия; Determine ВИЧ-1/2, Abbot Labs, Эббот Парк, Иллинойс, США) или слюна (OraQuick ВИЧ-1/2; Saliva strip ВИЧ-1/2, Saliva Diagnostic Systems, Ltd., Фрэммингем, Массачусетс, США). Исследования показали, что благодаря скорости этих диагностических систем (всего 20 мин на пробу) стали лучше подтверждение диагноза и лечение [13, 14]. Список быстрых проб на ВИЧ доступен в Интернете: <http://www.rapid-diagnostics.org>

Тестирование ВИЧ-нагрузки ограничивается стабильностью РНК и высокой стоимостью тест-систем. ВОЗ не рекомендует проводить рутинное тестирование в условиях ограниченных ресурсов [6]. Однако с улучшением технологий и снижением стоимости в будущем тестирование может стать доступным. Когда определение вирусной нагрузки возможно, следует обеспечить стабильность РНК: плазму следует отделить немедленно после получения образца. В полевых условиях для этой цели зачастую используются центрифуги с ручным приводом. Если тестирование невозможно провести немедленно, перевозить образцы в лабораторию надо в холодильнике или замораживать для обеспечения стабильности образцов. Такого рода препятствие можно преодолеть, используя для тестирования высушенные пятна крови на фильтровальной бумаге, поскольку РНК на фильтровальной бумаге остается стабильной. На такие образцы рассчитана работа нескольких коммерческих наборов для проведения ПЦР-РВ (RT-PCR) (Amplicor ВИЧ-1, версия 1.5, Roche, Индианаполис, Индиана, США; Organon Teknika Nuclisens QT, bioMerieux, Marcy L'Étoile, Франция; Primagen, Амстердам, Нидерланды Retina Rainbow/NucliSens EasyQ, Marcy L'Étoile, Франция) [15–17]. Если у лаборатории достаточные ресурсы для определения вирусной нагрузки с помощью ПЦР, следует учитывать подтипы циркулирующего в данной области ВИЧ-1. Коммерческие тест-системы могут не иметь чувствительности, необходимой для выявления clade O или ВИЧ-1 не В-подтипов [13, 14].

К выгодным опциям для определения вирусной нагрузки в настоящее время относятся «домашние» тест-системы ПЦР, позволяющие экономить на реактивах, но все же требующие немалых начальных вложений в оборудование и техническую экспертизу [18]. Ультрочувствительное тестирование р24-антигена, как это делается в формате ИФА, было опробовано в качестве замены количественного анализа нуклеиновых кислот, но получены противоречивые результаты [19,

20]. Этот метод также был изучен для диагностики ВИЧ-инфекции у младенцев с использованием пятен крови [19, 21].

У младенцев клинические данные сопоставляются с лабораторным тестированием. Доступны рекомендации ВОЗ по тестированию и диагностике у младенцев [22]. Для возраста 4–6 нед. настоятельно рекомендуется тестирование нуклеиновых кислот, если оно доступно. Если тестирование невозможно в местной лаборатории, можно использовать пятна сухой цельной крови. У младенцев с неизвестным ВИЧ-контактом полезно провести серологическое тестирование, чтобы подтвердить вероятность контакта или исключить инфекцию [22, 23].

## Вирусы гепатита В и С

Вирусные гепатиты В и С часто наблюдаются у больных СПИДом, они эндемичны для многих областей Азии и Африки [24, 25]. HBV и в меньшей степени HCV обуславливают большую часть случаев гепатоклеточной карциномы во всем мире (25). Для точной постановки диагноза нужно лабораторное подтверждение. Однако часто клинический диагноз устанавливается без лабораторного подтверждения, поскольку тестирование не всегда доступно во многих регионах с ограниченными ресурсами. Интенсивно предпринимаются попытки вакцинации против HBV.

Диагноз HBV основан на выявлении поверхностного антигена гепатита В (HBsAg). В развитых странах, где ресурсы доступны и объем тестирования достаточный, можно провести еще и ИФА. Положительный результат следует подтвердить пробой нейтрализации. В развивающихся странах более практичны быстрые тесты на выявление HBsAg; согласно оценке ВОЗ [26, 27] и других исследователей [28, 29], в целом наблюдалось превосходное совпадение с результатами ИФА. Форматы исследования включают иммунохроматографию, агглютинацию и иммунофильтрацию. В случае использования этих тестов без подтверждения пробой нейтрализации диагноз можно поставить на основе положительного быстрого теста и клинических данных или же результатов других серологических определений маркеров заболевания [27]. Список быстрых проб на HBV доступен в Интернете: <http://www.rapid-diagnostics.org>

Инфекция HCV также надежно подтверждается серологически. ИФА и рекомбинантный иммуноблотинг, недавно включенные в диагностический алгоритм, рекомендованный центрами по контролю и предупреждению заболеваний (ЦКЗ), бывает непросто поставить в лабораториях с ограниченными ресурсами. Доступно много вариантов быстрого подтверждения инфекции (выявления антител против HCV) [30, 31]. Генотипирование не является рутинным ввиду его сложности. Поскольку лечение хронической инфекции HCV становится обычным делом, знание генотипа важно для назначения лечения и прогноза. Генотипы HCV 4, 5 и 6, распространенные за пределами

Северной Америки и Европы, изучены хуже, чем генотипы 1 и 2 [32]. Наши рекомендации по тестированию ВИЧ, HBV и HCV обобщены в табл. 12.2.

Таблица 12.2

Рекомендации по использованию коммерческих диагностических тест-систем для вирусов, передающихся с кровью

	Клиническая пригодность	Стоимость	Простота работы	Общий балл/уровень
<b>ВИЧ</b>				
Быстрый набор	2	2	2	6 (I)
Серология (ИФА)	2	2	1	5 (I)
НК-тест	2	0	1	3 (II)
<b>Гепатит В</b>				
Быстрый набор	2	1	2	5 (I)
Серология (ИФА)	2	1	1	4 (II)
НК-тест	1	0	1	2 (III)
<b>Гепатит С</b>				
Быстрый набор	2	1	2	5 (I)
Серология (ИФА)	2	1	1	4 (II)
НК-тест	2	0	1	3 (II)

### Скрининг банка крови на вирусы

К сожалению, в развивающихся регионах в настоящее время нет стандартных процедур скрининга банка крови на возбудителей инфекций. Кровь могут переливать и без такого тестирования [3], хотя ВИЧ, вирусы гепатитов В и С эндемичны в большинстве стран с ограниченными ресурсами. Однако такие организации, как ВОЗ, работают над проблемой тестирования всех препаратов крови в развивающихся регионах на наличие патогенов в крови. Благодаря ВОЗ доступны отчеты об использовании антигенных наборов для быстрого тестирования банков крови на ВИЧ, HBV, HCV в развивающихся странах [26, 27, 30, 31]. Эти наборы могут быть полезны, если объектов тестирования немного. Самую оптимальную чувствительность дает тестирование нуклеиновых кислот на ВИЧ и HCV. Но решение о тестировании принимается исходя из региональных ресурсов и приоритетов здравоохранения.

### РЕСПИРАТОРНЫЕ ВИРУСЫ

Вирусные инфекции дыхательных путей — самые распространенные у детей в регионах с ограниченными ресурсами. Несмотря на это, лабораторное тестирование на распространенные вирусы, такие как

вирус гриппа и респираторный синцитиальный вирус (RSV), ограничено. Более того, связанные с этими вирусами данные по эпидемиологии и смертности вне развитых стран крайне недостаточны. Поэтому обоснованность диагностики гриппа и других вирусов в странах с ограниченными ресурсами остается неясной. Хотя такие международные организации, как ВОЗ и Центр по контролю и профилактике заболеваний, создали программы, в которые включается новая информация для повышения точности алгоритмов синдромной диагностики заболеваний, связанных с респираторными вирусами.

Поскольку респираторные вирусы дают симптомы, сходные с множеством других патогенов, диагностика на основе только клинических проявлений весьма проблематична [34, 35]. Лабораторная диагностика респираторных вирусов полагается в первую очередь на выявление либо самого вируса, либо иммунного ответа пациента на вирус. Хотя многие процедуры тестирования вирусов за последние годы были существенно упрощены, они остаются проблематичными при ограниченности ресурсов.

Наборы для быстрого выявления респираторных вирусов с помощью ИФА остаются первым источником тестирования в странах с ограниченными ресурсами. Хотя чувствительность и специфичность этих тестов имеет значительную вариабельность в зависимости от популяции, распространенности и длительности заболевания и возраста пациента, наборы для тестирования легко хранить и использовать, когда ресурсов мало. В 2005 г. ВОЗ разработала рекомендации по ИФА-тестированию гриппа при ограниченных ресурсах [36]. Они базируются на понимании местной эпидемиологии гриппа. Недавно проведенные в сельских районах Юго-Восточной Азии исследования показали, что при проведении быстрого ИФА-тестирования на вирус гриппа улучшается контроль и сокращается использование антибиотиков [37, 38]. Быстрый тест на RSV сейчас используется при ограниченных ресурсах; благодаря ему представление о RS-вирусной болезни в Африке расширяется [39, 40].

Иммунофлуоресцентная микроскопия остается первичным методом выявления большинства респираторных вирусных инфекций в микробиологических лабораториях. Чувствительность и специфичность прямого флуоресцентного анализа антител (ПФЛА — DFA) установлены и в целом довольно хорошие. Трудность постановки ПФЛА в условиях ограниченности ресурсов состоит в том, что требуется флуоресцентный микроскоп с надежным источником питания и подготовленный персонал для интерпретации результатов. Светодиодные источники света, заряжающиеся от аккумулятора, могут обеспечить 5 и более часов работы от одной зарядки — это внушает уверенность в более широком применении флуоресцентной микроскопии в будущем.

Другие методы выявления вирусов, такие как культуральные, амплификация нуклеиновых кислот и серологические пробы, создают значительные трудности в условиях ограниченности ресурсов.



Требования к поддержанию клеточных линий для культур препятствуют их использованию во многих микробиологических лабораториях. Хотя разрабатываются новые быстрые методики сложной ПЦР-диагностики для выявления более чем 20 респираторных вирусов, включая вирусы гриппа и H5N1, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS), используемые в настоящее время методы трудозатратные и требуют значительных технических ресурсов. Серологические тесты в лабораториях с ограниченными ресурсами могут быть полезными для количественной оценки ответа на вакцинацию [41]; иногда ими пользовались для подтверждения результатов быстрой ИФА [40, 42]. Рекомендации по быстрому тестированию респираторных вирусов приведены в табл. 12.3.

Таблица 12.3

**Рекомендации по использованию коммерческих диагностических тест-систем для респираторных вирусов**

	Клиническая пригодность	Стоимость	Простота использования	Общий балл/уровень
<b>Вирусы гриппа А и В</b>				
Быстрая ИФА	2	1	2	5 (I)
ПФЛА	2	1	1	4 (II)
НК-тест (включая высокопатогенные штаммы)	1	0	0	1 (III) <sup>a</sup>
<b>RSV</b>				
Быстрая ИФА	2	1	2	5 (I)
ПФЛА	2	1	1	4 (II)
НК-тест	1	0	0	2 (III)
<b>Парагрипп, аденовирус hMPV, и коронавирус SARS и др.</b>				
ПФЛА	1	1	1	3 (II)
НК-тест	1	0	0	1 (III)

<sup>a</sup> Тест важен для мониторинга эффективности вакцины и должен проводиться в справочных лабораториях; для полевых лабораторий не рекомендуется

## Вирус гриппа

Грипп продолжает оставаться важнейшей причиной заболеваемости и смертности в мире, хотя его влияние на регионы с ограниченными ресурсами до сих пор неясно. Диагностика гриппа стала ключевым фактором в борьбе с сезонными эпидемиями. Появление новых высокопатогенных штаммов, таких как H1N1, наряду с угрозой глобальной пандемии гриппа способствовало усилению контроля за респи-

раторными вирусами во всем мире. Благодаря таким программам, как Международная программа по возникающим инфекциям при Центрах контроля и профилактики заболеваний (CDC), были сделаны огромные усилия для улучшения тестирования респираторных вирусов. При участии национальных министерств здравоохранения эти программы помогли создать национальные центры гриппа, действующие как новейшие региональные референтные лаборатории. Проведенные в США многочисленные исследования показали снижение времени госпитализации, объема антибактериальной терапии, затрат на здравоохранение как прямой результат улучшения диагностики гриппа [43–45]. Несмотря на эти усилия, надежное выявление вируса гриппа в большинстве развивающихся стран остается недостаточным.

## ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫЕ ВИРУСЫ

### Вирусы, ассоциированные с гастроэнтеритом

Вирусы — причина большинства случаев гастроэнтерита у детей в развивающихся странах; ротавирусы, аденовирусы, норовирусы и астровирусы вносят главный вклад в заболеваемость и смертность [46, 47]. Согласно оценкам, один только ротавирус дает около полумиллиона смертей в странах с низким доходом [48]. Примечательно, что у 53% состоящих на учете пациентов в развивающихся регионах возбудителем инфекции оказывается энтеровирус [47, 49]. Быстрые методы диагностики доступны, и благодаря им можно отказаться от применения дорогих антибиотиков и контролировать эффективность вакцин.

Для выявления аденовирусных, ротавирусных и норовирусных антигенов в фекалиях были разработаны иммунохроматографические методы — это быстрый (*dipstick*) тест, дающий результат всего за пять минут. Сюда относятся методы латекс-гемагглютинации и иммунохроматографии. Их выбор зависит от цели исследования и доступного набора реактивов. В целом иммунохроматография работает лучше большинства проб на основе агглютинации латекса. Для сопутствующего тестирования на множественные патогены доступны комбинированные полоски.

Во многих исследованиях ротавирусов чувствительность была выше 90%, а специфичность приближалась к 100% по сравнению с быстрой иммуноферментной пробой или ПЦР-РВ [50–53]. В нескольких исследованиях изучалась пригодность быстрых тестов в регионах с ограниченными ресурсами, когда заявленные чувствительность и специфичность могут не соответствовать их фактической работе в полевых условиях [54]. Еще меньше опубликованных данных по быстрым антигенным пробам для аденовирусов. В одном исследовании чувствительность составляла 22%, а специфичность — 84% по сравнению с ПЦР [54].

## Вирусы гепатитов А и Е

В развивающихся странах с плохими санитарными условиями большинство детей заражаются вирусом гепатита А (HAV) к 5-летнему возрасту и переносят субклиническое течение инфекции. Лабораторная диагностика в регионах Африки, Юго-Восточной Азии и некоторых частях Южной Америки не считается необходимостью. В областях с улучшающейся гигиеной меньше людей подвергается контакту с вирусом, и поэтому вспышки менее вероятны [24]. Для подтверждения вспышек может быть полезна лабораторная диагностика с выявлением IgM-антител против HAV. Была разработана модификация ИФА для тестирования мочи на HAV с чувствительностью 22% и специфичностью 84% [55, 56].

Вирус гепатита Е (HEV) эндемичен в Западной и Северной Африке, Мексике, а также Юго-Восточной и Центральной Азии; он периодически вызывает вспышки. Важно провести диагностику инфекции HEV в зараженной воде или пище как для контроля, так и при вспышке в интересах здравоохранения. Был разработан и принят быстрый иммунохроматографический тест, результаты которого хорошо коррелируют с серологическими исследованиями на основе ИФА [57, 58].

## Вирус полиомиелита

В 1988 г. Всемирная ассамблея здравоохранения приняла решение искоренить полиомиелит. Сейчас мы приближаемся к достижению этой цели по мере того, как национальные министерства здравоохранения и мировые сети продолжают улучшать практику иммунизации и отчетности о заболевании [59]. К сожалению, тестирование полиовируса не достигло таких успехов. Централизованные лаборатории, участвующие в программе надзора за полиовирусом, продолжают полагаться на выделение вирусов из фекалий и подтверждение с помощью ПЦР, но изоляция и идентификация дикого или вакцинного вируса занимает 21 сут. [60]. Обзор рекомендаций по тестированию желудочно-кишечных вирусов см. в табл. 12.4.

## ВИРУСЫ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

### Вирус простого герпеса

Распространенность, по данным серологических исследований, вируса простого герпеса (HSV), особенно HSV-2, во многих развивающихся странах достигает высокого уровня: 87% — у ВИЧ-положительных беременных женщин в Кении [61], 15% — у школьников до 8 лет в Танзании [62] и 64% — у населения прибрежной зоны Кении [63]. Важное значение HSV подчеркивается в ряде сообщений о его связи с повышенной вероятностью заражения ВИЧ. При ограниченности ресурсов диагноз генитально-язвенной болезни основывается преиму-

Таблица 12.4

**Рекомендации по использованию коммерческих  
диагностических проб для желудочно-кишечных вирусов**

	Клиниче- ская при- годность	Стои- мость	Простота работы	Общий балл/ уровень
<b>Аденовирус 40/41, норовирус</b>				
Быстрый набор	0	1	2	3 (II)
НК-тест	0	0	0	0 (III)
<b>Ротавирус</b>				
Быстрый набор	1	1	2	4 (II) <sup>a</sup>
НК-тест	2	0	0	2 (III) <sup>a</sup>
<b>HAV, HEV</b>				
Быстрый набор ИФА (HEV)	1	1	2	4 (II) <sup>b</sup>
Серология (ИФА)	1	1	1	3 (II) <sup>b</sup>
<b>Полиовирус</b>				
Серология (нейтрализация)	1	0	0	1 (III) <sup>a</sup>
Культуральный метод	2	0	0	2 (III) <sup>a</sup>
НК-тест	2	0	0	2 (III) <sup>a</sup>
<sup>a</sup> Тест полезен для определения эффективности вакцин. <sup>b</sup> Тест полезен в случае вспышек и для санэпиднадзора. <sup>c</sup> Тест важен для мониторинга эффективности вакцин и должен проводиться в справочных лабораториях; для полевых лабораторий не рекомендуется				

цественно на клинических данных без лабораторного подтверждения. Такие наиболее распространенные патогены, как HSV, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, бывает трудно клинически дифференцировать, поэтому диагностика синдромов остается ненадежной [64–66]. Однако в ожидании лабораторного диагноза откладывается лечение и увеличиваются затраты. Поэтому симптоматическое лечение при генитально-язвенной болезни [11, 66] рекомендовано ВОЗ для условий ограниченности ресурсов, даже при доступности хорошо оснащенных лабораторий [12].

Когда нужно лабораторное подтверждение диагноза (например, персистенция генитально-язвенной болезни, несмотря на адекватную терапию или кожные поражения у новорожденного), быстро и недорого можно поставить диагноз по мазку Цанка. С его помощью, однако, нельзя дифференцировать цитопатическое действие HSV и VZV. Если доступно оборудование, метод ПФЛА является высокочувствительным при ранних поражениях и высокоспецифичным по сравнению с выделением вируса в культуру [67, 68]. Серология также может быть полезной в диагностике, но как и в случае латентных вирусов, интерпретация затруднена, пока не будет проведено тестирование на IgM или серологическое исследование парных сывороток.

## Вирус варицелла зостер

Герпес зостер, или опоясывающий лишай, легко диагностируется клинически. Вирус варицелла зостер (VZV) обычно дает более тяжелое течение у ВИЧ-положительных, может вызывать атипичные хронические поражения кожи [69, 70]. В случаях необычных клинических проявлений диагноз можно подтвердить с помощью мазка Цанка или ПФЛА (если доступно оборудование). Чувствительность ПФЛА выше, чем у культурального метода [71].

## ОНКОГЕННЫЕ ВИРУСЫ

### Вирус Эпштейна—Барр

Большинство людей в развивающихся странах инфицируются вирусом Эпштейна—Барр (EBV) в раннем детстве. Первичный клинический диагноз — инфекционный мононуклеоз. В Северной Африке, Китае и Юго-Восточной Азии относительно высока заболеваемость назофарингеальной карциномой, вызываемой EBV. Хотя гистопатология дает четкий диагноз, его подкрепляет иммунофлуоресцентный анализ антител или ИФА [72]. Помимо IgG, использовались IgA-антитела против антигена вирусного капсида, ядерного антигена Эпштейна—Барр и раннего антигена. Скрининговые исследования в областях с высоким преобладанием назофарингеальной карциномы можно упростить при сборе образцов крови пациентов на фильтровальной бумаге [73]. В условиях эпидемии ВИЧ EBV стал важной причиной заболеваемости и смертности. Лабораторное определение вирусной нагрузки обычно проводится центральными лабораториями.

### Вирус папилломы человека

Рак шейки матки, вызванный вирусом папилломы человека (HPV), стоит вторым в ряду причин смерти от рака во всем мире, и 80% новых случаев приходится на развивающиеся страны. Его значение в развитых странах повышается благодаря сопутствующей ВИЧ-инфекции и высокому уровню заболеваемости раком шейки матки [74, 75]. Скринингу на рак шейки матки в странах с низкими доходами мешает отсутствие адекватной инфраструктуры здравоохранения и образованности населения. Диагностика, где это возможно, основывается на кольпоскопии с обработкой шейки матки уксусной кислотой. Такой метод хоть и эффективен в плане затрат, является относительно грубым и нечувствительным по сравнению с окрашенными по Папаниколау мазками клеток шейки матки и молекулярным тестированием HPV [12]. Не ослабевают усилия по обеспечению областей с ограниченными ресурсами тест-системами на HPV с минимальной технической экспертизой и не требующими специального оборудования, такими как *careHPV* (QIAGEN GmbH, созданная в пар-

тверстве с PATH ([www.path.org](http://www.path.org)). Наряду с усилиями по вакцинации против HPV, эти новые стратегии могут обеспечить прорыв в снижении смертности от рака шейки матки во всем мире.

## **ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА: КОРЬ, ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПАРОТИТ И КРАСНУХА**

Детские болезни, которые можно предотвратить вакцинацией, остаются важным источником заболеваемости и смертности во всем мире. Кампании по искоренению детских болезней, проводимые ВОЗ, Детским фондом ООН (ЮНИСЕФ) и национальными министерствами здравоохранения, привели к значительному повышению вакцинации детей во всем мире. Исследователям сложно отслеживать прогресс этих программ, если ресурсы лабораторной диагностики ограничены.

Учитывая высокопатогенную природу вируса кори, в 2000 г. ВОЗ создала Глобальную сеть коревых лабораторий для искоренения этой болезни [76]. Были разработаны стандартные процедуры тестирования, и они эффективно реализуются в большинстве стран. Подтверждение случая кори опирается на выявление специфичных IgM в единственном образце крови, полученном при первом визите в учреждение здравоохранения в течение 28 сут. с момента возникновения сыпи [77]. Обычно это тест довольно быстро и просто проводится в централизованной лаборатории с использованием тест-системы ИФА IgM. Выявление вируса кори с помощью специфических антигенов или амплификации нуклеиновых кислот практически не используется как диагностический инструмент. Это связано с относительно коротким периодом коревой виремии после возникновения сыпи и техническими трудностями для лабораторий с ограниченными ресурсами [76]. Тем не менее по возможности проводится культивирование и секвенирование вируса в референтных лабораториях, чтобы помочь исследователям выявить источник и пути передачи вируса [78].

Тестирование на паротит по-прежнему проблематично даже в референтных лабораториях. Согласно инструкции ВОЗ, требуется выявление специфических IgM с помощью ИФА, четырехкратного увеличения титров IgG или идентификация вируса выявлением антигена или же амплификацией нуклеиновой кислоты [79]. К сожалению, тест-системы на IgM дают перекрестную реакцию с другими вирусами [80, 81]. Подтвердить диагноз можно с помощью культурального метода в централизованных лабораториях. Исследований, касающихся вируса эпидемического паротита в условиях ограниченных ресурсов, мало.

Определение клинического случая кори по инструкции ВОЗ охватывает и случаи краснухи. Подтверждение случаев краснухи аналогично кори. Разработаны стандартные протоколы ИФА IgM — для предотвращения ложноположительных отчетов о случаях кори [77]. Вирусная культура, выявление антигена и нуклеиновой кислоты — по-прежнему более сложные процедуры, но могут быть полезны при

определении эпидемиологии вспышки. Подтверждающее тестирование проводится в референтных лабораториях, а в условиях ограниченных ресурсов клиническая диагностика остается основной.

## **ВИРУСЫ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ ЧЛЕНИСТОНОГИМИ**

Вирусы, переносимые членистоногими, важно диагностировать в целях надзора и определения вспышек. Быстрое тестирование для большинства этих вирусов недоступно. ВОЗ поддерживает сеть лабораторий по контролю желтой лихорадки и японского энцефалита — заболеваний, предотвращаемых вакцинацией. Образцы из локальных лабораторий можно отправить в референтную лабораторию для серологического тестирования на антитела к этим патогенам (предпочтителен ИФА IgM). На желтую лихорадку следует тестировать образцы сыворотки, на японский энцефалит — образцы СМЖ.

Наиболее полно проведена оценка быстрого набора для выявления вируса денге — иммунохроматографические тест-полоски PanBio (Брисбан, Австралия) для выявления антител к вирусу денге в сыворотке [82–85]. Результаты, получаемые с использованием быстрых наборов для вируса денге, следует интерпретировать с осторожностью, поскольку полевое исследование показало, что эти пробы работают не так хорошо, как заявлено производителем: у некоторых наборов чувствительность была менее 20% [86]. Хотя для диагностики арбовирусов или возбудителей геморрагической лихорадки сейчас нет методов тестирования на месте оказания помощи, развиваются многообещающие быстрые платформы. Дальнейшую информацию о лабораторной диагностике читатель может получить в других главах.

## **ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ О ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ**

Лаборатории в развивающихся регионах наращивают свои диагностические возможности при участии международных агентств и других организаций. Тем не менее важно отметить трудности, с которыми сталкиваются эти лаборатории из-за нехватки ресурсов и инфраструктуры. Даже в самых простых лабораторных методах необходимо поддерживать хорошую лабораторную практику. Необходимыми мерами являются письменный стандарт проведения исследований, система сторонней оценки, соответствия и гарантии качества. Хотя эти меры могут быть обременительными для бедных лабораторий, они обеспечивают надежность результатов. Есть способы экономить ресурсы без ущерба качеству. Например, при отсутствии образцов для валидации возможно разделение образцов и обмен между ближайшими лабораториями. Персонал лаборатории должен иметь профессиональную подготовку. Ее можно ускорить, используя стандартные обучающие модули с современной программой.

Следует также уделить внимание организации ведения записей и регистрации отчетов, рабочего процесса и мерам биологической без-

опасности. В большинстве таких лабораторий редко ведется компьютерная регистрация, что затрудняет оценку результатов. Если анализ надо переправить в другую лабораторию, необходима надежная транспортная система как для самих образцов, так и для возврата результатов. К сожалению, надежная транспортировка образцов и поддержание их целостности часто выходят за рамки возможностей существующей инфраструктуры здравоохранения.

Исключительно полезными для лабораторий с ограниченными ресурсами являются дистанционные средства обучения. Это телеконференции, доступ к образовательным ресурсам в Интернете и передача снимков для дистанционной консультации (например, гистопатологических снимков или ПИФ). Образовательный процесс можно углубить благодаря обмену и презентациям между учреждениями. Партнерство в области образования с глобальными центрами, находящимися на том же континенте или за его пределами, играет важную роль в улучшении качества лабораторного тестирования и оказания технической помощи там, где ресурсов не хватает.

Существуют способы проведения кажущихся сложными тестов в областях с ограниченными ресурсами. Действующее от аккумулятора оборудование и светодиодные лампы позволяют часами работать при минимальном потреблении энергии. Высушенные пятна крови — гениальный способ транспортировки образцов в референтные лаборатории для молекулярного и серологического тестирования. Более того, продолжают совершенствоваться новые методики автоматического молекулярного тестирования, требующие меньшего объема ресурсов и экспертизы.

Рассматривая новые тесты, каждая отдельно взятая лаборатория должна определить приоритет исходя из эндемичности заболевания и возможности проведения теста. Зачастую у лаборатории нет курирующей организации. Набор для проведения теста должен выбираться персоналом самой лаборатории, поскольку политика здравоохранения, человеческие и финансовые ресурсы в разных регионах различаются. Следовательно, решение должно приниматься не только на основании опубликованных отчетов, заявлений производителя или рекомендаций международных организаций. Необходимо местная оценка набора, чтобы определить параметры его работы; немногие коммерческие наборы прошли испытания в сельской местности.

Бесценные ресурсы в сфере тестирования вирусов в развивающихся странах — ВОЗ и CDC.

Например, ВОЗ создала всемирную лабораторную сеть для поддержки лабораторной диагностики кори, краснухи, полиомиелита, желтой лихорадки и HPV. С помощью этой сети ВОЗ проводит работу по улучшению качества, профессиональности тестирования и подготовки персонала, лабораторного оборудования и обмена данными для глобального контроля и самодостаточности. Похожая сеть есть у CDC для гриппа и других респираторных вирусов.



## ВЫВОДЫ

Здесь мы кратко охарактеризовали различные опции для диагностики вирусного заболевания в периферических лабораториях развивающихся стран. Региональные референтные лаборатории и государственные организации, такие как местные министерства здравоохранения, следует рассматривать в качестве ресурса для подтверждающего тестирования различных возбудителей, важных для общественного здоровья. Они жизненно важны для проведения более сложных анализов, таких как амплификация нуклеиновых кислот и секвенирование. Обсуждаемые в данной главе пробы доступны в настоящее время, но по мере развития технологий быстрые тесты на основе нуклеиновых кислот и другие инновационные платформы для выявления вирусов станут более доступным для областей с ограниченными ресурсами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005; 352(1):39–47.
2. Berkley JA, Versteeg AC, Mwangi I, et al. Indicators of acute bacterial meningitis in children at a rural Kenyan district hospital. *Pediatrics* 2004; 114(6):e713–e719.
3. Evans JA, Adusei A, Timmann C, et al. High mortality of infant bacteraemia clinically indistinguishable from severe malaria. *QJM* 2004; 97(9):591–597.
4. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, et al. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* 2004; 329(7476):1212.
5. Petti CA, Polage CR, Quinn TC, et al. Laboratory medicine in Africa: A barrier to effective health care. *Clin Infect Dis* 2006; 42(3):377–382.
6. Guidelines for HIV Diagnosis and Monitoring of Antiretroviral Therapy, WHO Project: ICP BCT 001. World Health Organization; 2005. [http://apps.searo.who.int/PDS\\_DOCS/B3422.pdf](http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B3422.pdf).
7. Tegbaru B, Wolday D, Messele T, et al. Assessment of the implementation of HIV-rapid test kits at different levels of health institutions in Ethiopia. *Ethiop Med J* 2007; 45(3):293–299.
8. Berkelman R, Cassell G, Specter S, et al. The «Achilles heel» of global efforts to combat infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2006; 42(10):1503–1504.
9. Muula AS, Maseko FC. Medical laboratory services in Africa deserve more. *Clin Infect Dis* 2006; 42(10):1503.
10. Plate DK. Evaluation and implementation of rapid HIV tests: the experience in 11 African countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23(12):1491–1498.
11. Htun Y, Morse SA, Dangor Y, et al. Comparison of clinically directed, disease specific, and syndromic protocols for the management of genital ulcer disease in Lesotho. *Sex Transm Infect* 1998; 74 (suppl 1):S23–S28.
12. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Management of symptomatic STIs/RTIs. In: Sexually Transmitted and Other Reproductive Tract Infections — A guide to essential practice. Geneva: World Health Organization, 2005:109–113.

13. Swanson P, Soriano V, Devare SG, et al. Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3):862–870.
14. Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8):3860–3868.
15. Ayele W, Schuurman R, Messele T, et al. Use of dried spots of whole blood, plasma, and mother's milk collected on filter paper for measurement of human immunodeficiency virus type 1 burden. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3):891–896.
16. Fiscus SA, Cheng B, Crowe SM, et al. HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *PLoS Med* 2006; 3(10):e417.
17. Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: Measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):1888–1893.
18. Rouet F, Ekouevi DK, Chaix ML, et al. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6):2709–2717.
19. Stevens G, Rekhviashvili N, Scott LE, et al. Evaluation of two commercially available, inexpensive alternative assays used for assessing viral load in a cohort of human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients from South Africa. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):857–861.
20. Prado JG, Shintani A, Bofill M, et al. Lack of longitudinal inpatient correlation between p24 antigenemia and levels of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in patients with chronic hiv infection during structured treatment interruptions. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4):1620–1625.
21. Patton JC, Sherman GG, Coovadia AH, et al. Ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay modified for use on dried whole-blood spots as a reliable, affordable test for infant diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(1):152–155.
22. World Health Organization. Report of the WHO Technical Reference Group, Paediatric HIV/ART Care Guideline Group Meeting. Geneva: World Health Organization, 2008.
23. Creek TL, Sherman GG, Nkengasong J, et al. Infant human immunodeficiency virus diagnosis in resource-limited settings: issues, technologies, and country experiences. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197 (suppl 3):S64 — S71.
24. Bojuwoye BJ. The burden of viral hepatitis in Africa. *West Afr J Med* 1998; 16(4):198–203.
25. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118(12):3030–3044.
26. World Health Organization. Hepatitis B Surface Antigen Assays: Operational Characteristics (Phase 1) Report 1. Geneva: World Health Organization, 2001.
27. World Health Organization. Hepatitis B Surface Antigen Assays: Operational Characteristics (Phase 1) Report 2. Geneva: World Health Organization, 2004.

28. Lau DT, Ma H, Lemon SM, et al. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. *J Viral Hepat* 2003; 10(4):331–334.
29. Randrianirina F, Carod JF, Ratsima E, et al. Evaluation of the performance of four rapid tests for detection of hepatitis B surface antigen in Antananarivo, Madagascar. *J Virol Methods* 2008; 151(2): 294–297.
30. World Health Organization. Hepatitis C Assays: Operational Characteristics (Phase I) Report 1. Geneva: World Health Organization, 2001.
31. World Health Organization. Hepatitis C Assays: Operational Characteristics (Phase I) Report 2. Geneva: World Health Organization, 2001.
32. Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3(10 suppl 2):S97–S101.
33. Owusu-Ofori S, Temple J, Sarkodie F, et al. Predonation screening of blood donors with rapid tests: Implementation and efficacy of a novel approach to blood safety in resource-poor settings. *Transfusion* 2005; 45(2):133–140.
34. Peltola V, Reunanen T, Ziegler T, et al. Accuracy of clinical diagnosis of influenza in outpatient children. *Clin Infect Dis* 2005; 41(8):1198–1200.
35. Pachucki CT. Rapid Tests for Influenza. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7(3):187–192.
36. World Health Organization. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Geneva: World Health Organization, 2005. [http://www.who.int/influenza/resources/documents/rapid\\_testing/en/](http://www.who.int/influenza/resources/documents/rapid_testing/en/).
37. Bhavnani D, Phatinawin L, Chantra S, et al. The influence of rapid influenza diagnostic testing on antibiotic prescribing patterns in rural Thailand. *Int J Infect Dis* 2007; 11(4):355–359.
38. Simmerman JM, Chittaganpitch M, Erdman D, et al. Field performance and new uses of rapid influenza testing in Thailand. *Int J Infect Dis* 2007; 11(2):166–171.
39. Nokes DJ, Okiro EA, Ngama M, et al. Respiratory syncytial virus infection and disease in infants and young children observed from birth in Kilifi District, Kenya. *Clin Infect Dis* 2008; 46(1):50–57.
40. Poulsen A, Stensballe LG, Nielsen J, et al. Long-term consequences of respiratory syncytial virus acute lower respiratory tract infection in early childhood in Guinea-bissau. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(11):1025–1031.
41. Prince HE, Leber AL. Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3):481–482.
42. Okiro EA, Sande C, Mutunga M, et al. Identifying infections with respiratory syncytial virus by using specific immunoglobulin G (IgG) and IgA enzyme-linked immunosorbent assays with oral-fluid samples. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5):1659–1662.
43. Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, et al. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: Results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics* 2003; 112(2):363–367.
44. Benito-Fernandez J, Vazquez-Ronco MA, Morteruel-Aizkuren E, et al. Impact of rapid viral testing for influenza A and B viruses on management of febrile infants without signs of focal infection. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(12):1153–1157.
45. Barenfanger J, Drake C, Leon N, et al. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):2824–2828.

46. Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4):1349–1355.
47. Reither K, Ignatius R, Weitzel T, et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis* 2007; 7(104):104.
48. Miller MA, McCann L. Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. *Health Econ* 2000; 9(1):19–35.
49. Mertens TE, Wijenayake R, Pinto MR, et al. Microbiological agents associated with childhood diarrhoea in the dry zone of Sri Lanka. *Trop Med Parasitol* 1990; 41(1):115–120.
50. Bon F, Kaplon J, Metzger MH, et al. [Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens]. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55(3–4):149–153.
51. Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, et al. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(10):741–743.
52. Dennehy PH, Hartin M, Nelson SM, et al. Evaluation of the ImmunoCard-STAT! rotavirus assay for detection of group A rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1977–1979.
53. Gilchrist MJ, Bretl TS, Moultney K, et al. Comparison of seven kits for detection of rotavirus in fecal specimens with a sensitive, specific enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 8(4):221–228.
54. Weitzel T, Reither K, Mockenhaupt FP, et al. Field evaluation of a rotavirus and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples from children with acute diarrhea in Ghana. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2695–2697.
55. Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, et al. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis a. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(4):840–845.
56. Rodriguez Lay Lde L, Larralde Diaz O, Martinez Casanueva R, et al. Anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3):492–494.
57. Myint KS, Guan M, Chen HY, et al. Evaluation of a new rapid immunochromatographic assay for serodiagnosis of acute hepatitis E infection. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(5):942–946.
58. Chen HY, Lu Y, Howard T, et al. Comparison of a new immunochromatographic test to enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of immunoglobulin m antibodies to hepatitis e virus in human sera. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(5):593–598.
59. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Progress toward interruption of wild poliovirus transmission — worldwide, January 2007–April 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57(18):489–494.
60. World Health Organization. Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual: An alternative test algorithm for poliovirus isolation and characterization. Geneva: World Health Organization, 2007. <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/05/NewAlgorithmForPoliovirusIsolationSupplement1.pdf>.
61. Drake AL, John-Stewart GC, Wald A, et al. Herpes simplex virus type 2 and risk of intrapartum human immunodeficiency virus transmission. *Obstet Gynecol* 2007; 109(2 Pt 1):403–409.

62. Kasubi MJ, Nilsen A, Marsden HS, et al. Prevalence of antibodies against herpes simplex virus types 1 and 2 in children and young people in an urban region in Tanzania. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2801-2807.
63. O Ng'ayo M, Bukusi E, A Morrow R, et al. Sexual and demographic determinants for herpes simplex virus type 2 among fishermen along Lake Victoria, Kenya. *Sex Transm Infect* 2008; 84(2):140-142.
64. Beyrer C, Jitwatcharanan K, Natpratan C, et al. Molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in a sexually transmitted disease clinic population in northern Thailand: Predominance of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 1998; 178(1):243-246.
65. Ndinya-Achola JO, Kihara AN, Fisher LD, et al. Presumptive specific clinical diagnosis of genital ulcer disease (GUD) in a primary health care setting in Nairobi. *Int J STD AIDS* 1996; 7(3):201-205.
66. Behets FM, Andriamiadana J, Randrianasolo D, et al. Chancroid, primary syphilis, genital herpes, and lymphogranuloma venereum in Antananarivo, Madagascar. *J Infect Dis* 1999; 180(4):1382-1385.
67. Moseley RC, Corey L, Benjamin D, et al. Comparison of viral isolation, direct immunofluorescence, and indirect immunoperoxidase techniques for detection of genital herpes simplex virus infection. *J Clin Microbiol* 1981; 13(5):913-918.
68. Reina J, Saurina J, Fernandez-Baca V, et al. Evaluation of a direct immunofluorescence cytospin assay for the detection of herpes simplex virus in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(11):851-854.
69. Glesby MJ, Moore RD, Chaisson RE. Clinical spectrum of herpes zoster in adults infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21(2):370-375.
70. Tyndall MW, Nasio J, Agoki E, et al. Herpes zoster as the initial presentation of human immunodeficiency virus type 1 infection in Kenya. *Clin Infect Dis* 1995; 21(4):1035-1037.
71. Dahl H, Marcoccia J, Linde A. Antigen detection: The method of choice in comparison with virus isolation and serology for laboratory diagnosis of herpes zoster in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2):347-349.
72. Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: Options for field screening. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4):1459-1467.
73. Fachiroh J, Prasetyanti PR, Paramita DK, et al. Dried-blood sampling for Epstein-Barr virus immunoglobulin G (IgG) and IgA serology in nasopharyngeal carcinoma screening. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4):1374-1380.
74. Hawes SE, Critchlow CW, Faye Niang MA, et al. Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections. *J Infect Dis* 2003; 188(4):555-563.
75. Hawes SE, Critchlow CW, Sow PS, et al. Incident high-grade squamous intraepithelial lesions in Senegalese women with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(2):100-109.
76. Featherstone D, Brown D, Sanders R. Development of the Global Measles Laboratory Network. *J Infect Dis* 2003; 187 (suppl 1):S264-S269.

77. World Health Organization, Department of Immunization, Vaccines, and Biologicals. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. In: World Health Organization, ed. Expanded Programme on Immunization (EPI) team of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2nd ed. World Health Organization, 2007.
78. Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec* 1998; 73(35):265–269.
79. Global status of mumps immunization and surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* 2005; 80(48):418–424.
80. Tsurudome M, Yamada A, Hishiyama M, et al. Monoclonal antibodies against the nucleoprotein of mumps virus: their binding characteristics and cross-reactivity with other paramyxoviruses. *Acta Virol* 1990; 34(3):220–227.
81. Harmsen T, Jongerius MC, van der Zwan CW, et al. Comparison of a neutralization enzyme immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immune status of children vaccinated for mumps. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8):2139–2144.
82. Wu SJ, Paxton H, Hanson B, et al. Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(1):106–110.
83. Blacksell SD, Newton PN, Bell D, et al. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. *Clin Infect Dis* 2006; 42(8):1127–1134.
84. Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanaroj S, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1):234–238.
85. Palmer CJ, King SD, Cuadrado RR, et al. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio Rapid Immunochromatographic Test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5):1600–1601.
86. Blacksell SD, Bell D, Kelley J, et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(11):1458–1464.



**Б. Ра, Д. Кимберлин, Р. Уитли**

Brian Rha, David Kimberlin, and Richard Whitley, Department of Pediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Последние достижения противовирусной терапии сделали быструю и точную диагностику вирусных инфекций очень важной для оптимальной помощи пациенту. Появление множества противовирусных средств за последние 30 лет произвело революцию в терапии. Первые противовирусные средства были одобрены к применению в США в 1960-х гг. Появление ацикловира в 1980-х гг. привело к быстрому развитию новых противовирусных лекарств. В настоящее время в список лицензированных противовирусных препаратов входят средства против вирусов герпеса (вирус простого герпеса (HSV), вирус варицелла зостер (VZV) и цитомегаловирус (CMV), респираторных вирусов (вирусы гриппа А и В и респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирусов гепатита В и С, вирусов папилломы человека (HPV) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Разработка новых противовирусных средств остается областью активно проводимых исследований.

Как и большинство первых лекарств, первые соединения с противовирусной активностью были обнаружены случайно. Среди них — ранние аналоги нуклеозидов, изначально созданные как метка репликации ДНК быстро делящихся опухолевых клеток в составе противораковой терапии, но в дальнейшем стала основой противовирусной терапии [1, 2]. Дальнейшие успехи молекулярной биологии способствовали прицельному развитию противовирусных средств. А именно знание каждого этапа репликации вирусов привело к созданию соединений, нацеленных на определенные этапы жизненного цикла вирусов. Лицензированные средства терапии можно разделить на категории в зависимости от механизма их действия: предотвращающие проникновение вируса в клетки хозяина, ингибирующие транскрипцию или репликацию вирусного генома, мешающие синтезу вирусных белков, изменяющие слияние клеток или нарушающие сборку вирусов и их выход.

Одной из главных трудностей в развитии лекарств было создание специфичного препарата, нетоксичного для нормальных клеток хозяина. Поскольку для репликации вирусов используется клеточный аппарат клетки-хозяина, сначала считалось, что любое вмешательство в репликацию вируса неизбежно убьет клетки хозяина. Однако стратегия прицельного воздействия на ферменты, присущие только вирусам, помогла создать несколько безопасных и эффективных ви-

дов терапии. Противовирусные препараты назначают для лечения активного вирусного заболевания, профилактики (неинфицированных лиц в группе риска) и лечения инфицированных, но бессимптомных пациентов.

Несмотря на эти успехи, токсичность для клеток остается важным препятствием, а побочные эффекты ограничивают успешное применением многих противовирусных средств. Кроме того, широкое использование противовирусных средств привело к появлению резистентных штаммов, что еще больше ограничивает эффективность терапии; лучшая иллюстрация — быстрая эволюция ВИЧ-терапии. Хотя разрушительные последствия нелеченного заболевания позволяют повысить порог допустимых побочных эффектов, часто лекарство принимается неправильно из-за плохой переносимости, что в свою очередь вызывает появление новых резистентных штаммов. В данной главе будут рассмотрены имеющиеся в настоящее время средства терапии вирусных инфекций.

## ТЕРАПИЯ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

### Грипп

Существуют три вируса гриппа (А, В и С), они входят в семейство ортомиксовирусов. Геном этих вирусов состоит из сегментированной «-»-цепи РНК с оболочкой, происходящей из клетки-хозяина; имеются характерные поверхностные гликопротеины, участвующие в проникновении и выходе из клетки-хозяина. Грипп обычно вызывает нетяжелую инфекцию, не требующую терапии. Вирусы гриппа А и В могут вызывать сезонные эпидемии со значительной заболеваемостью и смертностью. Вирус гриппа А может изредка вызывать пандемии.

Хотя вакцинация против вируса гриппа является более эффективной мерой по снижению заболеваемости [3], для профилактики и лечения полезны специфические противовирусные средства. Современная терапия нацелена на два специфических вирусных белка: белок матрикса 2 (М2 — ионный канал в вирусной мембране вируса гриппа А) и нейраминидазу (поверхностный гликопротеин, общий для вирусов гриппа А и В).

### Амантадин, римантадин: адамантаны

Амантадин и римантадин — структурно родственные трициклические амины, связывающиеся с белком М2 в нуклеокапсидной мембране вируса гриппа А. Этот белок — ионный канал, по которому протоны проходят через мембрану, в результате закисляя цитоплазму. Снижение рН приводит к «раздеванию» вируса; эта стадия необходима для инициации вирусной репликации [4]. Ингибиторы М2 блокируют стадию закисления, тем самым предотвращая репликацию.



Амантадин и римантадин полезны для лечения и профилактики гриппа А. При лечении на 1 день уменьшается продолжительность болезни, если прием препарата начат на 1–2 сут. появления симптомов [5, 6]. Профилактический прием назначают лицам с высоким риском, не переносящим вакцину против гриппа либо из-за аллергической реакции, либо из-за нарушений иммунитета, а также в течение двух недель после вакцинации, если вирус уже циркулирует среди населения [7].

Оба лекарства даются орально. Амантадин не метаболизируется и выводится почками преимущественно в неизменном виде; римантадин до почечного клиренса метаболизируется печенью. Поэтому необходимо снижать дозу амантадина у пациентов с почечной недостаточностью, а пациентам с печеночной недостаточностью дозу надо подбирать.

Побочные эффекты у обоих препаратов одинаковы, обычно менее тяжелые у римантадина. Чаще всего они включают желудочно-кишечное расстройство (в том числе тошноту и рвоту) и симптомы со стороны ЦНС (тревожность, депрессия, спутанность сознания, бессонница и невозможность сосредоточиться) [8].

Главная проблема применения адамантанов — повышение резистентности вирусов к этим лекарствам. Резистентность возникает в результате точечной мутации вирусной РНК (сайт кодирования трансмембранного домена белка М2) обычно на 2–3 сут. приема препарата [9]. К 5-му дню лечения резистентные штаммы появляются почти у трети пациентов [10]. Хотя пролеченная инфекция разрешается, несмотря на возникновение резистентных штаммов, передача при домашних контактах делает профилактику неэффективной [9]. Данные контроля за штаммами гриппа в США с 2005 по 2006 г. показали, что более чем у 90% возникла резистентность к адамантанам [11].

### **Занамивир, озелтамивир: ингибиторы нейраминидазы**

Занамивир и озелтамивир — структурно идентичные препараты, конкурентно связывающие нейраминидазу (поверхностный гликопротеин, общий для гриппов А и В). Нейраминидаза необходима для выхода и распространения собранного вируса, поэтому этот фермент является привлекательной мишенью для ингибирования вирусной репликации. Нейраминидаза способствует выходу новых вирусных частиц из клетки-хозяина за счет отщепления конечной сиаловой кислоты от гликопротеинов на клеточной поверхности. Она также способствует проникновению вируса сквозь слизистую — и вирус распространяется по дыхательным путям. Занамивир — синтетический конкурентный ингибитор, а озелтамивир — этиловый эфир предшественника, превращающийся в активную форму эстеразами печени. Другое синтетическое соединение, перамивир, еще одно перспективное лекарство, проходящее сейчас клинические испытания.

Было показано, что занамивир и озелтамивир эффективны для профилактики и лечения гриппов А и В. Профилактика занамивиром или озелтамивиром снижает уровень инфекции соответственно до 79% и 75–85% [12–18]. Лечение занамивиром в течение двух дней с момента появления симптомов уменьшает тяжесть заболевания и укорачивает его продолжительность в среднем на 1 сут [19]. Аналогично лечение озелтамивиром, начатое в течение 1–2 сут. с момента возникновения заболевания, смягчает симптомы и укорачивает продолжительность на 1–1,5 сут. [15, 20, 21]. Ретроспективная оценка баз данных показала, что у пациентов, получавших озелтамивир, уровни госпитализации и респираторных осложнений были ниже [22].

Занамивир вводится ингаляционно из-за его низкой биодоступности при оральном приеме. Количество лекарства, достигающее дыхательных путей и слизистой легких, достаточно для ингибирования вирусной репликации [22]. Занамивир в целом хорошо переносится, но у некоторых пациентов при лечении усиливается боль при кашле [23, 24]. Биодоступность составляет приблизительно 15% [22]. Несмотря на то что лекарство выводится почками, необходимость подбора дозы возникает редко. Побочные эффекты встречаются редко, обычно это тошнота и рвота [25]. Отмечены редкие случаи делирия и аномального поведения у принимавших озелтамивир детей — преимущественно в Японии [26]. Но благодаря прекрасной биодоступности при минимальном профиле побочных эффектов и с учетом распространившейся резистентности к адамантанам озелтамивир стал самым широко используемым лекарством для лечения гриппа.

Резистентность вирусов к занамивиру встречается редко, однако распространенная резистентность штамма вируса гриппа H1N1 к озелтамивиру выявлена по всему миру (на март 2008 г. в США она составляла 7%). Более свежие данные показывают, что все штаммы H1N1 в США в сезон 2008–2009 гг. резистентны к озелтамивиру [28]. Точечные мутации в геноме (N274Y) изменяют активный сайт нейраминидазы и блокируют связывание лекарства [27].

### Респираторно-синцитиальный вирус

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) — несегментированный вирус с одной «-»-цепью РНК, входит в семейство парамиксовирид. RSV — главная причина респираторных инфекций нижних дыхательных путей у детей, он является причиной высокой заболеваемости и смертности у пациентов с нарушениями иммунитета.

### Рибавирин

Рибавирин — синтетический аналог нуклеозида гуанозина, который ингибирует репликацию вирусной РНК, вмешиваясь в синтез мРНК [29]. Рибавирин активен в отношении широкого спектра вирусов, включая вирусы гриппа А и В, хантавирусы, герпесвирусы, вирусы кори и лихорадки Ласса. Более высокая активность проявляется в отноше-

нии РНК-вирусов. Исторически RSV-инфекции лечили ингаляцией рибавирина. Сейчас рибавирин не используется, поскольку не изменяет такие показатели, как продолжительность госпитализации и оксигенации [30–32]. Его вводят внутривенно при лихорадке Ласса, а при гепатите С дают орально наряду с пегилированным  $\alpha$ -интерфероном. Роль рибавирина в лечении гепатита С будет обсуждаться далее.

Рибавирин можно вводить аэрозольно, орально и внутривенно. При ингаляции терапевтические концентрации достигаются в слизистой дыхательных путей, и лишь небольшие количества всасываются системно. Биодоступность рибавирина при оральном приеме составляет около 40% [33], а при внутривенном введении пиковые концентрации приблизительно в 10 раз выше. Менее трети системно введенного лекарства выводится с мочой в неизменном виде, еще треть выводится в виде метаболитов [33].

Побочные эффекты аэрозольной формы включают слабый конъюнктивит, сыпь и бронхоспазм. Рибавирин обладает мутагенными и тератогенными свойствами, поэтому применять надо с осторожностью. Системное введение связано с обратимой анемией [33]. Не наблюдалось резистентности RSV к рибавирину.

## ТЕРАПИЯ ВИРУСНОГО ГЕРПЕСА

Вирусы герпеса вызывают разнообразную патологию. К счастью, за последние 30 лет появилось несколько безопасных и эффективных лекарств. Группа вирусов герпеса человека представлена восемью крупными оболочными вирусами с двуцепочным ДНК-геномом. Эффективная терапия направлена против HSV-1, HSV-2, CMV и VZV. До сих пор не существует эффективных средств против вируса Эпштейна—Барр (EBV) и человеческих герпесвирусов 6, 7 и 8.

### Ацикловир, валацикловир

Ацикловир — синтетический аналог дезоксигуанозина, предотвращающий репликацию вируса, конкурентно ингибируя вирусную ДНК-полимеразу. Его активная форма, ацикловира трифосфат, — специфический субстрат для сайта связывания полимеразы, функционирует как конкурентный ингибитор ДНК-полимеразы и терминатор цепи. Терапевтическое преимущество ацикловира — специфичность его действия на инфицированные вирусом клетки. Ацикловир предпочтительно захватывается инфицированными клетками и сначала фосфорилируется вирусным ферментом тимидинкиназой. Монофосфатная форма затем фосфорилируется ферментами клетки-хозяина до активной трифосфатной формы. Активная форма избирательно метит вирусную ДНК-полимеразу, а не полимеразы клетки-хозяина. В результате получается эффективная терапия с минимальной клеточной токсичностью.

Ацикловир применяется для лечения инфекций, вызванных HSV-1, HSV-2 и VZV, а также для профилактики и супрессивной терапии как пациентов с нормальным, так и с нарушенным иммунитетом. Аци-

ацикловир эффективно лечит угрожающие жизни инфекции, включая HSV-энцефалит, неонатальные HSV-инфекции и VZV-инфекции у лиц с заболеваниями иммунной системы. Он показан также для лечения системных HSV- и VZV-инфекций, а также для HSV-инфекций кожи и слизистых у пациентов с нарушенным иммунитетом [34]. Ацикловир также использовался для лечения первичных и рекуррентных генитальных HSV-инфекций [35]. Профилактическая или супрессивная терапия может использоваться у пациентов с рекуррентными генитальными инфекциями и для предотвращения реактивации герпеса на губах [35–41]. Его можно вводить HSV-позитивным пациентам после трансплантации, принимающим иммуносупрессивные препараты [39].

Ацикловир можно давать внутривенно, местно или орально (биодоступность менее 30%) [42]. Лекарство хорошо проникает в почки, легкие, печень, сердце и кожные поражения. Концентрация лекарства в спинномозговой жидкости составляет примерно половину от уровня в плазме крови [42]. Ацикловир первично выводится почками, поэтому пациентам с почечной недостаточностью необходимо подбирать дозу.

Показано, что ацикловир является безопасным лекарством с минимальными по сравнению с другими противовирусными препаратами побочными эффектами. Оральная форма хорошо переносится, желудочно-кишечные нарушения минимальны. Попадание за пределы сосуда при внутривенном введении может вызвать тканевое воспаление и некроз. Стандартные курсы терапии не вызывали супрессию костного мозга у взрослых, хотя у получавших высокие дозы новорожденных наблюдалась нейтропения [43, 44]. Ацикловир обнаруживается в грудном молоке, проходит через плаценту, но связи с врожденными дефектами не выявлено. Наиболее серьезные побочные эффекты ацикловира — нефро- и нейротоксичность. Дисфункция почек обратима, протекает тяжелее при обезвоживании. Нейротоксичность также более выражена у обезвоженных пациентов; может проявляться в виде судорог, летаргии, галлюцинаций, делирия и экстрапирамидных расстройств. Они обычно проходят после отмены терапии.

Резистентные к ацикловиру HSV и VZV могут стать проблемой у пациентов с нарушениями иммунной системы, получающих длительную терапию [45]; уровень резистентности варьирует от 6 до 12% [46]. Изредка устойчивые штаммы HSV наблюдались у больных без нарушений иммунитета, включая пациентов с рекуррентными генитальными инфекциями, получающими длительную супрессивную терапию. Резистентность чаще всего обусловлена мутацией вирусного гена тимидинкиназы, реже — мутациями вирусного гена ДНК-полимеразы [47].

Слабая биодоступность оральной формы ацикловира привела к созданию валацикловира (это пролекарство — эфир L-валина). Валацикловир полностью превращается в ацикловир в ходе первого курса печеночного метаболизма, при этом биодоступность повышается до >50% [48]. Показания такие же, как для ацикловира, хотя его

не следует использовать при угрожающих жизни состояниях, когда требуется тщательный мониторинг концентрации в крови. Педиатрическая форма еще не лицензирована.

### Пенцикловир, фамцикловир

Как и ацикловир, пенцикловир является аналогом гуанозина, активным в отношении HSV-1, HSV-2 и VZV *in vitro*. Он также фосфорилируется вирусной тимидинкиназой и затем превращается в активную форму пенцикловира трифосфат. Однако механизм его действия отличается от ацикловира: будучи конкурентным ингибитором ДНК-полимеразы, он не вызывает терминацию цепи. Клиническое применение пенцикловира ограничивается герпесом на губах из-за его минимальной биодоступности. Фамцикловир — диацетиловый эфир пенцикловира, его биодоступность 70% [49]. Он показан для лечения инфекций герпеса зостер, а также генитального герпеса; его эффективность аналогична эффективности валацикловира. Он выводится почками, и у пациентов с почечной недостаточностью необходимо подбирать дозу. Фамцикловир хорошо переносится; наиболее типичные побочные реакции — головная боль и желудочно-кишечные нарушения. Профиль резистентности аналогичен ацикловиру: чаще всего встречается мутация тимидинкиназы [47].

Благодаря улучшенной фармакокинетики и фармакодинамике валацикловира и фамцикловира рекомендуются для терапии инфекций HSV и VZV.

### Ганцикловир, валганцикловир

Ганцикловир — синтетический аналог 2'-дезоксигуанозина, структурно аналогичен ацикловиру. Используется в основном для терапии CMV-инфекции. В зараженных CMV клетках вирусная фосфотрансфераза сначала фосфорилирует лекарство. Клеточные ферменты последовательно фосфорилируют монофосфатное производное до активной трифосфатной формы. Она также активна *in vitro* в отношении HSV и VZV — ингибирует вирусную ДНК-полимеразу с последующим завершением цепи.

Ганцикловир показан для лечения и предотвращения цитомегаловирусной болезни, которая чаще всего возникает у иммунокомпрометированных лиц. У пациентов с ВИЧ и после пересадки костного мозга или органов высока заболеваемость и смертность от CMV-ассоциированного ретинита и пневмонии; в этих условиях главным лекарством является ганцикловир или его предшественник валганцикловир. Ганцикловир используется также для лечения новорожденных с врожденной CMV-инфекцией; было показано, что у таких пациентов уменьшаются нарушения слуха [50]. Ганцикловир как профилактическое средство применяется у пациентов с трансплантатом, а превентивная терапия рутинно проводится сероположительным пациентам после трансплантации [51–54].

Ганцикловир доступен во внутривенной, глазной и оральной формах. Биодоступность оральной формы очень низкая — меньше 10% [55, 56]. Лекарство выводится почками, и у пациентов с почечной недостаточностью необходимо подбирать дозу.

Главные побочные эффекты ганцикловира — миелосупрессия и нейротоксичность. Гематотоксичность возникает почти у трети пациентов, чаще всего в виде нейтропении, тромбоцитопении, анемии. По этой причине необходимо контролировать формулу крови, чтобы уловить начало супрессии костного мозга. Прекращение приема устраняет цитопению. Побочные реакции со стороны ЦНС встречаются почти у 5% пациентов и включают головную боль, спутанность сознания, тревожность, галлюцинации, судороги и тремор [55]. Лихорадка, аномалии функции печени и сыпь встречаются реже.

Тяжелые побочные реакции ганцикловира заставляют отдать предпочтение валацикловиру или фамцикловиру, хотя эффективность лекарств одинакова. Резистентность к ганцикловиру чаще всего возникает у пациентов, получающих длительную терапию; чаще всего причиной является мутация гена UL87, кодирующего вирусную фосфотрансферазу. Реже встречается мутация гена UL54, кодирующего вирусную ДНК-полимеразу.

Валганцикловир — пролекарство (L-валиновый эфир) ганцикловира, быстро метаболизирующееся после орального приема. Его биодоступность увеличена до 60% и становится еще больше при приеме с пищей [57]. Показания и механизм резистентности такие же, как у ганцикловира; это хорошая альтернатива внутривенно вводимому ганцикловиру. Пациентам с почечной недостаточностью надо подбирать дозу. У некоторых пациентов возникают нейтропения, анемия и головная боль, но наиболее распространенные побочные эффекты — тошнота и диарея [58].

## Цидофовир

Цидофовир — синтетический нециклический нуклеотид цитозин, активный в отношении многих ДНК- и РНК-вирусов. Основное показание — лечение CMV-ретинита у пациентов со СПИДом. Как и нуклеозидные аналоги, цидофовир конкурентно ингибирует вирусную ДНК-полимеразу. Необходимости в начальном фосфорилировании вирусным ферментом нет, поскольку соединение уже имеет монофосфатную группу. Ферменты клетки-хозяина фосфорилируют лекарство, и оно превращается в активную форму. Цидофовир имеет в 25–50 раз большую аффинность к вирусной ДНК-полимеразе по сравнению с клеточным ферментом.

Помимо применения при СПИД-ассоциированном CMV-кератите, цидофовир имеет широкий спектр активности, его можно использовать против резистентных к ацикловиру и ганцикловиру штаммов HSV и CMV соответственно. Проведена оценка других его потенциальных клинических возможностей. Местно цидофовир применялся при

рефрактерных HSV-поражениях у пациента со СПИДом [59]. Отчеты о случаях заболеваний позволяют считать препарат предпочтительным при лечении ВК-вирусного нефрита у пациентов с пересаженной почкой [60, 61]. Цидофовир использовался для лечения прогрессирующей мультиочаговой лейкоэнцефалопатии, вызванной вирусом JC у пациентов со СПИДом, но оказался неэффективным [62, 63]. Сообщалось о его активности в отношении вируса коревой оспы, аденовируса, HBV, HPV и EBV. ЛАНЬ

Цидофовир вводится внутривенно из-за низкой биодоступности. Можно проводить еженедельный мониторинг дозы, поскольку у него большой период полураспада. Примерно 90% лекарства выводится почками, поэтому у пациентов с почечной недостаточностью необходима коррекция дозы [64].

Несмотря на широкий спектр активности, клиническое применение цидофовира ограничено его потенциально большой нефротоксичностью. Агрессивная внутривенная гидратация, совместное введение пробенецида и отказ от других нефротоксичных лекарств сводит риск к минимуму, и тем не менее необходимость в отмене возникает у 25% пациентов. Другие побочные эффекты включают нейтропению, лихорадку, миалгию, тошноту, выпадение волос. Нефротоксичность существенно снижает возможность применения этого препарата.

Обычно проблем с резистентностью не возникает, хотя и были изолированы резистентные к цидофовиру штаммы (результат мутации в гене вирусной ДНК-полимеразы) [65, 66].

## Фоскарнет

Фоскарнет — аналог пирофосфата и единственный противогерпетический препарат, не являющийся аналогом нуклеотида или нуклеозида. Он активен против всех вирусов герпеса и непосредственно ингибирует вирусную ДНК-полимеразу, блокируя сайт связывания с пирофосфатом [67] и прекращая удлинение цепи.

Фоскарнет не требует фосфорилирования вирусными или клеточными киназами. Показан для лечения CMV-ретинита, эффективен при лечении инфекций, вызванных резистентными к другим противовирусным препаратам штаммами HSV, VZV и CMV [68–70], что представляет большую проблему для пациентов с нарушенным иммунитетом. Фоскарнет также обладает активностью против вируса гриппа А и ретровирусов, включая ВИЧ, хотя и не используется в клинике из-за токсичности. Ввиду тяжелых побочных эффектов обычно его оставляют в резерве для особых случаев.

Фоскарнет вводится только внутривенно из-за низкой биодоступности (20%). Он выводится почками, поэтому пациентам с почечной недостаточностью надо подбирать дозу. Главные побочные эффекты фоскарнета — нефротоксичность и нарушения электролитного баланса. Почти у половины реципиентов уровень креатинина в сыворотке повышается до трех раз. Факторы риска почечной дисфункции —

имеющееся заболевание почек и одновременное применение других нефротоксичных препаратов. Кроме того, на нефротоксичность влияют способ инфузии и обезвоженность [71]. Нефротоксический эффект обычно проходит за 2–4 нед. после отмены. Фоскарнет — хелатирующий агент, способный нарушать электролитный баланс (гипо- и гиперкальцемиа, гипо- и гиперфосфатемия) [72]. Гипокальцемиа наблюдается почти у трети пациентов, что может приводить к судорогам, тетаническим сокращениям мышц и аритмии. У некоторых пациентов могут возникать гипомагнемия и гипокалиемия. Побочные эффекты со стороны ЦНС — головная боль, судороги, галлюцинации, тремор, нейроналии. Другие побочные эффекты — лихорадка, тошнота, рвота, дисфункция печени и цитопении. Резистентность к фоскарнету возникает за счет мутаций в вирусной ДНК-полимеразе у некоторых штаммов CMV, HSV и VZV [73, 74].

### Трифлуридин

Трифлуридин — глазное средство, используемое при HSV-кератите. Трифлуридин и его предшественник, идокуридин, являются аналогами тимидина, ингибирующими вирусную ДНК-полимеразу. Как у большинства противогерпесных средств, действие трифлуридина зависит от фосфорилирования соединения вирусными и клеточными тимидинкиназами. Но при парентеральном введении это вызывает значительную клеточную токсичность. Поэтому применение трифлуридина ограничивается местным использованием при герпесном кератите. Следует отслеживать побочные эффекты: закупорка слезных канальцев или кератинизация краев век.

## ТЕРАПИЯ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

Вирусы гепатитов В и С вызывают как острую, так и хроническую болезнь печени с высоким уровнем заболеваемости и смертности во всем мире. Хроническая инфекция часто приводит к циррозу и гепатоклеточной карциноме и является ведущим показанием к трансплантации печени в США. Геном вируса гепатита В (HBV) — кольцевая двуцепочечная ДНК, окруженная икосаэдрической оболочкой. Репликацию вируса производит обратная транскриптаза. Входящий в семейство флавириусов вирус гепатита С (HCV) — оболочный вирус с «+»-РНК-геномом. Для излечения инфекции и предотвращения отдаленных последствий используют схемы с нуклеотидными аналогами и иммуномодуляторами.

### Ламивудин

Ламивудин — нуклеозидный аналог, изначально предназначенный для ингибирования обратной транскриптазы при лечении ВИЧ-инфекции; позже была показана его активность в отношении HBV. Клеточные киназы фосфорилируют его до активной формы — лами-



вудина трифосфата, который затем включается в растущую цепь ДНК и прекращает удлинение. Это лекарство в разной дозировке назначается для лечения как ВИЧ-, так и хронической HBV-инфекции. Его роль в лечении ВИЧ будет обсуждаться далее в этой главе.

Ламивудин может применяться самостоятельно или в комплексе с другими медикаментами ( $\alpha$ -интерферон) для лечения хронического гепатита В. Годичная монотерапия хронической HBV-инфекции улучшает клинические показатели: АЛТ нормализуется (72%), происходит сероконверсия HBeAg (16%), улучшаются гистологические показатели воспаления (56%) [75].

Лечение ламивудином проводится длительно, орально и в целом хорошо переносится. Побочные реакции включают головную боль, усталость, тошноту, рвоту, диарею, периферическую нейропатию и выпадение волос. Реже встречаются более тяжелые осложнения — панкреатит и лактоацидоз.

Главное ограничение ламивудина — рецидив после лечения с появлением ДНК HBV в сыворотке после ее первоначального исчезновения, что обусловлено быстрым развитием лекарственной резистентности из-за мутации в каталитическом домене обратной транскриптазы HBV. Резистентные штаммы отмечены у 1/3 пациентов к концу первого года лечения и почти у 2/3 пациентов после 4 лет терапии [76].

### Адефовир

Адефовир — нуклеотидный аналог АМР, вводится орально, является предшественником адефовира дипивоксила. Исходно предназначался для терапии ВИЧ; *in vitro* ингибировал ВИЧ, но в исследованиях на людях не удалось получить безопасную эффективную дозу. Предшественник метаболизируется в адефовир, который фосфорилируется клеточными киназами в адефовира дифосфат, полностью ингибирующий обратную транскриптазу HBV и прекращающий синтез ДНК после включения в растущую цепь.

Адефовир показан для лечения хронического гепатита В у взрослых с подтвержденным активным заболеванием (высокий уровень ДНК HBV и аминотрансфераз в сыворотке или ухудшение гистологических показателей). У HBeAg-положительных пациентов монотерапия адефовиром в течение 48 нед. нормализовала АЛТ в 48%, вызвала сероконверсию — в 12% и гистологическое улучшение — в 53% [77].

Биодоступность адефовира составляет около 60%; он выводится почками, поэтому надо подбирать дозу у пациентов с нарушенной функцией почек.

Адефовир в целом хорошо переносится; наиболее распространенные побочные эффекты — головная боль, фарингит, боль в животе и периферическая нейропатия. У некоторых пациентов наблюдалась также нефротоксичность: чем выше доза и продолжительность приема, тем выше риск [78]. Сообщалось об обострении гепатита после отмены адефовира, в большинстве случаев в течение 12 нед. после

прекращения терапии: превышение верхней границы нормы АЛТ до 10 раз может встречаться более чем у четверти пациентов [78].

Резистентность к адефовиру возникает реже, чем к ламивудину, поэтому он предпочтительнее. Клинические исследования не выявили ни одного случая резистентности у пациентов, получавших 48-недельную терапию [79]. При более длительном курсе возникают резистентные штаммы HBV с мутациями в гене ДНК-полимеразы; выявлены и другие, более редкие варианты [80, 81]. Примечательно, что резистентные к ламивудину штаммы HBV остаются чувствительными к адефовиру.

## Тенофовир

Тенофовир — нуклеотидный аналог, структурно идентичный адефовиру, был лицензирован для лечения ВИЧ-инфекции как ингибитор обратной транскриптазы. Тенофовир был одобрен для лечения хронического гепатита В на основании данных успешных клинических испытаний. Проведенные ранее исследования показали роль тенофовира в лечении пациентов с резистентными к ламивудину штаммами (в одном из них было показано снижение уровней ДНК HBV до значений  $<10^6$  копий/мл за 48 нед. терапии тенофовиром у 100% пациентов против 48 у пациентов, получавших адефовир [82]. Есть данные о случаях положительной реакции на тенофовир у пациентов с первичной резистентностью к адефовиру [80]. Тенофовир также имеет большой потенциал в лечении пациентов с хроническим гепатитом В и ВИЧ. В одном рандомизированном исследовании с плацебо-контролем было показано, что у 52 пациентов с двойной инфекцией активность тенофовира против HBV была не ниже, чем аденовира за 48 нед. лечения [83]. Тенофовир включен в руководство по лечению СПИДа в качестве компонента антиретровирусной схемы у пациентов со смешанной инфекцией [84]. В целом тенофовир хорошо переносится; в клинических испытаниях у пациентов с хронической инфекцией HBV отмечены тошнота и желудочно-кишечные нарушения, головная боль, головокружение, слабость и сыпь [85].

## Энтекавир

Энтекавир — аналог гуанозина, обладает активностью в отношении ДНК-полимеразы HBV. Исследование, где сравнивалась монотерапия энтекавиром и ламивудином у HBeAg-положительных пациентов с хроническим гепатитом В, показало лучшие результаты при применении энтекавира: нормализация АЛТ в 68%, сероконверсия HBeAg в 21% и гистологическое улучшение в 72% [86]. Тяжесть побочных эффектов сравнима с ламивудином: головная боль, слабость, инфекции верхних дыхательных путей, боль в животе. Очень редко наблюдались лактацидоз и печеночный стеатоз. При 48-недельном курсе терапии не было отмечено появления резистентных штаммов [86]. Одну подгруппу в этом исследовании наблюдали до 96 недель: у получав-

ших энтекавир нормализовалась АЛТ, а ДНК HBV была на невыявляемом уровне [87]. Для пациентов с хроническим гепатитом В/HBeAg- [88] и пациентов с резистентностью эффективность энтекавира была выше, чем ламивудина [89].

## Телбивудин

Телбивудин — синтетический аналог нуклеозида тимидина, одобренный для лечения хронического гепатита В. Его активная фосфорилированная форма конкурентно ингибирует ДНК-полимеразу HBV. Первичные клинические исследования показали, что ДНК HBV подавлялась у большего числа лиц HBeAg+, получавших телбивудин, по сравнению с ламивудином [90, 91]. В одном испытании III фазы больше пациентов (75%), получавших телбивудин свыше 52 недель, достигли конечной точки супрессии ДНК HBV и исчезновения HBeAg в сыворотке по сравнению с получавшими ламивудин (67%) [90]. Хорошее действие телбивудина также было продемонстрировано у пациентов HBeAg- [90].

Телбивудин принимается orally и выводится почками, поэтому пациентам с почечной недостаточностью необходимо подбирать дозу. Побочные эффекты такие же, как у ламивудина: симптомы инфекций верхних дыхательных путей, головная боль, усталость и желудочно-кишечное расстройство [92]. Миопатия — редкий побочный эффект; она наблюдалась у некоторых пациентов через несколько недель лечения и сопровождалась повышением уровня креатинкиназы в сыворотке [92]. После прерывания терапии также отмечалось резкое обострение гепатита [92]. Уровень резистентности был ниже у тех, кто получал телбивудин, по сравнению с получавшими ламивудин [90].

## Интерфероны

Интерфероны — группа естественных цитокиновых белков, выступающих в роли медиаторов многих физиологических функций, включая иммуномодуляцию и антипролиферацию. В зависимости от происхождения выделяют три класса интерферонов: лейкоцитарные ( $\alpha$ ), фибробластные ( $\beta$ ) и лимфоцитарные ( $\gamma$ ). Рекомбинантные технологии позволяют получать интерфероны для терапевтических целей. Интерфероны работают, связывая специфические рецепторы клетки и индуцируя клеточные реакции.

Противовирусные свойства интерферонов основаны на их способности воздействовать на зараженные клетки и модулировать врожденные иммунные реакции хозяина. Интерфероны  $\alpha$  и  $\beta$  секретируются в ответ на вирусную инфекцию, а интерферон  $\gamma$  секретируется активированными лимфоцитами. Те, в свою очередь, действуют на зараженные клетки, ингибируя различные ступени жизненного цикла вируса: проникновение и депротенинизацию, синтез мРНК и трансляцию белка, сборку и выход вирусных частиц [93]. Интерфероны также действуют на клетки хозяина, непосредственно участвующие в иммунном ответе

на инфекцию, повышая активность натуральных киллеров и экспрессию антигенов МНС класса I на зараженных клетках.

Интерферон- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ) показан для лечения гепатитов HBV и HCV, а также инфекций, вызванных вирусом папилломы человека. Монотерапия ИФН- $\alpha$  эффективна при хроническом HBV и HCV гепатите [94]. У 40% пациентов, получавших ИФН- $\alpha$ , наблюдалось снижение уровня сывороточных аминотрансфераз и улучшения гистологических показателей, у 20% исчез поверхностный антиген гепатита В [95]. У менее 50% лиц с хроническим гепатитом С наблюдались схожие биохимические и гистологические улучшения, вирусная РНК в сыворотке не обнаруживалась, а у половины возникал рецидив [96, 97]. Комбинация ИФН- $\alpha$  с полиэтиленгликолем (ПЭГ) повышает его эффективность: увеличивается период полураспада за счет замедления абсорбции, снижения почечного клиренса и иммуногенности. Этот препарат более эффективно лечит хронический гепатит С, чем ИФН- $\alpha$  в виде монотерапии или в комбинации с рибавирином [100–102]. У пациентов с хроническим гепатитом В эффективность интерферона в сочетании с ПЭГ выше незначительная, но его преимущество в том, что его вводят один раз в неделю, а не трижды, как стандартный интерферон [103]. Среди пациентов с хроническим гепатитом В и HBeAg+ монотерапия интерфероном в сочетании с ПЭТ вызвала сероконверсию у 32%, нормализацию АЛТ у 41% и супрессию ДНК HBV у 32% — это более эффективно, чем монотерапия ламивудином [104].

Комбинация приема рибавирина orally и  $\alpha$ -интерферона у пациентов с хроническим гепатитом С дает лучшие результаты, чем лечение только интерфероном. Вирус исчез у 41% получавших комбинированную терапию в течение 48 недель; при монотерапии — только у 16% [105, 106]. Более высокая эффективность была, если возбудителями инфекции были вирусы серотипов, отличных от 1. Более того, комбинированная терапия была более эффективной в лечении некоторых пациентов с рецидивом после предыдущего курса интерферона [107]. Благодаря внедрению ИФН- $\alpha$  в сочетании с ПЭГ был установлен стандартный режим лечения с рибавирином. Свыше половины пациентов после 48-недельного курса достигали устойчивого излечения [100–102].

Интерферон- $\alpha$  также показан для лечения поражений, вызванных HPV, таких как остроконечные кондиломы. Препарат либо непосредственно вводят в область поражения, либо дают системно, при более тяжелом течении болезни. Исчезновение бородавок после инъекции наблюдалось у 60% пациентов [108, 109]. Следует отметить, что существует другое лицензированное средство местного лечения HPV, модулирующее иммунный ответ — имиквимод.

Интерферон- $\alpha$  вводят внутримышечно или подкожно; всасывается свыше 80% [110]. Как уже обсуждалось выше, сочетание с ПЭГ увеличивает период полураспада лекарства. В тканях и жидкостях организма интерферон выявляется в очень маленьких количествах, выведение с мочой минимальное [110]. Многие пациенты переносят его

плохо из-за побочных эффектов (гриппоподобные симптомы в виде лихорадки, озноба, головной боли, миалгии, слабости и желудочно-кишечных расстройств, которые чаще встречаются в начале лечения). Почти у половины пациентов повышаются уровни АЛТ в сыворотке (за счет лизиса инфицированных гепатоцитов). В высоких дозах может проявляться нейротоксичность в виде поведенческих нарушений, депрессии, спутанности сознания, сонливости, а иногда — судорог и комы. Также возможны нейтропения и цитопения [111]. Поэтому необходимо проводить тщательный мониторинг пациентов, особенно если курс длительный.

Резистентности к интерферону не выявлено — это одно из преимуществ над аналогами нуклеозидов. Другим преимуществом является четкий срок терапии. Например, пациентам с активным гепатитом В в настоящее время рекомендуется 48-недельный курс  $\alpha$ -интерферона, а лечение аналогами нуклеотидов или нуклеозидов может длиться годами. Наконец, клинический рецидив чаще возникает после курсов лечения аналогами по сравнению с терапией интерфероном.

## **ТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА**

Противовирусные средства для борьбы с вирусом иммунодефицита человека произвели революцию в лечении пациентов с ВИЧ и СПИДом. Терапия — постоянно изменяющаяся и быстро развивающаяся область. Сейчас терапия нацелена на минимизацию вирусной нагрузки у инфицированных, успех за последние 30 лет привел к существенному улучшению качества жизни и снизил распространение болезни там, где помощь доступна.

ВИЧ-1 и более редкий ВИЧ-2 — оболочные вирусы с одноцепочным РНК-геномом; для их репликации нужна обратная транскриптаза. Противовирусные средства можно разделить на категории в зависимости от стадии жизненного цикла вируса, на которую они нацелены. Ингибиторы слияния предназначены для предотвращения прикрепления вириона и проникновения его в клетку потенциального хозяина. Ингибиторы обратной транскриптазы нацелены на репликацию вируса, ингибиторы интегразы — на процесс интеграции провирусной ДНК в ДНК хозяина, ингибиторы протеазы мешают превращению нового вириона в инфекционную форму перед выходом.

Одно из величайших препятствий в борьбе с ВИЧ — способность вируса мутировать и создавать резистентные к лекарствам штаммы. Скорость их появления при монотерапии ставит вопрос о комплексных препаратах и строгом соблюдении схем лечения. Для этого необходимы хорошая переносимость лекарств и удобные схемы лечения. Пока отсутствует перспектива излечения или вакцинации, постоянно создаются и тестируются новые лекарства, чтобы обеспечить более эффективную терапию. Быстрые изменения в этой области предполагают всестороннее обсуждение всех имеющихся сегодня средств,

что выходит за рамки данной главы. Будут рассмотрены примеры лекарств в каждой категории.

### **Нуклеотидные и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы: зидовудин, диданозин, ставудин, ламивудин, абакавир, тенофовир, эмтриктабин**

Нуклеотидные и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI) были первым классом лекарств, используемых пациентами с ВИЧ, они лежат в основе схем высокоактивной антиретровирусной терапии (HAART). NRTI — это 3'-модифицированные дезоксинуклеозиды, требующие фосфорилирования ферментами клетки-хозяина. Активированные NRTI ингибируют действие обратной транскриптазы, конкурируя с dGTP за включение в растущую цепь вирусной ДНК — и на этом рост цепи ДНК прекращается.

В целом препараты хорошо всасываются при оральном приеме: биодоступность некоторых достигает 80% [84]. За исключением абакавира, NRTI выводятся почками (метаболизм в печени минимален), поэтому у пациентов с почечной недостаточностью необходим подбор дозы [84]. Побочные эффекты в основном связаны с желудочно-кишечным трактом (тошнота и рвота); изредка встречаются лактацидоз и стеатоз печени. Лечение некоторыми средствами может вызывать панкреатит, периферическую нейропатию, миопатию и липодистрофию. Зидовудин (первый лицензированный препарат для лечения СПИДа) — аналог тимидина, способный вызвать анемию и нейтропению [84]. Применение одного из новейших NRTI, абакавира, было связано с потенциально смертельной реакцией гиперчувствительности у 5–10% принимавших его пациентов; также необходимо проводить тщательный мониторинг во время приема из-за опасности гипотензии, угрожающей жизни [84].

Как упоминалось ранее, быстрое возникновение резистентности у ВИЧ делает монотерапию NRTI бесполезной. Для успешной терапии нужно комбинировать NRTI с другим классом лекарств. Несколько комбинированных лекарств уже появилось на рынке, в том числе комбивир (зидовудин/ламивудин) и трувада (тенофовир/эмтрицитабин). Благодаря им терапия HAART стала более удобной для пациентов.

### **Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы: невирапин, делвирдин, эфавиренц, этравирин**

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI) — важное дополнение к NRTI в ингибировании обратной транскриптазы при низкой резистентности. NNRTI не нуждаются во внутриклеточном фосфорилировании и терминируют цепь за счет прямого связывания обратной транскриптазы.

NNRTI хорошо всасываются при оральном приеме: биодоступность делвирдина и невирапина превышает 85% [84]. В отличие от NRTI,

NNRTI первично метаболизируются в печени ферментной системой цитохрома CYP. Поэтому возможны лекарственные взаимодействия, что особенно важно у пациентов с сопутствующими заболеваниями. Побочные эффекты включают сыпь — вплоть до развития синдрома Стивенса—Джонсона у пациентов, принимающих невирапин [84]. Невирапин также обладает гепатотоксичностью [84]. У некоторых пациентов, принимавших эфавиренц, наблюдались побочные эффекты со стороны ЦНС, такие как головокружение, рассеянность, беспокойство, галлюцинации и бессонница.

NNRTI не следует назначать в виде монотерапии ввиду быстрого возникновения резистентности. Более того, NNRTI не следует использовать совместно, поскольку резистентность может распространяться на другие препараты этого класса. Несмотря на побочные эффекты, NNRTI полезны в комбинированной терапии с NRTI и благодаря своему относительно большому периоду полураспада дают возможность более редкого приема [84].

### **Ингибиторы протеазы: саквинавир, ритонавир, индинавир, нелфинавир, лопинавир/ритонавир, атазанавир, фосампренавир, типранавир, дарунавир**

Ингибиторы протеазы (PI) — еще один класс мощных средств для использования в комбинации с NRTI. Протеаза — вирусный фермент, расщепляющий вирусные белки-предшественники на более мелкие функциональные конечные продукты. PI ингибируют стадию расщепления, препятствуя функционированию белка, и вирион становится незрелым и неинфекционным [112, 113]. За последние 20 лет было создано несколько лекарств этого класса, большинство из них — пептидоподобные соединения, связывающие вирусную протеазу.

PI принимаются orally и вызывают тяжелые побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта: тошноту, рвоту, диарею, боль в животе. Часто рекомендуется прием с пищей, но это может повлиять на уровень лекарства. Чтобы достичь достаточного уровня, сначала дают ритонавиновый бустер (такой эффект был обнаружен случайно: ритонавир используется сейчас преимущественно в этой роли). Примером может служить комбинация лопинавир/ритонавир (калетра). Некоторые средства оказались гепатотоксичными или давали другие метаболические осложнения: дислипидемию, липодистрофию и резистентность к инсулину [84].

PI метаболизируются CYP-ферментной системой печени, что приводит к значительным межлекарственным взаимодействиям [84]. Как всегда, во избежание резистентности рекомендуется комбинировать PI с препаратами других групп.

Атазанавир — одно из самых популярных и хорошо переносимых средств. Принимается orally и лучше всего всасывается с пищей в кислой среде, что ограничивает применение антацидов, таких как ингибиторы протонной помпы. У пациентов с нарушением функции

печени необходимо подбирать дозу [84]. Атазанавир меньше влияет на метаболизм, чем другие PI, но может вызвать бессимптомную гипербилирубинемия. Уникальные побочные эффекты связаны с пролонгацией интервала PR и замедлением внутрисердечной проводимости, а также нефролитиазом [84].

### Новые классы: энфувиритид, маравирик, ралтегравир

Эти лекарства — представители новейших средств лечения ВИЧ-инфекции; в настоящее время они резервируются для штаммов с полирезистентностью. Механизм действия каждого из них нацелен на иные стадии жизненного цикла вируса, чем предыдущие классы. Энфувиритид — ингибитор слияния, препятствующий слиянию мембраны ВИЧ с клеточной мембраной и проникновению ВИЧ в клетки. Было показано, что он эффективно снижает уровень РНК ВИЧ у пациентов с полирезистентными штаммами [114, 115]. Удобство его применения ограничивается наличием только инъекционной формы. Новое средство маравирик также блокирует проникновение вируса, специфически связывая CCR5-рецептор CD4 Т-клеток — это корецептор, критически важный для проникновения в клетку определенных вирусных штаммов. Считается, что антагонист CCR5 обладает активностью только в отношении штаммов ВИЧ, тропных к CCR5-рецептору (штаммы R5), и поэтому не показан для лечения инфекций, вызванных другими штаммами. Новейшее дополнение к анти-ВИЧ-препаратам — ралтегравир, ингибитор интегразы. Это соединение ингибирует вставку ДНК ВИЧ в геном хозяина, осуществляемую интегразой — таким образом предотвращается репликация вируса. Раздельные клинические испытания III фазы документально подтвердили улучшение вирусологической реакции на маравирик и ралтегравир по сравнению с плацебо у пациентов с неудачной схемой оптимизированной антиретровирусной терапии. На основании полученных данных эти новые лекарства рекомендованы как препараты выбора для пациентов, лечение которых оказалось неудачным из-за резистентности [84].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 30 лет очень быстрыми темпами создавались лекарства для борьбы с вирусными инфекциями человека. В итоге удалось спасти жизни и снизить заболеваемость. Успехи в области борьбы с ВИЧ привели к увеличению продолжительности и качества жизни. Лечение HSV-инфекций центральной нервной системы позволило улучшить качество жизни пациентов. Несмотря на признанные достижения, имеются неудовлетворенные и недоработанные медицинские потребности. Даже при успешном лечении HSV-инфекций головного мозга заболеваемость и смертность остается слишком высокой, что свидетельствует о необходимости улучшения терапии или комбинирования лекарств с различными механизмами действия. Аналогично в лечении



хронического гепатита С существует явная необходимость в молекулах, пригодных для комбинирования и активных в отношении серотипа 1 — тогда отпадет потребность в интерфероне в сочетании с ПЭГ и рибавирине со значительной токсичностью. Всё большие масштабы приобретает проблема резистентности к лицензированным противовирусным препаратам. Четко установлена резистентность к лекарствам, применяемым для лечения ВИЧ/СПИД — список препаратов с различным механизмом действия постоянно расширяется. С недавних пор резистентность гриппа H1N1 к озелтамивиру стала существенной проблемой в Южной Африке и Скандинавских странах. В конце концов назрела потребность пополнить спектр новых лекарственных средств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Darby G. A History of Antiherpes Research. *Antivir Chem Chemother* 1994; 5 (suppl 1):54–63.
2. Field H, Whitley RJ. Antiviral chemotherapy. In: Mahy BWJ, Meulen Vt, eds. *Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. London, UK: Hodder Arnold, 2005:1605–1645.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm Rep* 2008; 57:1–60.
4. Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 1996; 70(12):8391–8401.
5. Hall CB, Dolin R, Gala CL, et al. Children with influenza A infection: treatment with rimantadine. *Pediatrics* 1987; 80(2):275–282.
6. Van Voris LP, Betts RF, Hayden FG, et al. Successful treatment of naturally occurring influenza A/USSR/77 H1N1. *JAMA* 1981; 245(11):1128–1131.
7. Anonymous, Immunization Practices Advisory Committee. Prevention and control of influenza. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41:1–14.
8. Dolin R, Reichman RC, Madore HP, et al. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med* 1982; 307(10):580–584.
9. Hayden FG, Couch RB. Clinical and epidemiologic importance of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Rev Med Virol* 1992; 2:89–96.
10. Hayden FG, Belshe RB, Lover RDC, et al. Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. *N Engl J Med* 1989; 321(25):1696–1702.
11. Bright RA, Shay DK, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295(8):891–894.
12. Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. *N Engl J Med* 2000; 343:1282–1289.
13. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, et al. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282:31–35.
14. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med* 1999; 341:1336–1343.

15. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al; US Oral Neuraminidase Study Group. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 283:1016–1024.
16. Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:127–133.
17. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus A, et al. Treatment of acute influenza: efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir. *Lancet* 2000; 355:1845–1850.
18. Welliver R, Monto AS, Carewicz O, et al. Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:748–754.
19. Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus. *N Engl J Med* 1997; 337:874–880.
20. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: A randomised controlled trial. *Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Lancet* 2000; 355(9218):1845–1850.
21. Wood ND, Aitken M, Sharp S, et al. Tolerability and pharmacokinetics of the influenza neuraminidase inhibitor Ro-64-0802 (GS4071) following oral administration of the prodrug Ro-64-0796 (GS4104) to healthy male volunteers. In: 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Toronto, 1997.
22. Cass LM, Brown J, Pickford M, et al. Pharmacoscintigraphic evaluation of lung deposition of inhaled zanamivir in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet* 1999; 1:21–31.
23. Cheer SM, Wagstaff AJ. Zanamivir: An update of its use in influenza. *Drugs* 2002; 62:71–106.
24. Cass LM, Gunawardena KA, Macmahon MM, et al. Pulmonary function and airway responsiveness in mild to moderate asthmatics given repeated inhaled doses of zanamivir. *Respir Med* 2000; 94(2): 166–173.
25. Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: Randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* 1999; 282(13):1240–1246.
26. U.S. Food and Drug Administration. 2008 Safety Alerts for Human Medical Products (Drugs, Biologics, Medical Devices, Special Nutritionals, and Cosmetics). Tamiflu (oseltamivir phosphate). Silver Spring, MD: U.S.F.D. A. 2008. <https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm261686.htm>.
27. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9):3284–3292.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Additional Considerations to the Interim Recommendations for the Use of Influenza Antiviral Medications in the Setting of Oseltamivir Resistance among Circulating Influenza A (H1N1) Viruses, 2008–09 Influenza Season. Atlanta, GA: CDC. <https://www.cdc.gov/flu/pdf/professionals/antivirals/antiviral-summary-clinicians.pdf>.
29. Sidwell RW, Robins RK, Hillyard IW. Ribavirin: An antiviral agent. *Pharmacol Ther* 1979; 6(1): 123–146.

30. Hall CB, McBride JT, Walsh EE, et al. Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N Engl J Med* 1983; 308(24):1443-1447.
31. Groothuis JR, Woodin KA, Katz R, et al. Early ribavirin treatment of respiratory syncytial viral infection in high-risk children. *J Pediatr* 1990; 117(5):792-798.
32. Conrad DA, Christenson JC, Waner JL, et al. Aerosolized ribavirin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants hospitalized during an epidemic. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6(2):152-158.
33. Laskin OL, Longstreth JA, Hart CC, et al. Ribavirin disposition in high-risk patients for acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Therap* 1987; 41(5):546-555.
34. Kimberlin DW, Prober CG. Antiviral agents. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, eds. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2003:1527-1547.
35. Whatley JD, Thin RN. Episodic acyclovir therapy to abort recurrent attacks of genital herpes simplex infection. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27(5):677-681.
36. Reichman RC, Badger GJ, Mertz GJ, et al. Treatment of recurrent genital herpes simplex infections with oral acyclovir. A controlled trial. *JAMA* 1984; 251(16):2103-2107.
37. Wald A, Carrell D, Remington M, et al. Two-day regimen of acyclovir for treatment of recurrent genital herpes simplex virus type 2 infection. *Clin Infect Dis* 2002; 34(7):944-948.
38. Goldberg LH, Kaufman R, Kurtz TO, et al; Acyclovir Study Group. Long-term suppression of recurrent genital herpes with acyclovir. A 5-year benchmark. *Arch Dermatol* 1993; 129(5):582-587.
39. Gold D, Corey L. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(3):361-367.
40. Mindel A, Faherty A, Carney O, et al. Dosage and safety of long-term suppressive acyclovir therapy for recurrent genital herpes. *Lancet* 1988; 1(8591):926-928.
41. Rooney JF, Straus SE, Mannix ML, et al. Oral acyclovir to suppress frequently recurrent herpes labialis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1993; 118(4):268-272.
42. Wagstaff AJ, Faulds D, Goa KL. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1994; 47(1):153-205.
43. Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, et al. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics* 2001; 108(2):230-238.
44. Kimberlin D, Powell D, Gruber W, et al. Administration of oral acyclovir suppressive therapy after neonatal herpes simplex virus disease limited to the skin, eyes and mouth: results of a phase I/II trial. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(3):247-254.
45. Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, et al. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* 1990; 112(6):416-422.
46. Whitley RJ, Kimberlin D. Antiviral Agents. In: Burg FD, Ingelfinger JR, Polin RA, et al., eds. *Gellis and Kagan's Current Pediatric Therapy*, Vol. 17. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co, 2002:244-256.
47. Kimberlin DW, Coen DM, Biron KK, et al. Molecular mechanisms of antiviral resistance. *Antiviral Res* 1995; 26(4):369-401.

48. Soul-Lawton J, Seaber E, On N, et al. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(12):2759–2764.
49. Boike SC, Pue MA, Freed MI, et al. Pharmacokinetics of famciclovir in subjects with varying degrees of renal impairment. *Clin Pharmacol Therap* 1994; 55(4):418–426.
50. Kimberlin DW, Lin C, Sanchez P, et al. Ganciclovir (GCV) treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus (CMV) infections: Results of a phase III randomized trial. In: 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Toronto, Ontario, Canada, 2000.
51. Rayes N, Oettle H, Schmidt CA, et al. Preemptive therapy in CMV-antigen positive patients after liver transplantation — a prospective trial. *Ann Transplant* 1999; 4(2):12–17.
52. Kelly J, Hurley D, Raghu G. Comparison of the efficacy and cost effectiveness of pre-emptive therapy as directed by CMV antigenemia and prophylaxis with ganciclovir in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(4):355–359.
53. Mori T, Okamoto S, Matsuoka S, et al. Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(7):765–769.
54. Reddy V, Hao Y, Lipton J, et al. Management of allogeneic bone marrow transplant recipients at risk for cytomegalovirus disease using a surveillance bronchoscopy and prolonged pre-emptive ganciclovir therapy. *J Clin Virol* 1999; 13(3):149–159.
55. Markham A, Faulds D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 1994; 48(3):455–484.
56. Frenkel LM, Capparelli, EV, Dankner WM, et al. Oral ganciclovir in children: Pharmacokinetics, safety, tolerance, and antiviral effects. *J Infect Dis* 2000; 182(6):1616–1624.
57. Brown F, Banken L, Saywell K, et al. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37(2):167–176.
58. Cocohoba JM, McNicholl IR. Valganciclovir: An advance in cytomegalovirus therapeutics. *Ann Pharmacother* 2002; 36(6):1075–1079.
59. Kopp T, Geusau A, Rieger A, et al. Successful treatment of an aciclovir-resistant herpes simplex type 2 infection with cidofovir in an AIDS patient. *Br J Dermatol* 2002; 147(1):134–138.
60. Kadambi PV, Josephson MA, Williams J, et al. Treatment of refractory BK virus-associated nephropathy with cidofovir. *Am J Transplant* 2003; 3(2):186–191.
61. Vats A, Shapiro R, Singh Randhawa P, et al. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation* 2003; 75(1):105–112.
62. Marra CM, Rajicic N, Barker DE, et al. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *AIDS* 2002; 16(13):1791–1797.
63. Center for Disease Control and Prevention. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53 (No. RR-15).

64. Lalezari JP, Drew WL, Glutzer E, et al. (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonyl-methoxy)propyl]cytosine (cidofovir): results of a phase I/II study of a novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* 1995; 171(4):788-796.
65. Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J Virol* 1994; 68(7):4427-4431.
66. Cherrington JM, Miner R, Allen SJW, et al. Sensitivities of human cytomegalovirus (HCMV) clinical isolates to cidofovir. In: 8th International Conference on Antiviral Research, 1995. Sante Fe, N. M.: Antiviral Research.
67. Wagstaff AJ, Bryson HM. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections. *Drugs* 1994; 48(2): 199-226.
68. Jacobson MA, Drew WL, Feinberg J, et al. Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1348-1351.
69. Safrin S, Berger TG, Gilson I, et al. Foscarnet therapy in five patients with AIDS and acyclovir-resistant varicella-zoster virus infection. *Ann Intern Med* 1991; 115(1):19-21.
70. Safrin S, Crumpacker C, Chatis P, et al.; The AIDS Clinical Trials Group. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325(8):551-555.
71. Deray G, Martinez F, Katlama C, et al. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *American J Nephrol* 1989; 9(4):316-321.
72. Jacobson MA, Gambertoglio JG, Aweeka FT, et al. Foscarnet-induced hypocalcemia and effects of foscarnet on calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(5):1130-1135.
73. Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, et al. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 169(1):193-196.
74. Snoeck R, Andrei G, Gerard M, et al. Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis* 1994; 18(4):570-578.
75. Lai CL, Chien RN, Leung NW, et al; Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998; 339:61-68.
76. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341(17):1256-1263.
77. Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348(9):808-816.
78. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352(26):2673-2681.
79. Westland CE, Yang H, Delaney WEt, et al. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 38(1):96-103.
80. Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 354(17):1807-1812.
81. Chang TT, Lai CL. Hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 355(3):322-323; author reply 323.

82. van Bommel F, Wunsche T, Mauss S, et al. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40(6):1421–1425.
83. Peters MG, Andersen J, Lynch P, et al. Randomized controlled study of tenofovir and adefovir in chronic hepatitis B virus and HIV infection: ACTG A5127. *Hepatology* 2006; 44(5):1110–1116.
84. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Rockville, MD. January 29, 2008:1–128. <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Accessed September 10, 2008.
85. Tenofovir (Viread) [package insert]. Foster City, CA: Gilead Sciences; 2008.
86. Chang TT, Gish RG, de Man R, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354(10):1001–1010.
87. Gish RG, Lok AS, Chang TT, et al. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 133(5):1437–1444.
88. Lai CL, Shouval D, Lok AS, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354(10):1011–1020.
89. Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J, et al. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2006; 130(7):2039–2049.
90. Lai CL, Gane E, Liaw YF, et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007; 357(25):2576–2588.
91. Hou J, Yin YK, Xu D, et al. Telbivudine versus lamivudine in Chinese patients with chronic hepatitis B: Results at 1 year of a randomized, double-blind trial. *Hepatology* 2008; 47(2):447–454.
92. Telbivudine (Tyzeka) [package insert]. East Hanover, NJ: Novartis; 2006.
93. Gen GC, Ransohoff RM. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 1993; 42:57–102.
94. Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, et al. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. [see comment]. *Ann Intern Med* 1993; 119(4):312–323.
95. Hirschman SZ. Current therapeutic approaches to viral hepatitis. *Clin Infect Dis* 1995; 20(4):741–743.
96. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1989; 321(22):1501–1506.
97. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Hepatology* 1992; 15(1):37–41.
98. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343(23):1666–1672.
99. Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000; 343(23):1673–1680.
100. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for ini-

- tial treatment of chronic hepatitis C: A randomised trial. *Lancet* 2001; 358(9286):958-965.
101. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347(13):975-982.
  102. Hadziyannis SJ, Sette H Jr., Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140(5):346-355.
  103. Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, et al. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2003; 10(4):298-305.
  104. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352(26):2682-2695.
  105. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339(21):1485-1492.
  106. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352(9138):1426-1432.
  107. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al. International Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N E J Med* 1998; 339(21):1493-1499.
  108. Eron LJ, Judson F, Tucker S, et al. Interferon therapy for condylomata acuminata. *N Engl J Med* 1986; 315(17):1059-1064.
  109. Friedman-Kien AE, Eron LJ, Conant M, et al. Natural interferon alfa for treatment of condylomata acuminata. *JAMA* 1988; 259(4):533-538.
  110. Wills RJ. Clinical pharmacokinetics of interferons. *Clin Pharmacokinet* 1990; 19(5):390-399.
  111. CASL Hepatitis Consensus Group. Treatment of chronic viral hepatitis with alpha interferon: A consensus conference report. *Can J Infect Dis* 1994; 5:107-112.
  112. Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(2):153-164.
  113. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(13):4686-4690.
  114. Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, et al. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* 2003; 348(22):2186-2195.
  115. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 2003; 348(22):2175-2185.

# 14 РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ДЕТСКИЕ ИНФЕКЦИИ

**Д. М. Зерр**

Danielle M. Zerr, Department of Pediatrics, University of Washington and Seattle Children's Hospital, Seattle, Washington, U.S.A.

ЛАНЬ

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции — первопричина заболеваемости и смертности детей по всему миру. По оценке Всемирной организации здравоохранения, 37% смертей у детей младше 5 лет в 2000–2003 гг. были вызваны пневмонией или диареей [1]. Кроме того, 10% смертей связаны с преждевременными родами, и немалую роль играют инфекции. За первые годы жизни каждый ребенок сталкивается с распространенными респираторными и желудочно-кишечными вирусами. И даже в развитых странах эти вирусы вносят большой вклад в заболеваемость и отнимают много ресурсов здравоохранения. Прежде чем вакцинация от ротавируса стала доступной, в США показатель госпитализации детей младше 5 лет из-за диареи составил 97 на 10 000 (в среднем 185 742 в год) [2]. В странах Евросоюза, согласно оценкам, ротавирусная инфекция приводит к 231 летальному исходу, госпитализации более 87 000 пациентов и почти 700 000 вызовам к детям младше 5 лет [3]. В США уровень госпитализации по поводу острых респираторных инфекций у детей младше 5 лет, по оценкам, составил 180 на 10 000 детей в год [4].

Относительно высокая заболеваемость и смертность, связанная с некоторыми вирусными инфекциями в раннем детстве, обусловлены комплексом факторов, включая отсутствие иммунитета. У маленьких детей первых 5 лет жизни, впервые заразившихся RSV, скорее всего возникнет заболевание нижних дыхательных путей, а при заражении ротавирусом — обезвоживание. У новорожденных, особенно у недоношенных, наблюдается высокая предрасположенность к тяжелому течению инфекций, вызванных такими возбудителями, как вирус простого герпеса и энтеровирус. Причина этого кроется в ограниченности как врожденного, так и приобретенного иммунитета, особенно клеточного звена [5].

При диагностике вирусных инфекций у детей возникают определенные сложности. Известно, что грипп слабо диагностируется у маленьких детей из-за менее характерного дебюта по сравнению со взрослыми [5]. Аналогично у новорожденных энтеровирус может проявляться септическим синдромом, который чаще клиницисты рассматривают как бактериальную инфекцию. Наличие у младенцев материнских антител затрудняет серологическую диагностику. Поэтому



в определенных ситуациях прямое выявление вируса имеет большое значение.

В данной главе обсуждаются клиническое проявление и диагностика важных вирусных инфекций детского возраста, включая вирусы, вызывающие синдром врожденной инфекции (краснуха, вирус простого герпеса, цитомегаловирус, вирус варицелла зостер, парвовирус В19), и вирусы детей и младенцев после рождения (энтеровирусы, парвовирус В19, вирус простого герпеса, герпесвирусы человека 6 и 7, корь, эпидемический паротит и краснуха). Важнейшие аспекты некоторых из этих вирусных инфекций подробно будут обсуждаться в других главах. Кроме того, респираторные и желудочно-кишечные вирусные инфекции подробно освещены в гл. 15 и 16.

## ПАТОГЕНЫ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СИНДРОМЫ

### Врожденные вирусные инфекции

Возникающие еще во время беременности врожденные вирусные инфекции могут стать причиной тяжелого состояния и смерти плода и новорожденного, а также различных патологий у детей более старшего возраста. Для обозначения патогенов, вызывающих врожденную инфекцию с похожими проявлениями, использовался собирательный термин TORCH (токсоплазмоз, другие — сифилис, краснуха, цитомегаловирус, вирус простого герпеса). Однако дебют этих инфекций может варьировать; другие патогены, такие как вирус варицелла зостер и парвовирус В19, тоже могут носить характер тяжелых врожденных инфекций. В этом разделе акцент будет сделан на наиболее распространенные вирусные патогены, вызывающие синдромы врожденной инфекции: вирус краснухи, вирус простого герпеса (HSV), цитомегаловирус (CMV), вирус варицелла зостер (VZV) и парвовирус В19. Эти вирусы подробно освещаются ниже и в других главах; обсуждение фокусируется на клинических проявлениях и диагностике врожденных инфекций, вызванных этими возбудителями.


ЛАНЬ®

#### *Клинические проявления и вирусы-возбудители*

Младенцы с врожденной инфекцией краснухи, HSV, CMV, VZV и парвовируса В19 могут не иметь клинических проявлений или проявлять явные признаки врожденной инфекции, включая лихорадку, сыпь (макулопапулезная, петехии или пурпура), гепатоспленомегалию, микроцефалию, судороги, желтуху, костно-мышечные нарушения и тромбоцитопению (табл. 14.1). При наличии клинических проявлений инфекции наблюдается более высокая тяжесть и летальность. Отдаленные последствия у выживших чаще всего включают задержку развития и глухоту.

Таблица 14.1

## Обычные клинические проявления и симптомы врожденных вирусных инфекций

	Краснуха	HSV	VZV	CMV	Парвовирус
Симптомы при рождении					
Задержка роста			x	x	
Сыпь					
Макулопапулярная/петехии/пурпура	x			x	
Пузырьки/язвочки/рубцы		x	x		
Тромбоцитопения	x			x	
Отечный синдром новорожденных		x			x
Гепатоспленомегалия	x			x	
Желтуха				x	
Аномалии сердечно-сосудистой системы	x				
Неврологические симптомы					
Мозговые кальцификаты			x	x	
Микроцефалия		x	x	x	
Менингоэнцефалит			x		
Судороги			x	x	
Нейросенсорная тугоухость	x			x	

Окончание табл. 14.1

	Краснуха	HSV	VZV	CMV	Парвовирус
Нарушения зрения					
Микрофтальмия		x	x		
Катаракта	x		x		
X ориентинит		x	x	x	
Кератоконъюнктивит		x			
Неправильное развитие скелета/костей	x		x		
Стандартные методы диагностики					
Серология	Выявление IgM ЛАНЬ		Выявление IgM СНБ		
ПЦР		СМЖ, кровь, сыворотка	Кровь, сыворотка, СМЖ, проба из раны, амниотическая жидкость	Кровь, сыворотка, амниотическая жидкость	Кровь, сыворотка (матери и новорожденного), проба тканей
Культуральные методы	Секрет из полости носа и носоглотки	Мазок из раны и слизистых		Моча, слюна, амниотическая жидкость	
Прямое определение антигена		Мазок из раны и слизистых	Мазок из раны		

## Краснуха

Синдром врожденной краснухи — тяжелое заболевание. Со времени введения вакцинации против краснухи это заболевание стало редким в США; оно отмечается у младенцев, рожденных женщинами-эмигрантками из стран, где нет программ контроля за краснухой или они приняты недавно. Характерные проявления — глухота из-за поражения слухового нерва, катаракта, порок сердца и неврологические нарушения. Пурпурная сыпь, получившая название «кекс с голубикой», в классическом варианте сопутствует синдрому врожденной краснухи; она обусловлена гемопозом вне костного мозга. От 10 до 20% детей с синдромом врожденной краснухи будут иметь задержку развития. Риск врожденных аномалий наивысший, когда мать заражается в первом триместре беременности.

## HSV

HSV признается наиболее частой причиной болезни новорожденных, полученной при рождении. Эта форма болезни называется «неонатальный HSV» и обсуждается ниже в разделе «Вирус простого герпеса». Врожденный HSV встречается относительно редко (~5% неонатальных случаев). Синдром характеризуется пузырьками или язвами на коже, хориоретинитом, микрофтальмом, микроцефалией и гидранцефалией; он возникает в результате первичной или рекуррентной инфекции матери [7]. Также была описана водянка плода (*hydrops fetalis*).

## CMV

CMV — самый распространенный врожденный патоген в США, поражающий ~1% всех новорожденных ежегодно. Приблизительно 90% младенцев с врожденным CMV не имеют симптомов. Однако со временем у 10–15% из них возникают потеря слуха или другие неврологические, зрительные нарушения, а также проблемы развития. У 10% новорожденных с симптомами при рождении может проявиться изолированная гепатоспленомегалия, желтуха и сыпь (обычно петехии), но почти у половины болезнь более тяжелая: к вышеупомянутым симптомам могут добавиться хориоретинит, мозговые кальцификаты, микроцефалия, судороги и респираторный дистресс-синдром [8, 9]. Летальность в этих случаях может достигать 12–30%, у выживших остаются признаки поражения нервной системы и дефекты развития.

## VZV

Приблизительно 24% эпизодов первичного VZV во время беременности заканчиваются внутриутробным заражением [10]. Врожденная инфекция может быть бессимптомной, вызывать потерю плода или приводить к врожденному синдрому варицеллы. Врожденный синдром варицеллы был выявлен у 9 (0,7%) из 1373 женщин, зараз-

ившихся во время беременности [11]. В этом исследовании наивысший риск в период беременности соответствовал 13–20 нед. гестации (7 младенцев на 351 беременность — 2%). Только 2 случая пришлось на 472 беременности (0,4%), когда мать заражалась вирусом варицелла зостер до 13 нед. гестации. Когда заражение происходило после 20 нед. гестации, случаев не отмечено. Характерные для этого синдрома проявления — поражения кожи или рубцы дерматомальной локализации, неврологические нарушения, глазные болезни, аномалии скелета (гипоплазия конечностей). Около 30% младенцев с врожденным синдромом варицеллы умирают в первые месяцы жизни, а у выживших наблюдается задержка развития [12]. Заражение в конце беременности может привести к рождению ребенка с диссеминированной варицеллой, осложненной гепатитом и/или пневмонией.

### Парвовирус В19

Согласно оценкам, парвовирусом В19 инфицировано 25–50% плодов женщин, заразившихся во время беременности [13]. В большинстве исследований потеря плода из-за парвовируса В19 случалась у <5% инфицированных беременных. Большинство новорожденных с врожденной парвовирусной инфекцией не имеют симптомов. Редко наблюдается неиммунная водянка плода; меньшая часть (~10%) случаев водянки плода обусловлена парвовирусом [13]. Отмечались также аномалии ЦНС в связи с врожденным парвовирусом [14].

### Лабораторное исследование

#### Краснуха

Следует проводить диагностику краснухи, если подтверждена инфекция матери или новорожденного с клиническими признаками врожденной вирусной инфекции. Младенцы с синдромом врожденной краснухи выделяют вирус месяцами, создавая потенциальный риск для восприимчивых лиц. Диагноз подтверждается изоляцией вируса краснухи из назальных выделений. Вирус также можно выделять из глоточных мазков, крови, мочи и СМЖ. Дополнительно можно провести серологическую (IgM) и молекулярную диагностику [15].

#### HSV

Описанный ниже подход к диагностике неонатального HSV также применим для врожденного HSV.

#### CMV

Диагностику врожденной инфекции CMV следует проводить в случаях, когда имеется документальное подтверждение, что мать заразилась CMV во время беременности, или у новорожденных с клиническими

признаками врожденной вирусной инфекции. Предпочтительными методами являются клеточная культура и ПЦР. У матерей с подтвержденной инфекцией во время беременности для пренатальной диагностики врожденного CMV можно брать образец амниотической жидкости после 21–23 нед. гестации (не раньше 6–9 нед. после заражения матери) [16, 17]. Выявление вируса в первые две недели постнатальной жизни свидетельствует о врожденной инфекции, а не о приобретенной во время или после родов. Высокие количества CMV обнаруживаются в моче и слюне новорожденных с врожденной инфекцией — это идеальные образцы для выделения в культуре. ПЦР-исследование крови или респираторных секретов, взятых у новорожденного в первые две недели жизни, также можно использовать для диагностики врожденного CMV. Выявление CMV-специфических IgM-антител не является чувствительным способом диагностики врожденной инфекции CMV.



## VZV

Диагностика врожденного синдрома ветряной оспы основана на выявлении анти-VZV IgM, вирусных нуклеиновых кислот с помощью ПЦР или прямого выявления VZV-антигена. Выявление вируса может оказаться невозможным, поскольку период репликации вируса приходится на ранние сроки гестации. Однако, если имеются везикулярные поражения, их содержимое можно протестировать на антиген VZV иммунофлуоресцентным или иммунопероксидазным методом или на ДНК VZV методом ПЦР. Исследовать наличие ДНК VZV можно и в других образцах — сыворотке или плазме, СМЖ или амниотической жидкости. Культуральный метод не используется в диагностике VZV из-за его низкой чувствительности.

## Парвовирус B19

Выявление нуклеиновых кислот парвовируса B19 считается наилучшим методом диагностики врожденной инфекции. Более подробно диагностика парвовируса B19 обсуждается ниже.

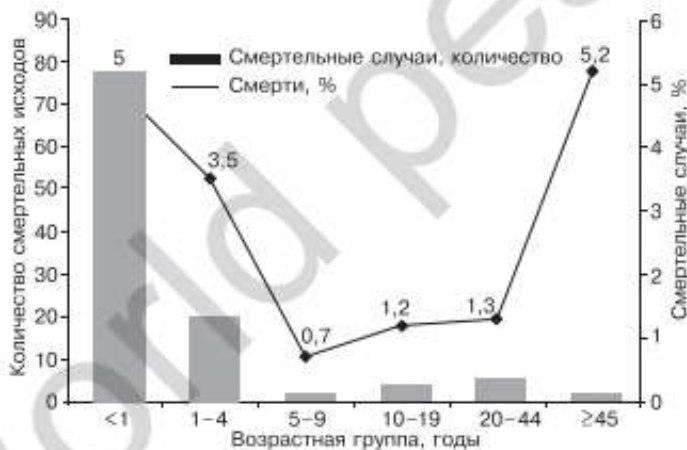
## Энтеровирусы (не полио)

Энтеровирусы — мелкие безоболочные одноцепочные РНК-вирусы, относящиеся к семейству Picornaviridae. Энтеровирусы классически подразделяются на четыре подрода в зависимости от их патогенности для человека и экспериментальных животных: коксакивирусы групп А и В, эховирусы и энтеровирусы [18]. Каждый подрод содержит уникальные серотипы, которые можно отличить друг от друга на основании нейтрализации специфичными антисыворотками. Не так давно идентифицированные энтеровирусы человека были пронумерованы в порядке их выявления как серологически различные штаммы (энтеровирусы 68–71). Благодаря молекулярным методикам появилась

новая схема классификации, в которой не полио энтеровирусы классифицируются на основании гомологии области РНК, кодирующей VP1-белок капсида [19]. Многие новые энтеровирусы были описаны с помощью молекулярных инструментов, и количество известных серотипов превысило 90 [20].

### Эпидемиология

Энтеровирусы распространены по всему миру; люди заражаются повторно в течение всей жизни, но клинически значимые заболевания возникают у младенцев и маленьких детей (рис. 14.1) [20]. В США энтеровирусные инфекции чаще возникают летом и осенью. В ходе обширного исследования, проведенного Центрами по контролю и профилактике заболеваний и охватившего период с 1970 по 2005 г., 78% положительных образцов было собрано с июня по октябрь [21]. Это и другие исследования показали, что преобладающие серотипы меняются со временем, и в зависимости от серотипа заболеваемость может носить эпидемический либо эндемический характер (табл. 14.2) [21, 22].



**Рис. 14.1.** Количество и доля фатальных исходов от заражения энтеровирусом по возрастным группам (Национальная система надзора за энтеровирусами, США, 1983–1998)

### Клинические проявления

Клинические проявления инфекции варьируют от бессимптомных или субклинических форм до манифестных, включающих лихорадку, сыпь, конъюнктивит, поражение центральной нервной системы, плеврдинию и миоперикардит. Специфические проявления и тяжесть варьируют в зависимости от возраста и иммунного статуса, подгруппы или серотипа энтеровируса.

Таблица 14.2

Распределение 15 наиболее упоминаемых серотипов не полио энтеровирусов, согласно Национальной системе надзора, США, 2002–2004

	2002 (n = 710)		2003 (n = 1811)		2004 (n = 1109)		2002–2004 (n = 3630)	
	Серотип	%	Серотип	%	Серотип	%	Серотип	%
1	Эхо 7	22,5	Эхо 9	41,0	Эхо 30	40,3	Эхо 9	30,4
2	Эхо 9	21,5	Эхо 30	32,4	Эхо 9	18,9	Эхо 30	29,1
3	Коксаки В1	10,8	Коксаки В1	4,6	Коксаки А9	6,9	Эхо 7	5,0
4	Эхо 11	6,8	Коксаки В4	2,0	Коксаки В5	5,2	Коксаки В1	4,6
5	Коксаки В5	8,0	Коксаки А9	2,7	Коксаки В4	4,7	Коксаки А9	3,8
6	Коксаки В3	4,1	Коксаки А24	2,5	Эхо 18	4,3	Коксаки В5	3,4
7	Эхо 4	4,1	Эхо 11	1,8	Коксаки В3	2,6	Коксаки В4	3,1
8	Эхо 6	3,4	Коксаки В5	1,7	Коксаки В2	2,3	Эхо 11	2,0
9	Эхо 30	3,3	Энтеровирус 71	1,4	Эхо 11	2,2	Коксаки В3	2,2
10	Эхо 18	2,8	Коксаки В3	1,1	Эхо 6	2,0	Эхо 18	2,0
11	Коксаки В2	2,7	Эхо 5	0,9	Коксаки А1	1,4	Коксаки В2	1,7
12	Эхо 13	2,7	Эхо 7	0,9	Эхо 13	1,3	Эхо 6	1,4
13	Коксаки А9	1,7	Коксаки В2	0,9	Эхо 5	1,1	Энтеровирус 71	1,3
14	Энтеровирус 71	1,6	Энтеровирус 68	0,7	Энтеровирус 71	1,0	Коксаки А24	1,2
15	Эхо 3	1,3	Эхо 13	0,7	Коксаки В1	0,7	Эхо 13	1,2
Всего (15)	94,3		96,2		94,9		93,3	

Источник: [22]



## Болезни с сыпью

Энтеровирусные инфекции могут сопровождаться различными видами сыпи; чаще всего она ассоциирована с экзавирусами и коксакивирусами. Может появляться неспецифической макулопапулезной сыпью или петехиями/пурпурой (табл. 14.3). Два вида характерной сыпи — герпангина (везикулярная экзантема на задней части глотки), а также синдром поражения кистей, стоп и рта (характеризуется маленькими глубокими пузырьками на ладонях и подошвах, гениталиях и во рту на языке и слизистой щек). Как герпангина, так и синдром поражения кистей, стоп и рта выявляются преимущественно у детей; их причина — вирус Коксаки А. Синдром кистей, стоп и рта также может быть ассоциирован с энтеровирусом 71, особенно в сочетании с поражением центральной нервной системы.

Таблица 14.3

Распространенные детские вирусные инфекции с типично генерализованной невезикулярной сыпью

Вирус	Классическое название	Современное название и описание сыпи
кори	«Первая болезнь»	<i>Корь</i> : генерализованная эритематозная или макулопапулезная сыпь после prodromы лихорадкой, острый ринит и конъюнктивит. Сначала сыпь появляется на голове, шее и плечах, переходя на верхние конечности и туловище, нижние конечности. До появления сыпи на слизистой щек могут появиться пятна Коплика
краснухи	«Третья болезнь»	<i>Краснуха</i> : генерализованная эритемная макулопапулезная сыпь. Сыпь появляется на лице, распространяется вниз по телу
энтеровирус	«Четвертая болезнь» (болезнь Дьюка) <sup>a</sup>	<i>Генерализованные сыпи</i> : макулопапулезная, петехиальная сыпь или пурпура. Синдром поражения рук, ног и рта: маленькие пузырьки на кистях и подошвах, гениталиях, на языке и слизистой щек. <i>Герпангина</i> : везикулярная экзантема задней части глотки
парвовирус B19	«Пятая болезнь»	<i>Инфекционная эритема</i> : prodrom с лихорадкой, насморком, головной болью и диареей, затем эритемная скуловая сыпь, обычно сопровождаемая генерализованной рекулярной
HGV-6	«Шестая болезнь»	<i>Внезапная экзантема/розеола</i> : генерализованная эритемная макулопапулезная сыпь, внезапно возникающая после разрешения лихорадки, длится 1–3 сут. <i>Генерализованная сыпь</i> : у детей может возникнуть генерализованная эритемная макулопапулезная сыпь на фоне лихорадки и других симптомов

<sup>a</sup> Этиология «четвертой болезни» неясна. Сейчас считается, что это может быть неправильно диагностированная корь, краснуха, энтеровирус или сыпь из-за стафилококкового токсина. Термин сейчас не используется. «Вторая болезнь» обусловлена *Streptococcus pyogenes*. Термин больше не используется

## Инфекции центральной нервной системы

Инфекции центральной нервной системы, вызванные энтеровирусами, первично возникают у маленьких детей. Самым распространенным проявлением энтеровирусной инфекции является менингит, энцефалит встречается редко (исключение — новорожденные). До 99% вирусных менингитов установленной этиологии связаны с энтеровирусами [23]. Для сравнения: как причина вирусного энцефалита энтеровирус занимает место после вирусов простого герпеса и арбовирусов. Хронический энцефалит/менингит может возникать у лиц с дефектами функции В-клеток, особенно у детей с X-связанной агаммаглобулинемией. Энтеровирус 71, как и полиовирусы, поражая ядра мотонейронов головного и клетки передних рогов спинного мозга, может вызывать острый паралич. Сообщалось о вызванных этим серотипом крупных вспышках с тяжелыми проявлениями, включая энцефалит и скоротечную инфекцию с высоким уровнем летальности [24, 25].

## Инфекция новорожденных

Новорожденные в высокой степени подвержены тяжелым, часто скоротечным энтеровирусным инфекциям, характеризующимся сепсисоподобным синдромом, гепатитом, миокардитом или инфекцией центральной нервной системы. Чаще всего возбудителями оказываются коксакивирусы и эховирусы [26]. Энтеровирусы могут передаваться матерью ребенку при родах. Обычно у таких матерей имелось лихорадочное заболевание на последней неделе беременности. Описаны вспышки в отделениях новорожденных, что свидетельствует о недостатках в системе контроля за инфекциями [27].

## Лабораторное исследование

Энтеровирусные инфекции в большинстве случаев можно диагностировать, выделяя вирус, выявляя вирусные нуклеиновые кислоты или с помощью сероконверсии.

## Типы образцов

Можно культивировать или непосредственно выявлять энтеровирусы из множества образцов. В идеале образец нужно получать из очага как можно скорее после появления симптомов. Например, оптимальный образец для диагностики заболевания центральной нервной системы — СМЖ. Если нельзя получить образец из очага болезни, можно взять образцы стула, мазки ректальный и из зева. Однако следует признать, что у детей энтеровирусы выделяются со стулом в течение нескольких недель после начала заболевания.

## Выделение вируса

Для изоляции вируса используется клеточная культура. Рутинно культуры поддерживаются до двух недель, но цитопатический эффект энтеровируса обычно проявляется на 2–6 сут.

## Идентификация/типирование

Изоляты можно идентифицировать как энтеровирусы с помощью группоспецифичных реактивов, таких как группоспецифичные моноклональные антитела, или по результатам серотипирования (в реакциях специфической нейтрализации, фиксации комплемента, торможения геммагглютинации, с типоспецифическими моноклональными антителами).

## Определение нуклеиновых кислот

Прямое обнаружение энтеровируса при помощи ПЦР имеет высокую чувствительность в большинстве клинических случаев и может быть проведено быстро. ПЦР явно более специфична, чем культуральный метод при выявлении энтеровирусов в СМЖ [28–30], в крови, мазках из зева, моче и стуле [31, 32].

## Серологическое исследование

Серологическую диагностику можно проводить путем либо серотипо-, либо группоспецифичного тестирования. Серотипоспецифичное тестирование чаще всего проводится по реакции нейтрализации и на практике выполняется, только когда есть подозрение на определенный серотип. Нужна парная сыворотка: одну берут как можно скорее после начала болезни, вторую — через 2–4 нед. Четырехкратное увеличение титров IgG указывает на свежую инфекцию. Разработаны пробы для IgM-антител, однако их чувствительность вариабельна и широко они не используются.

## Парвовирус человека В19



Парвовирус человека В19 — мелкий безоболочный одноцепочный ДНК-вирус — был первым описанным патогеном человека из семейства Parvoviridae (другие — аденоассоциированный вирус и бокавирус человека).

## Клинические проявления

Клинические проявления парвовирусной инфекции зависят от возраста и сопутствующей патологии. У здоровых детей болезнь протекает в нетяжелой форме, классическое начало — инфекционная эритема, или «пятая болезнь» (см. табл. 14.3). Эритема сопровождается лихорадкой и неспецифическими симптомами, такими как насморк и эритематозная скуловая сыпь, не переходящая на околоротовую зону. Сыпь может сопровождаться генерализованной сетчатой сыпью.

Эритематозная сыпь может неделями то усиливаться, то ослабевать в ответ на различные стимулы. У подростков и взрослых, особенно у женщин, парвовирусная инфекция может сопровождаться артралгиями и артрозами мелких суставов. У лиц с патологией эритроцитов (серповидноклеточная анемия, талассемия и пр.) или пониженной выработкой эритроцитов (дефицит железа, анемия и пр.) парвовирусная инфекция может проявляться в виде транзиторного анемического кризиса, приводящего к резкому падению гематокрита из-за подавления гемопоэза. Он диагностируется по отсутствию ретикулоцитов в мазке периферической крови. У пациентов с нарушенным иммунитетом разрешение парвовирусной инфекции может затянуться. В этих случаях она становится хронической, осложняется анемией, панцитопенией, гепатитом, миокардитом или пневмонией [33]. У пациентов с подавленным иммунитетом парвовирусная инфекция лечится ослаблением иммуносупрессии и внутривенным введением иммуноглобулина.

### *Эпидемиология*

Большинство людей в течение жизни заражаются парвовирусом. Около 50% детей к 10 годам и не менее 60–70% взрослых имеют антитела к этому вирусу [34].

### *Лабораторное исследование*

Выбор метода диагностики зависит от клинических условий. При отсутствии нарушений иммунитета предпочтительнее серологические методы (выявление IgM- и IgG-антител). IgG появляются вскоре после инфицирования; считается, что IgG сохраняются пожизненно. В исследовании пациентов с инфекционной эритемой IgM были обнаружены 97% пациентов и только в 1% без инфекции [35]. В 83% случаев IgM персистировали от 4 до 6 мес. после инфекции. Для сравнения: вирусная ДНК была выявлена в 94% случаев острой инфекции и отсутствовала у пациентов без инфекции, но с IgG и IgA. В отличие от IgM, вирусная ДНК не обнаруживалась через 4–6 мес. после инфицирования. Наилучший метод диагностики врожденной инфекции или инфекции у пациентов с нарушениями иммунной системы — выявление нуклеиновых кислот.

### *Виды образцов и их обработка*

Для выявления IgM- или IgG-антител можно использовать единственный образец сыворотки. Выявлять парвовирусную ДНК можно в разных видах образцов, однако предпочтительны сыворотка или пораженная ткань.

### *Выявление нуклеиновых кислот*

Наиболее чувствительный метод выявления парвовируса В19 — ПЦР. В течение нескольких недель после инфицирования (но не позже

4–6 мес.) выявляются низкие уровни вирусной ДНК [35]. Для диагностики врожденной инфекции на момент выявления неиммунной водянки плода полезно выявлять ДНК парвовируса В19 в сыворотке матери [36].

#### Серологическое исследование

ИФА считается наиболее чувствительным и специфичным способом выявления антител к парвовирусу В19.

### Герпесвирусы человека

Семейство герпесвирусов человека включает вирусы простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус варицелла зостер (VZV), цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна—Барр (ЭБВ), герпесвирус человека 6 (ГВЧ-6), герпесвирус человека 7 (ГВЧ-7) и герпесвирус человека 8 (ГВЧ-8). Герпесвирусы человека — крупные двуцепочные ДНК-вирусы, распространены повсеместно. В этой главе рассматриваются аспекты, характерные для детей и не затрагиваемые в других главах.

#### Вирус простого герпеса

К 12–19 годам почти 44% детей приобретают HSV-1 и 6% — HSV-2 [37]. Количество сероположительных лиц с HSV-1 увеличивается с возрастом, достигая приблизительно 90% у людей от 70 лет и старше. Количество сероположительных лиц с HSV-2 увеличивается в молодости, достигая 25–28% у людей после 30 лет. В этом разделе акцент делается на распространенные клинические проявления у детей и меры по лечению. В других главах этой книги рассматриваются детали HSV (герпесный энцефалит обсуждается в гл. 21, генитальный герпес — в гл. 22).

#### Клинические проявления

**Неонатальный HSV.** Неонатальный герпес, хотя встречается редко, является угрожающей жизни инфекцией, и у выживших могут возникать осложнения хронического характера. Чаще причиной является HSV-2, но иногда — и HSV-1. В большинстве случаев неонатального герпеса заражение происходит при родах, реже — это врожденные и послеродовые инфекции. Клинические проявления: 1) генерализованная инфекция с характерным вовлечением многих органов, в том числе легких, печени, кожи и/или головного мозга; 2) инфекция ЦНС в виде энцефалита с наличием или отсутствием поражения кожи; 3) инфекция кожи, глаз, рта, характеризующаяся везикулярной сыпью, конъюнктивитом и/или выделением вируса из ротоглотки.

На основании типа вируса и классификации болезни можно предсказать заболеваемость и смертность [38]. Хотя разработка эффективных схем лечения ацикловиром значительно повысила выживаемость и функциональный результат, при генерализованной инфекции и ин-

фекции ЦНС тяжесть заболевания и летальность остаются высокими. Самая высокая смертность (~30%) наблюдается при генерализованной инфекции. Смертность при инфекции ЦНС составляет ~4%, но у значительной части выживших (70%) выявляются неврологические остаточные явления и нарушения развития [39]. Раннее начало противовирусной терапии улучшает исход неонатального герпеса [40]. Поэтому ранняя диагностика неонатального HSV, быстрое лабораторное подтверждение и эмпирическая терапия ацикловиром имеют решающее значение. Это непросто, так как неонатальный HSV у новорожденных может иметь неспецифические проявления, такие как сонливость и отказ от питания.

**Герпес полости рта и гингивостоматит.** Большинство инфекций HSV-1, приобретенных вне неонатального периода, протекает бессимптомно или субклинически. Гингивостоматит — самый распространенный клинический синдром первичной инфекции у маленьких детей. Гингивостоматит характеризуется болезненными везикулярно-язвенными высыпаниями на небе, деснах, языке и губах. Глотание и слюноотделение вызывают значительный дискомфорт. У пациентов может отмечаться лихорадка, головная боль, раздражительность и шейная лимфаденопатия. Из-за сильной боли и гидратации может потребоваться госпитализация. У детей постарше и взрослых может наблюдаться фарингит. Рецидивирует как лабиальный герпес (обычно единичное, возможно множественные болезненные элементы поражения на границе губы).

**Инфекции кожи и герпетический панариций.** Герпетический панариций — менее распространенная форма HSV-инфекции у детей [41]. Панариции могут возникать в результате аутоинокуляции вируса при герпесе полости рта или инфицировании от другого лица. Герпетический панариций обычно появляется на пальцах рук, но могут вовлекаться и другие области тела, включая пальцы ног и лицо. Поражения характеризуются эритемой и болезненными пузырьками, часто в этих случаях детям ставится диагноз бактериальной инфекции.

#### Лабораторное исследование

HSV можно диагностировать многими способами, включая серологию, прямое выявление антигена в реакции флуоресценции, выделение в культуру и выявление нуклеиновых кислот. Учитывая тяжесть диагноза неонатального герпеса и возникающие иногда диагностические сложности, полезно использовать более одного метода. Классический золотой стандарт диагностики HSV-инфекций — выделение вируса в культуру, но ПЦР благодаря своей высокой чувствительности и скорости значительно улучшила диагностику.

**Типы образцов.** Важно получить СМЖ и сыворотку или плазму для ПЦР-диагностики неонатального герпеса.

Выделение вирусов из СМЖ обладает низкой чувствительностью, поэтому не проводится. Обычно делают мазки с конъюнктивы, носо-



ЛАНЬ

глотки и прямой кишки, а также соскобы подозрительных поражений кожи и слизистых, поместив их в среду для транспортировки вирусов для проведения прямой флуоресценции антител и посева. HSV-гингивостоматит можно диагностировать по соскобу пораженного участка слизистой ротовой полости, образец помещают в среду для транспортировки вирусов.

**Определение антигена.** Антиген обычно выявляют в образцах соскоба слизистых оболочек или области поражений. Существует несколько методик, в том числе выявление флуоресцирующих антител, иммунопероксидазная и ферментная пробы. В целом эти методы не так чувствительны, как культуральный, но выполняются быстро и могут быть полезны в диагностике новорожденных.

**Выявление нуклеиновых кислот.** Диагностика неонатального HSV стала быстрее благодаря применению ПЦР, которая выявляет HSV и в СМЖ, и в крови с высокой чувствительностью [42–44]. Результат интерпретируют в соответствии с клинической формой и течением болезни. Важно отметить, что отрицательный результат не исключает HSV. Было показано, что только 24% образцов СМЖ, полученных до 3 сут. болезни были положительными [45]. При подтвержденном заболевании ЦНС следует провести анализ образца СМЖ в конце лечения для подтверждения эрадикации вирусной ДНК. Если к этому времени ДНК еще присутствует, следует продолжать противовирусную терапию до получения отрицательного результата [43].

**Выделение вируса.** Для изоляции HSV из мазков слизистых оболочек или поражений обычно проводится посев. HSV можно изолировать на разных клеточных культурах. Если обнаружен цитопатический эффект, важно провести дополнительные тесты для идентификации HSV и его подтипа. Разработаны быстрые культуральные методы, позволяющие выявить HSV до того, как проявится цитопатический эффект. Этот подход включает осаждение образца на монослой клеток с помощью центрифуги и проведение антигенных тестов между 16 и 48 ч после инокуляции.

**Системы типирования.** Установить подтип можно с помощью определения антигена, культуры и ПЦР.

**Серологическое исследование.** Серология, позволяющая различить антитела к HSV-1 и HSV-2, может стать дополнительным методом в случае, когда диагноз остается под вопросом — особенно у новорожденных. В основе специфических HSV-тестов лежит выработка антигена на типоспецифический гликопротеин G (gG). Существуют различные методики, в том числе вестерн-блот и ИФА. Предполагается, что сыворотка острого периода у новорожденного, зараженного HSV в родах, будет отрицательной или будет соответствовать материнским антителам. Серология, полученная через 6–12 мес. после болезни, отражает собственный иммунный ответ младенца.

*Вирус варицелла зостер (VZV)*

См. гл. 17.

### Вирус Эпштейна–Барр (EBV)

См. гл. 24

### Цитомегаловирус (CMV)

См. «Врожденная инфекция» выше. Также см. гл. 24 — обсуждение цитомегаловируса у пациентов с нарушенным иммунитетом.

### Герпесвирус человека 6 (HGV-6)

См. гл. 24 — обсуждение герпесвируса у пациентов с нарушенным иммунитетом.

Герпесвирус человека 6 (HGV-6) относится к роду *Roseolovirus* подсемейства  $\beta$ -герпесвирусов человека. Как и с другими герпесвирусами, после первичного заражения наступает латентный период. Существует два подтипа HGV-6: тип А и тип В (соответственно HGV-6А и HGV-6В); они имеют общие биологические свойства и высокую гомологию последовательности, но различаются по эпидемиологии.

Иногда HGV-6 интегрируется в хромосомы хозяина. По оценкам, такое случается у 0,2–0,8% населения [46, 47]. Интегрированная вирусная ДНК имеется в каждой клетке организма как результат присутствия вирусной ДНК в зародышевых клетках. Высокие уровни вирусной ДНК выявляются в сыворотке, цельной крови и СМЖ таких лиц [48–50]. Неизвестно, есть ли клинические последствия такой интеграции.

### Эпидемиология

HGV-6В наблюдается повсеместно, инфицируя практически всех детей в первые 2–3 года жизни [51], пик приходится на 9–21 мес. жизни [52]. Эпидемиологическая и клиническая значимость HGV-6А во многом не установлены.

### Клинические проявления

У большинства детей (94%) при первичной инфекции HGV-6В возникают клинические признаки и симптомы. Самые распространенные — лихорадка (58%), спутанность сознания (57%) и насморк (66%), реже бывают кашель (34%), рвота (8%), диарея (26%) и розеола (24%) [52]. По сравнению с другими болезнями раннего детства при HGV-6В больше вероятность лихорадки, спутанности сознания, диареи, сыпи и розового лишая (сильная лихорадка с последующей сыпью и снижением температуры) и выше потребность в помощи педиатра [52]. Первичная инфекция HGV-6В описана у 10–20% маленьких детей, неотложно осмотренных по поводу лихорадки. В этих случаях HGV-6В был ассоциирован с лихорадкой, раздражительностью, средним отитом, розеолой и судорогами [53, 54]. У маленьких детей HGV-6В также может быть причиной энцефалита [55]. Огромное большинство



документированных инфекций обусловлено HGV-6B [52–54]. Эпидемиология и клинические признаки инфекции, связанные с заражением HGV-6A, остаются недостаточно изученными.

#### Лабораторное исследование

Диагностика HGV-6 может оказаться затруднительной из-за высокой распространенности инфекции и персистенции вируса. Инфекции HGV-6 чаще всего диагностируются выявлением нуклеиновых кислот вируса. Другие методы — серология и выделение вируса.

**Типы образцов.** HGV-6 можно выявить во многих типах клеток и образцах, включая СМЖ, кровь и слюну. Типичные образцы для диагностики HGV-6 — СМЖ, плазма или сыворотка, цельная кровь или мононуклеары периферической крови.

**Выявление нуклеиновых кислот.** Выявление вирусных нуклеиновых кислот может свидетельствовать об активной или латентной инфекции в зависимости от клинических признаков и тестируемого образца. Могут возникнуть затруднения при интерпретации результата выявления вирусной ДНК во фракциях цельной крови с помощью ПЦР, поскольку вирус локализуется в мононуклеарах. Количественные методы ПЦР повышают диагностическую ценность, поскольку можно установить уровень, свидетельствующий об активной инфекции. Уровень ДНК HGV-6 в плазме или сыворотке хорошо коррелирует с показателями активной репликации и поэтому легко интерпретируется [56–60]. ПЦР обратной транскрипции выявляет мРНК и указывает на активную репликацию вируса, даже когда тестируются только мононуклеары периферической крови [61]. Описаны также методы выявления антигенемии [62], но чтобы понять их преимущества и ограничения, нужны дальнейшие исследования.

У лиц с хромосомной интеграцией HGV-6 будут стойко определяться высокие уровни ДНК HGV-6. Для подтверждения интеграции ДНК HGV-6 в хромосому человека можно использовать флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) [48]. Интегрированную вирусную ДНК также можно обнаружить в необычных тканях/образцах, таких как волосные фолликулы [49]. Если сложно провести эти исследования, полезно сравнить ожидаемые уровни интегрированной и неинтегрированной ДНК HGV-6. Уровни ДНК HGV-6 у пациентов с хромосомной интеграцией значительно выше, чем у пациентов с неинтегрированной латентной инфекцией — как в цельной крови ( $>10^6$  копий/мл крови, или  $>1$  копии на лейкоцит против  $\sim 10^2$  копий/мл крови, или 1 копия на  $10^5$  лейкоцитов), так и в сыворотке ( $10^{4.6}$ – $10^{6.4}$  копий/мл сыворотке против невыявляемого) [49]. Документально зафиксировано, что уровни при хромосомной интеграции обычно выше, чем при первичной инфекции [50]. Кроме того, уровни ДНК HGV-6 при хромосомной интеграции не снижаются на фоне противовирусной терапии. Бывает трудно отличить хромосомную интеграцию от активной инфекции, поэтому интерпретация положительного результата ПЦР должна учитывать возможность такой интеграции.

**Выделение вируса.** ДНК HGV-6 при первичной инфекции можно изолировать из мононуклеаров периферической крови, обычно в совместной культуре с лимфоцитами пуповинной крови. Выделение HGV-6 из крови указывает на активную вирусную инфекцию. Однако эта методика подразумевает до 3 нед. интенсивной работы и поэтому не используется в большинстве клинических лабораторий. Разработаны методики быстрой вирусной культуры, но они доступны не всем [63].

**Системы типирования.** Подтипы HGV-6 дифференцируются преимущественно с помощью ПЦР, в том числе ПЦР в реальном времени, основанную на кривых плавления или вариантоспецифичных праймерах [64, 65].

**Серологическое исследование.** У серологических методов много ограничений, в том числе наличие материнских антител в условиях первичной инфекции и ненадежность проб антител у пациентов с сильным нарушением иммунитета. Серологические пробы авидности антител основаны на том, что в ходе первичной инфекции IgG-антитела имеют низкую авидность, но по мере созревания иммунного ответа вырабатываются антитела с более высокой авидностью [66]. Это позволяет отличить иммунный ответ на первичную инфекцию от материнских антител или хронической инфекции. В настоящее время не существует типоспецифических тестов антител.

**Тестирование резистентности к противовирусным препаратам.** Было показано, что фоскарнет, ганцикловир и цидофовир *in vitro* ингибируют HGV-6. Первичная инфекция обычно проходит самостоятельно, и противовирусные препараты не показаны. Однако тяжелое заболевание, особенно у пациентов с нарушенным иммунитетом, лечится фоскарнетом или ганцикловиром. Недавно из клеточной культуры и от пациентов был выделен мутантный штамм HGV-6, имеющий аминокислотную замену в киназе pU69, фосфорилирующей ганцикловир — функциональная гомология продукта гена UL97 [67]. В будущем возможна разработка ПЦР-систем для выявления таких мутантов, которая сыграет свою роль в мониторинге резистентности у групп населения с нарушенным иммунитетом.

### Герпесвирус человека 7 (HGV-7)

Как и HGV-6, HGV-7 относится к роду *Roseolovirus* подсемейства  $\beta$ -герпесвирусов человека. HGV-7 имеет гомологию с HGV-6 [68], но отличается по клеточному тропизму, проникновению вируса, влиянию на клетки и по эпидемиологии.

### Клинические проявления

Аналогично HGV-6, заражение HGV-7 проявляется лихорадкой, сыпью, розеолой (лихорадка в течение 1–3 сут., разрешающаяся внезапным появлением генерализованной макулопапулезной сыпи), симптомами поражения верхних дыхательных путей, диареей и судорогами [69–71].

## Эпидемиология

Как и HGV-6, HGV-7 распространен повсеместно, инфицировано около 95% населения [72, 73]. Возрастной пик заражения приходится на 2–3 года (немного позже, чем для HGV-6).

## Лабораторное исследование

Клиническое лабораторное исследование на HGV-7 не стандартизировано и не выполняется рутинно в клинических лабораториях. Как и HGV-6, после первичной инфекции HGV-7 сохраняется пожизненно, латентно инфицируя лимфоциты. HGV-7 обычно выявляется в слюне после заражения, также был обнаружен в СМЖ.

**Выявление нуклеиновых кислот.** Описаны различные процедуры выявления ДНК HGV-7. Необходима дальнейшая работа для выяснения клинической значимости положительного результата ПЦР при конкретных клинических ситуациях и типах образцов.

**Выделение вируса.** Описан ряд методик выделения HGV-7. Можно применить подход, описанный для HGV-6 [74, 75].

**Серологическое исследование.** Многие ранние серологические тесты для HGV-7 давали перекрестную реакцию с HGV-6. Для дифференциальной диагностики HGV-6 и HGV-7 разработаны пробы ИФА, ТИФА и вестерн-блот. Как и для HGV-6, серологические методы имеют много ограничений, связанных с широким распространением вируса и хронической природой инфекции, а также ненадежностью проб антител у пациентов с тяжелым нарушением иммунитета. Для дифференциальной диагностики первичной инфекции HGV-7 и реактивации также были разработаны подходы, основанные на оценке avidности антител [76].

## Корь

Корь — заболевание, предотвращаемое вакцинацией; вызывается вирусом, входящим в семейство Paramyxoviridae, род *Morbillivirus*. Семейство Paramyxoviridae также включает вирус парагриппа человека (типы 1–4) и вирус эпидемического паротита.

### Клинические проявления

Типичный инкубационный период классической кори после контакта составляет 8–12 сут. Для болезни характерна продромальная фаза с лихорадкой, кашлем, насморком и конъюнктивитом. Через 3–4 дня симптомы усиливаются, и на 4–5 день появляется генерализованная макулопапулезная сыпь. Сначала сыпь локализуется на голове, шее и плечах, затем переходит на верхние конечности и туловище, затем на нижние конечности. Элементы сыпи могут сливаться в зонах, где она впервые появилась. Патогномоничные для кори пятна Коплика — мелкие эритемные поражения с белесыми приподнятыми

центрами, возникающие на слизистой щек перед появлением сыпи. Корь часто осложняется поражением верхних и нижних дыхательных путей, в том числе ларинготрахеитом, бронхитом, пневмонией и вторичной бактериальной инфекцией. У заболевших корью беременных женщин помимо указанных осложнений могут возникнуть гепатит, преждевременные роды и самопроизвольный аборт [77].

У привитых могут возникнуть видоизмененная корь или атипичная корь. Видоизмененная корь — легкая форма заболевания, для которой характерны слабая сыпь небольшой продолжительности. Она может возникнуть при отсутствии полного иммунного ответа на вакцину у получавших иммуноглобулин в качестве профилактики после контакта или у младенцев, имеющих остаточные материнские антитела. Атипичная корь возникает у лиц, получивших убитую вакцину (в США ее вводили в 1963–1967 гг.). Эта вакцина сенсibilizировала реципиента в отношении вируса кори, но не обеспечивала защиту. Для этой формы характерны лихорадка, пневмония, плевральный выпот и отек. Сыпь может быть макулопапулезной, петехиальной, пурпурной или как при крапивнице, но в отличие от типичной коревой она возникает на конечностях и распространяется на туловище. Сыпь может локализоваться на кистях и ступнях и отсутствовать на голове, шее и верхней части груди. Атипичная корь обычно проходит самостоятельно, однако возможны осложнения в виде дисфункции или недостаточности органов.

Неврологические осложнения кори встречаются редко, включают острый энцефалит, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM) и подострый склерозирующий панэнцефалит (SSPE). SSPE — исключительно редкое дегенеративное заболевание центральной нервной системы; считается, что оно обусловлено персистирующей инфекцией ЦНС и обычно приводит к смерти. В противоположность классической кори с типичным инкубационным периодом 8–12 сут., средний инкубационный период SSPE составляет 10 лет.

Уровень смертности при классической кори варьирует от 1 до 3 на 1000 заболевших. Риск смерти выше у маленьких детей, у плохо питающихся или пациентов с нарушенным иммунитетом, а также у беременных.

### Эпидемиология

До появления доступной вакцины корь была эндемична по всему миру. В США эпидемии возникали часто и давали свыше 500 000 случаев в год. Благодаря современному высокому уровню вакцинации ежегодная заболеваемость с 1997 г. составляет <1 случая на миллион человек [78]. Большинство этих случаев — завозные или из спорадических вспышек, связанных с завозными случаями [79]. Корь остается важной причиной детской заболеваемости и смертности во всем мире. По оценкам ВОЗ, в 2002 г. из-за кори умерли 5% детей младше 5 лет.

### Лабораторное исследование

Следует назначать лицам с клиническими признаками, соответствующими острой кори, не получившим прививку или с подозрением на контакт. Тестирование вероятных случаев надо проводить быстро, чтобы можно было принять своевременные меры для предотвращения дальнейшего распространения. Простейший подход к лабораторной диагностике классической кори — определение IgM-антител в образце сыворотки, полученном в фазе высыпаний. Чувствительность большинства IgM-проб меньше 100% в первые 72 ч высыпаний, но увеличивается до 100% на 4–10 сут. высыпаний [80]. Если исходный образец получен в первые 72 ч высыпаний и результат отрицательный, а сыпь у пациента не проходит после 72 ч, следует повторно взять образец. При интерпретации результатов у недавно привитых лиц могут возникнуть сложности. Вакцинация приводит к образованию IgM, выраженному на 1–8 нед. после иммунизации [81]. Диагностировать корь можно также серологически или выделением вируса из клинических образцов. Независимо от метода диагностики, ожидая результат, необходимо сообщить в органы здравоохранения о случаях подозрения на коревую инфекцию.

### Типы образцов и их обработка

Предпочтительный подход к диагностике классической кори — определение IgM в единственном образце сыворотки. При подозрении на SSPE можно провести тестирование антител как в сыворотке, так и СМЖ [82]. Для выделения вируса можно использовать мочу, кровь, респираторные секреты или ткани.

### Серологическое исследование

Наиболее чувствительный серологический метод — ИФА, в продаже имеется ряд чувствительных и быстрых наборов. Для диагностики кори можно использовать четырехкратное увеличение уровня IgG; однако нужны образцы сыворотки в острой фазе и фазе выздоровления (последний берут на 10–14 день после появления сыпи).

### Прямое выявление

Возможные методы диагностики кори — выявление вирусных антигенов (с использованием ИФА) или нуклеиновых кислот (с использованием ПЦР), хотя чувствительность этих методов не выше, чем IgM, при диагностике классической кори, а доступность меньше.

### Выделение вируса

Легче всего вирус изолируется из крови (лейкоциты) или респираторного секрета (назальный смыв) в продромальный период до 1–2 сут. высыпаний. Вирус можно изолировать на многих типах и линиях

клеточных культур. Лабораторию необходимо оповестить о том, что корь включена в дифференциальную диагностику.

### Эпидемический паротит

Вирус эпидемического паротита — одноцепочный РНК-вирус, относится к семейству Paramyxoviridae, куда входят также вирусы парагриппа человека и кори.

#### Клинические проявления

Типичное течение инфекции эпидемического паротита — субклиническое течение или нетяжелое. Обычно наблюдается невысокая температура в течение 3–4 сут., увеличение одной или обеих околоушных желез в течение 7–10 сут. Наиболее распространенные серьезные осложнения — энцефалит, глухота и орхит. До 15% случаев связаны с воспалением оболочек мозга. По отчетным данным, в 5 случаях эпидемического паротита из 1000 отмечен энцефалит [83]. Остаточные явления возникают редко, зарегистрированный уровень смертности от энцефалита приблизительно 1,4%. Глухота — одно из наиболее тяжелых и редких осложнений со стороны ЦНС. Она возникает у 0,5–5,0 на 100 000 зарегистрированных случаев эпидемического паротита. Осложнение в виде орхита (обычно одностороннего) встречалось в 20–30% клинических случаев у мужчин постпубертатного возраста. Умеренная атрофия яичек случается почти в трети случаев орхита, но к стерильности она приводит редко. Другие органы поражаются реже.

#### Эпидемиология

После введения живой вакцины от вируса эпидемического паротита в 1967 г. и рекомендации в 1977 г. применять ее уровень заболеваемости в США постепенно снижался. Несмотря на широкое использование вакцины, были вспышки инфекции на территории США. Не так давно, в 2006 г., отмечена крупная вспышка: болели в основном студенты колледжей (6584 случая), однако инфекция широко распространилась и включала все возрастные группы [84, 85]. Эта вспышка возникла среди вакцинированного населения — возможно, из-за низкого иммунного ответа. Однако считается, что высокая степень вакцинации предотвратила больший масштаб вспышки и более высокую степень осложнений [85].

#### Лабораторное исследование

Следует назначать любому пациенту с опуханием околоушных желез или другими проявлениями эпидемического паротита, особенно если был контакт с больными. Эпидемический паротит можно диагностировать выделением вируса в клеточной культуре, выявлением вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР или серологических методов. Серологические методы наиболее доступны, менее затратны и считаются

методом выбора для подтверждения инфекции. Если заболевают ранее вакцинированные лица, результаты анализа обычно отрицательные; поэтому в такой ситуации тест может подтвердить, но не исключить инфекцию [85]. Даже при отрицательном результате теста следует связаться с органами здравоохранения, если предполагаемый диагноз — эпидемический паротит.

### Типы образцов

Для серологических исследований можно использовать образцы сыворотки: единственный или парную сыворотку острой фазы и фазы выздоровления. Для выделения вируса подходят слюна, мазок из глотки, моча или СМЖ. Вирус присутствует в слюне в первые дни заболевания, в моче — целых две недели после появления симптомов. Лабораторию необходимо оповестить о том, что корь включена в дифференциальную диагностику.

### ПЦР

Выявление вирусной РНК с помощью ПЦР — чувствительный способ идентификации вируса эпидемического паротита; с его помощью следует выявлять этот вирус в образцах СМЖ.

### Выделение вируса

Для выделения вируса эпидемического паротита можно использовать разные клеточные культуры. Культуры обычно выращивают 14 сут. В клетках, зараженных вирусом эпидемического паротита, выявляется неспецифический цитопатический эффект, и, как другие парамиксовирусы, он вызывает гемадсорбцию. Вирус эпидемического паротита подтверждается в тесте ингибирования гемадсорбции (клеточные культуры предварительно обрабатывают специфическими антителами, которые будут блокировать гемадсорбцию, если клетки заражены вирусом), непрямым иммунофлуоресцентным окрашиванием или в тесте нейтрализации. Из этих трех методов чаще всего используется иммунофлуоресцентное окрашивание благодаря его чувствительности и простоте использования.

### Серологическое исследование

IgM и IgG можно выявить с помощью множества методов. Обнаружить IgG можно в перекрестной реакции с вирусспецифичными антителами к парагриппу [86]. Для IgM перекрестная реакция не используется; у многих ранее вакцинированных лиц при острой инфекции IgM не обнаруживаются [85].

### Краснуха

Вирус краснухи — мелкий оболочный РНК-вирус, входит в семейство *Togaviridae*. Инфекция на ранних сроках беременности имеет

серьезные последствия для плода (см. выше «Врожденные вирусные инфекции»), а инфекция вне фетального периода обычно нетяжелая или бессимптомная. Для выраженной постнатальной инфекции характерны лихорадка, лимфаденопатия и сыпь. Эта сыпь — эритемная макулопапулезная экзантема, классически появляющаяся на лице и распространяющаяся вниз по телу. По внешнему виду сыпь похожа на коревую, но отличается тем, что не темнеет, как при кори. Обсуждение краснухи см. выше в разделе «Врожденные вирусные инфекции».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365:1147–1152.
2. Jin S, Kilgore PE, Holman RC, et al. Trends in hospitalizations for diarrhea in United States children from 1979 through 1992: estimates of the morbidity associated with rotavirus. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15:397–404.
3. Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T, et al. Rotavirus Infection in Europe: Time for Effective Prevention? *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:S7 — S11.
4. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics* 2004; 113:1758–1764.
5. Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006:87–210.
6. Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O. Influenza A and B Virus Infections in Children. *Clin Infect Dis* 2003; 36:299–305.
7. Hutto C, Arvin A, Jacobs R, et al. Intrauterine herpes simplex virus infections. *J Pediatr* 1987; 110: 97–101.
8. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: Neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:93–99.
9. Kylat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. *Eur J Pediatr* 2006; 165:773–778.
10. Paryani SG, Arvin AM. Intrauterine infection with varicella-zoster virus after maternal varicella. *N Engl J Med* 1986; 314:1542–1546.
11. Enders G, Miller E. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: Prospective study of 1739 cases. *Lancet*; 1994; 343:1548–1551.
12. Sauerbrei A, Wutzler P. The congenital varicella syndrome. *J Perinatol* 2000; 20:548–554.
13. Koch WC, Harger JH, Barnstein B, et al. Serologic and virologic evidence for frequent intrauterine transmission of human parvovirus B19 with a primary maternal infection during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:489–494.
14. Katz VL, McCoy MC, Kuller JA, et al. An association between fetal parvovirus B19 infection and fetal anomalies: a report of two cases. *Am J Perinatol* 1996; 13:43–45.



15. Bosma TJ, Corbett KM, Eckstein MB, et al. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2881-2887.
16. Enders G, Bäder U, Lindemann L, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001; 21:362-377.
17. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, et al. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol* 2001; 21:47-55.
18. Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, et al. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997; 78:1-11.
19. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1288-1293.
20. Oberste MS, Maher K, Michele SM, et al. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 2005; 86:445-451.
21. Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, et al. Enterovirus Surveillance — United States, 1970-2005. *Morb Mortal Wkly Rep Surveill Summ* 2006; 55 (SS08):1-20.
22. CDC. Enterovirus Surveillance — United States, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55:153-156.
23. Berlin LE, Rorabaugh M, Heldrich F, et al. Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 1993; 168:888-892.
24. Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. *Clin Infect Dis* 2000; 31:678-683.
25. Lin TY, Chang LY, Hsia SH, et al. The 1998 Enterovirus 71 Outbreak in Taiwan: Pathogenesis and Management. *Clin Infect Dis* 2002; 34:S52-S57.
26. Khetsuriani N, Lamonte A, Oberste MS, et al. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:889-893.
27. Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, Daikos GL, et al. Clinical and epidemiological aspects of an enterovirus outbreak in a neonatal unit. *J Hosp Infect* 2002; 51:275-280.
28. Glimaker M, Johansson B, Olcen P, et al. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:547-557.
29. Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, et al. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 177-182.
30. Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L, et al. Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34:3002-3006.
31. Rotbart HA, Ahmed A, Hickey S, et al. Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:409-411.
32. Glimaker M, Abebe A, Johansson B, et al. Detection of enteroviral RNA by polymerase chain reaction in faecal samples from patients with aseptic meningitis. *J Med Virol* 1992; 38:54-61.
33. Eid AJ, Brown RA, Patel R, et al. Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases. *Clin Infect Dis* 2006; 43:40-48.

34. Gay NJ, Hesketh LM, Cohen BJ, et al. Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: how many women are infected in pregnancy? *Commun Dis Rep CDR Rev* 1994; 4:R104 — R107.
35. Erdman DD, Usher MJ, Tsou C, et al. Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J Med Virol* 1991; 35: 110–115.
36. Enders M, Weidner A, Rosenthal T, et al. Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops. *J Infect Dis* 2008; 197:58–62.
37. Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis* 2002; 185:1019–1024.
38. Whitley R, Arvin A, Prober C, et al. A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. *Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. N Engl J Med* 1991; 324:444–449.
39. Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, et al. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics* 2001; 108:230–238.
40. Whitley RJ, Corey L, Arvin A, et al. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. *J Infect Dis* 1988; 158:109–116.
41. Szinnai G, Schaad UB, Heininger U. Multiple herpetic whitlow lesions in a 4-year-old girl: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2001; 160:528–533.
42. Diamond C, Mohan K, Hobson A, et al. Viremia in neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:487–489.
43. Kimberlin DW, Lakeman FD, Arvin AM, et al. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. *J Infect Dis* 1996; 174:1162–1167.
44. Malm G, Forsgren M. Neonatal herpes simplex virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 81:F24 — F29.
45. De Tiege X, Heron B, Lebon P, et al. Limits of early diagnosis of herpes simplex encephalitis in children: a retrospective study of 38 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1335–1339.
46. Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol* 2007; 79:45–51.
47. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004; 73:465–473.
48. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 2006; 193:912–916.
49. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immuno-competent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1571–1574.
50. Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, et al. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1298–1304.

51. Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 1989; 27:651-653.
52. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005; 352:768-776.
53. Hall CB, Long CE, Schnabel KC, et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994; 331:432-438.
54. Zerr DM, Frenkel LM, Huang ML, et al. Polymerase chain reaction diagnosis of primary human herpesvirus-6 infection in the acute care setting. *J Pediatr* 2006; 149:480-485.
55. Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, et al. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2005; 90:619-623.
56. Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, et al. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis* 1998; 178:1250-1256.
57. Huang LM, Kuo PF, Lee CY, et al. Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma. *J Med Virol* 1992; 38:7-10.
58. Suga S, Yazaki T, Kajita Y, et al. Detection of human herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J Med Virol* 1995; 46:52-55.
59. Suga S, Yoshikawa T, Kajita Y, et al. Prospective study of persistence and excretion of human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum and their parents. *Pediatrics* 1998; 102:900-904.
60. Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, et al. Human herpesvirus 6 infection after living related liver transplantation. *J Med Virol* 2000; 62:52-59.
61. Norton RA, Caserta MT, Hall CB, et al. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3672-3675.
62. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, et al. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:820-825.
63. Paterson DL, Singh N, Gayowski T, et al. Encephalopathy associated with human herpesvirus 6 in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 1999; 5:454-455.
64. Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, et al. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol* 2006; 35:257-263.
65. Razonable RR, Fanning C, Brown RA, et al. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002; 185:110-113.
66. Ward KN, Gray JJ, Joslin ME, et al. Avidity of IgG antibodies to human herpesvirus-6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. *J Med Virol* 1993; 39:44-49.
67. Manichanh C, Olivier-Aubron C, Lagarde JP, et al. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 2001; 82:2767-2776.
68. Berneman Z, Ablashi D, Le G, et al. Human herpesvirus-7 is a T-lymphotropic virus and is related to but significantly different from, human her-

- pesvirus-6 and human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:10552-10556.
69. Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, et al. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J Pediatr* 1998; 133:386-389.
  70. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, et al. Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV) 7 infections in relation to infection with HHV-6. *J Infect Dis* 2006; 193:1063-1069.
  71. Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, et al. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child* 1995; 72:518-519.
  72. Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, et al. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 1991; 65:6260-6265.
  73. Clark DA, Freeland JML, Mackie PLK, et al. Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J Infect Dis* 1993; 168:251-252.
  74. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, et al. Isolation of a new herpesvirus from human D CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:748-752.
  75. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, et al. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* 1994; 125:1-5.
  76. Ward KN, Turner DJ, Parada XC, et al. Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39:959-963.
  77. Atmar RL, Englund JA, Hammill H. Complications of measles during pregnancy. *Clin Infect Dis* 1992; 14:217-226.
  78. Orenstein WA, Papania MJ, Wharton ME. Measles elimination in the United States. *J Infect Dis* 2004; 189:S1-S3.
  79. CDC. Measles — United States, January 1 — April 25, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:494-498.
  80. Helfand RF, Heath JL, Anderson LJ, et al. Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. *J Infect Dis* 1997; 175:195-199.
  81. Helfand RF, Kebede S, Gary HEJ, et al. Timing of development of measles-specific immunoglobulin M and G after primary measles vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:178-180.
  82. Garg RK. Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J* 2002; 78:63-70.
  83. CDC. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee Mumps Prevention *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989; 38:388-400.
  84. CDC. Brief Report: Update: Mumps Activity — United States, January 1 — October 7, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55:1152-1153.
  85. Dayan GH, Quinlisk MP, Parker AA, et al. Recent resurgence of mumps in the United States. *N Engl J Med* 2008; 358:1580-1589.
  86. Glikmann G, Mordhorst CH. Serological diagnosis of mumps and parainfluenza type-1 virus infections by enzyme immunoassay, with a comparison of two different approaches for detection of mumps IgG antibodies. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1986; 94:157-166.

# 15 РЕСПИРАТОРНЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

**Р. Л. Этмар, С. Б. Гринберг**

Robert L. Atmar and Stephen B. Greenberg, Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Респираторные вирусные инфекции широко распространены во всем мире среди всех групп населения на протяжении всего года. Респираторные вирусы могут вызывать нетяжелые инфекции, такие как обычная простуда, или тяжелые, такие как пневмония. Вирус поражает как людей с нормальным, так и со сниженным иммунитетом. Хотя каждый респираторный вирус может инфицировать и верхние дыхательные пути, и нижний отдел дыхательной системы, определенные вирусы ассоциированы со специфическими клиническими синдромами, такими как круп или ларинготрахеобронхит.

Известно, что респираторные заболевания могут вызывать как РНК- так и ДНК-содержащие вирусы (табл. 15.1). В прошедшие 10 лет было выявлено нескольких новых вирусов-возбудителей респираторных заболеваний (табл. 15.2). Это результат развития новых, более чувствительных диагностических методов, использующих технологии исследования нуклеиновых кислот, которые значительно повысили способность обнаружения вирусов [1–10]. Хотя некоторые из этих вновь идентифицированных вирусов, например бокавирусы (парвовирусы) и WU и KI полиомавирусы, были идентифицированы в респираторном секрете людей, больными острыми респираторными заболеваниями, их этиологическая роль в патогенезе этих заболеваний еще должна быть определена и доказана, поэтому их диагностика не рассматривается далее в тексте этой главы. С использованием новых, более чувствительных методов исследования эпидемиология респираторных вирусных инфекций расширяется и их клиническая важность повышается [11–16].

## КЛИНИЧЕСКИЕ СИНДРОМЫ

Респираторные вирусы вызывают ряд различных клинических синдромов (табл. 15.3).

### Простуда (ОРВИ)

Синдром острого заболевания верхних дыхательных путей обычно называют простудой. Хотя респираторными вирусами, которые наиболее часто ассоциированы с простудой, являются риновирусы и коронавирусы [17, 18], вирус гриппа, парагриппа и аденовирус также



Таблица 15.1

## Классификация респираторных вирусов

Семейство вирусов	Род	Генетическая характеристика	Размер, нм	Количество видов/серотипов/генотипов
<b>РНК-вирусы</b>				
Coronaviridae	<i>Coronavirus ssРНК</i>	оцРНК *+* -цепь	120–160	3 группы, по меньшей мере 3 вида
Orthomyxoviridae	<i>Influenzavirus A</i>	оцРНК *→* -цепь, сегментированная	80–120	1 вид — многочисленные НА и NA подтипы
	<i>Influenzavirus B</i>			1 вид
	<i>Influenzavirus C</i>			1 вид
Paramyxoviridae (подсемейство Paramyxovirinae)	<i>Respirovirus</i>	оцРНК *→* -цепь ЛАНЬ®	150–300	PIV-1 и PIV-3
	<i>Rubulavirus</i>			PIV-2 и PIV-4
	<i>Pneumovirus</i>			1 вид RSV человека — два серотипа
(подсемейство Pneumovirinae)	<i>Metapneumovirus</i>			1 вид HMPV — два серотипа
Picornaviridae	<i>Enterovirus</i>	оцРНК *+* -цепь	22–30	4 вида, >60 серотипов
	<i>Rhinovirus</i>			2 (возможно 3) вида, >100 серотипов
	<i>Parvovirus</i>			2 серотипа
<b>ДНК-вирусы</b>				
Adenoviridae	<i>Mastadenovirus</i>	дцДНК	70–90	6 видов (A-F), 51 серотип
Herpesviridae (подсемейство Alphaherpesvirinae)	<i>Simplexvirus</i>		~200	2 вида (HSV-1, HSV-2)
	<i>Varicellovirus</i>			1 серотип
(подсемейство Betaherpesvirinae)	<i>Cytomegalovirus</i>			1 серотип
(подсемейство Gammaherpesvirinae)	<i>Lymphocryptovirus</i>			1 серотип (EBV)

могут вызывать похожие симптомы. Ежегодные эпидемии имеют место в осенне-зимний период в зонах умеренного климата и во время сезона дождей в тропиках [19, 20]. Скопления людей в закрытых помещениях осенью и зимой и начало школьного учебного года осенью могут способствовать распространению инфекции. У детей простудные заболевания могут быть 6–8 раз в год, у взрослых частота таких заболеваний снижается до 2–4 раз в год [21, 22].

Передача респираторных вирусов происходит при прямом контакте, вдыхании частиц в воздухе, капель, взвешенных в воздухе, или при комбинации нескольких путей распространения [19]. Риновирус был выделен с поверхности рук, поэтому считается, что вирус может использовать контактный путь передачи [20]. Распространение вируса простуды происходит дома, в школе и дошкольных учреждениях и других местах скопления детей. Показано, что дети и матери имеют более высокую частоту повторного инфицирования в связи с более продолжительными контактами с детьми школьного возраста.

Инкубационный период варьирует от 12 до 72 ч. Симптомы включают в себя заложенность и выделения из носа, чихание, боль в горле, кашель. Лихорадка бывает не всегда. Средняя продолжительность симптомов примерно семь дней, но было много сообщений о случаях продолжительности проявления симптомов простуды в течение двух и более недель.

Физикальное обследование обычно не обнаруживает отклонений от нормы за исключением выделений из носа и покраснения носа. Слизистая носоглотки может быть гиперемирована, при обследовании грудной клетки также не обнаруживается отклонений от нормы. Между взрослыми и детьми различий в клинических проявлениях не обнаружено.

Таблица 15.2

**Новые вирусы, обнаруженные в респираторном тракте с 2000 г.**

Вирус	Год публикации сообщения
Метапневмовирус человека	2001
SARS-коронавирус	2003
Коронавирус NL63	2004
Коронавирус HKU1	2005
Бокавирус человека	2005
Риновирус С человека	2007
Полиомавирус WU и KI человека	2007

## Фарингит

Фарингит может быть вирусной и бактериальной этиологии [23]. Во многих случаях фарингит был обусловлен риновирусом и коронавирусом, однако также показано, что причинами фарингита могут быть аденовирус и вирус простого герпеса [24]. Другие распространенные респираторные вирусы (вирусы гриппа и парагриппа (PIV)) также могут быть причиной острого фарингита. Сообщалось о том, что вирус иммунодефицита человека ВИЧ-1 вызывает острый фарингит как часть острого ретровирусного синдрома [25]. Вирус Эпштейна—Барр и менее распространенный цитомегаловирус вызывают острый фарингит в рамках инфекционного мононуклеозного синдрома.

Важно различать фарингит, вызванный респираторными вирусами, от фарингита, вызванного стрептококками группы А. Примерно 25% фарингитов у детей и 10% у взрослых бывают вызваны стрептококками. Стрептококковая инфекция чаще всего наблюдается зимой и ранней осенью, когда пик вирусной инфекции уже прошел и идет ее снижение [26].

Жалобы при фарингите аналогичны жалобам при остром респираторном вирусном заболевании. Увеличение миндалин и выраженная лимфаденопатия наблюдаются редко. Фарингит, вызванный HSV, может сопровождаться увеличением миндалин и/или везикулярными высыпаниями нёба, а также болезненностью шейно-затылочных лимфатических узлов [24]. Герпангина — редкая форма фарингита, вызванная вирусом Коксаки, — была обнаружена у детей и связана с мелкими везикулярными высыпаниями на нёбе. Острый фарингит с лихорадкой и конъюнктивитом был вызван аденовирусом. Боль в горле может быть ведущим симптомом у многих больных с острой формой гриппа. Инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна—Барр, часто диагностируется у людей молодого возраста с клиникой экссудативного фарингита и увеличением шейных лимфоузлов, требует дифференциальной диагностики со стрептококковым фарингитом (группы А).

## Острый отит среднего уха



Острый средний отит (ОСО) — широко распространенное заболевание маленьких детей, которое развивается в результате воспаления и накопления жидкости в среднем ухе [27, 28]. Обычно возникает у детей младше трех лет. У большинства заболевших не было анатомических дефектов, которые бы могли стать причиной рецидивирующей инфекции. Мальчики болеют чаще, чем девочки. Американские индейцы, эскимосы и австралийские аборигены имеют более высокую частоту и более острую форму проявления ОСО. Вирусные инфекции верхних дыхательных путей и ОСО близко связаны. До 60% эпизодов РИВДП у маленьких детей имеют осложнения в виде ОСО и/или экссудативного среднего отита (ЭСО) [28]. В недавно опубликованных



исследованиях наиболее частой причиной ОСО были названы риновирусная и аденовирусная инфекции. ОСО был обнаружен у 30% детей с заболеваниями верхних дыхательных путей, вызванными вирусами гриппа, парагриппа, энтеровирусами или риновирусами. Некоторые исследователи считают, что у детей наиболее частой причиной развития ОСО является риновирус [29].

### Круп (острый ларинготрахеобронхит)

Круп обычно начинается с характерного ночного кашля. Приступу часто предшествуют неспецифические респираторные симптомы, кашель сопровождается свистящее дыхание, охриплость голоса и респираторный дистресс. Разрешение характерного кашля происходит в течение последующих 48 ч примерно у 60% детей. Круп обычно бывает вызван респираторными вирусами у детей от шести месяцев до трех лет [30–32]. У взрослых круп развивается редко. Поступление больных в стационары с диагнозом «круп» на 50% выше в четные годы, что коррелирует с частотой заболевания парагриппом [33]. Случаи заболевания крупом бывают в течение всего года, но пик заболеваемости приходится на позднюю осень.

Таблица 15.3

Связь распространенных респираторных вирусов с различными клиническими синдромами

Вирус	ОРВИ	Фарингит	ОСО	Круп	Трахеобронхит	Бронхиолит	Пневмония
<b>РНК-вирусы</b>							
Риновирус	++++	+++	+++	+	++	+++	++
Энтеровирус	++	++	+	+	+	++	+
Коронавирус	+++	+++	+	++	++	++	+
Грипп	++	++	++	++	++++	++	++
Парагрипп тип 1	+	+	+	++++	+	++	+
Парагрипп тип 2	+	+	+	++	+	++	+
Парагрипп тип 3	++	+	+	+++	++	+++	+++
RSV	++	+	+++	++	++	++++	++++
HMPV	++	+	++	++	+	++	++
<b>ДНК-вирусы</b>							
Аденовирус	++	++	+	++	+	++	++
++++ >25%; +++ 10–25%; ++ 1–10%; + <1%							

## Трахеобронхит

Трахеобронхит характеризуется сухим кашлем и вызван воспалением верхних отделов дыхательных путей. Трахеит может быть обнаружен при пальпации области трахеи при физикальном исследовании. Глубокое вдыхание воздуха связано с дискомфортом за грудиной и вызывает приступ кашля. Острый бронхит сопровождается постоянным кашлем в течении по крайней мере пяти дней [35]. Физикальные и рентгенографические признаки пневмонии отсутствуют. Образование мокроты обычно скудное или отсутствует, если мокрота образуется, то она слизеподобная и прозрачная или белого цвета.

Вирус гриппа является одним из наиболее распространенных возбудителей трахеобронхита, но все респираторные вирусы также могут стать его причиной. Трахеобронхит часто сопровождается симптомами заболевания верхних дыхательных путей, особенно при риновирусной и коронавирусной инфекциях [36].

## Бронхиолит

Бронхиолит — преимущественно детская болезнь, характеризуется лихорадкой, кашлем, учащенным и свистящим дыханием, чрезмерным растяжением легких. Физикальные методы исследования помогают заметить участие дополнительных мышц, раздувание и опадание ноздрей. Бронхиолит является наиболее частой причиной госпитализации маленьких детей и поступления их в отделение интенсивной терапии [37]. Существует выраженная сезонность в частоте заболеваний, пик приходится на зиму, и это отражает главную причину заболевания — RSV. Более острая форма болезни выявляется у мужчин, при раздражении сигаретным дымом, хронических заболеваниях легких и сердца, недоношенности и раннем младенческом возрасте (< 3 месяцев).

## Пневмония

Пневмония — инфекционное заболевание легочной паренхимы, которое характеризуется лихорадкой, кашлем, одышкой, хрипами и легочным инфильтратом при рентгенографии грудной клетки. Этиология пневмонии зависит от возраста и иммунного статуса больного. В первые несколько лет жизни наиболее частой причиной пневмонии являются вирусы, в большинстве случаев заболеванием возбудителем инфекции оказывается респираторный синцитиальный вирус (RSV) [38]. Далее по частоте следуют вирусы парагриппа (особенно PIV-3). В этой возрастной группе пневмонию могут вызывать также вирусы гриппа, риновирусы, метапневмовирусы человека, коронавирусы и аденовирусы. В школьном возрасте пневмония встречается реже, и она редко имеет вирусную природу, при этом этиологическим агентом обычно бывает вирус гриппа. У взрослых пневмония чаще всего бывает вызвана бактериями, хотя часто ей предшествует вирусное ре-



спираторное заболевание, при вирусной пневмонии обычно этиологическим агентом является вирус гриппа А [39]. Другие респираторные вирусы также могут вызвать пневмонию, но реже. Пневмония может быть осложнением первичной ветряной оспы у 5–50% взрослых [40].

Пневмония — наиболее частое осложнение у лиц со снижением функций иммунной системы, включая пациентов с гемонкологическими заболеваниями, получающих химиотерапию или подвергающихся трансплантации стволовых клеток или органов. Все описанные выше наиболее распространенные респираторные вирусы могут вызвать пневмонию у лиц этой группы, наиболее значимыми считаются RSV и вирус гриппа [41]. Кроме того, важным возбудителем является цитомегаловирус. У данной группы больных наиболее распространенные вирусы вызывают развитие инфекций не только в характерное для вспышки заболеваемости время года, но и независимо от сезонности.

## ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

### РНК-вирусы

#### *Риновирусы и другие пикорнавирусы*

Риновирусы — члены семейства Picornaviridae. Эти маленькие безоболочечные (без липидной оболочки) одноцепочечные «+»-РНК-вирусы имеют форму икосаэдра. Капсид состоит из четырех белков. Белки VP1, VP2 и VP3 находятся на поверхности капсида. Вариации этих поверхностных белков определяют антигенное разнообразие и иммунный ответ после инфицирования [42, 43]. VP4 находится внутри вируса и прикрепляет РНК-сердцевину к вирусному капсиду.

Существует более 100 серотипов риновирусов. Свыше 90% из них прикрепляются к клетке при помощи молекулы внутриклеточной адгезии 1 (ICAM-1) [44]. Небольшое количество серотипов использует для прикрепления и проникновения в клетки хозяина рецептор к липопротеиду низкой плотности (ЛПНП) [45]. Один серотип — риновирус человека HRV-87 — требует наличия сиаловой кислоты в составе клеточного рецептора, в отличие от мажорной и минорной групп серотипов.

Многие ранее охарактеризованные штаммы риновирусов были идентифицированы в 2007 г. [47]. Нетипированные или неописанные пикорнавирусы были идентифицированы на молекулярном уровне и получили обозначение HRV-Cs [48]. Штаммы HRV-C генетически отличны и относятся исследователями пикорнавирусов к третьей группе риновирузных инфекций (в дополнение к HRV-A и HRV-B). До настоящего времени культивирование HRV-Cs на стандартных клеточных линиях не описано. Тем не менее показано, что штаммы HRV-Cs — это впервые идентифицированные возбудители, вызывающие заболевания органов дыхания [10, 49].

*Enterovirus* и *Parechovirus* — еще два вида из семейства Picornaviridae, которые вызывают ряд респираторных и нереспираторных синдромов (например, асептический менингит, конъюнктивит, миокардиты, плевралгию). Существует более 60 серотипов *Enterovirus*, известно два серотипа *Parechovirus*. В прошлом пареховирусы классифицировались как энтеровирусы, однако секвенирование генома показало, что это филогенетически различные группы вирусов.

### Коронавирусы

Коронавирусы — оболочечные одноцепочечные «+»-РНК-содержащие вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме. Коронавирусы делятся на три группы: группа I включает возбудителей заболеваний человека (HCoV-229E, HCoV-NL63) и животных, группа II также включает возбудителей заболеваний человека (HCoV-OC43, HCoV-NKU1, SARS) и животных, группа III состоит только из вирусов, патогенных для птиц. Вирусы имеют крупный поверхностный гликопротеин, который является мишенью для нейтрализующих антител. Большинство коронавирусов II группы (кроме вируса SARS) также содержит еще один поверхностный гликопротеин, который называется гемагглютинин-эстеразным (HE) белком. Клеточным рецептором почти для всех коронавирусов I группы, включая HCoV-229E, является аминокептидаза N человека (CD13). Однако HCoV-NL63 не использует CD13 для проникновения в клетку человека [51]. Напротив, HCoV-NL63, так же как и SARS-CoV, в качестве рецептора связывания и проникновения использует ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2). Белок ACE2 был обнаружен в реснитчатом эпителии носовой полости и трахеобронхиальном эпителии [52–54]. До настоящего времени не удается культивировать вирусы HCoV-NKU1, поэтому рецепторы связывания для них неизвестны [15]. Рецептор для HCoV-OC43 также пока не идентифицирован.

### Ортомиксовирусы (вирусы гриппа)

Вирусы гриппа — оболочечные одноцепочечные «-»-РНК-вирусы с сегментированным геномом, которые принадлежат семейству Orthomyxoviridae. Существует три вида вирусов человека, относящихся к группам А, В и С. Вирусы гриппа А делятся на подтипы на основе антигенных различий двух главных поверхностных гликопротеинов: гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Существует 16 идентифицированных гемагглютининов (H1—H16) и девять нейраминидаз (N1—N9), поэтому в соответствии с типами HA и NA обозначаются вирусы гриппа (например, A/H1N1, A/H3N2). Большинство HA и NA не обнаружены у вирусов, инфицирующих человека, однако все они имеются у вирусов, инфицирующих птиц. Отмечено возрастание количества штаммов вируса птичьего гриппа, которые стали причиной спорадических случаев инфицирования человека (например, H5, H7, H9). Вирусы группы В и С не делятся на подтипы.

Вирусы гриппа можно разделить по видам в соответствии с антигенными различиями по двум внутренним белкам (матриксный белок и нуклеопротеин). Эти вирусные белки служат мишенями во многих диагностических тестах. Минорный поверхностный белок М2 обнаружен у вируса гриппа А2, он функционирует как ионный канал и является мишенью одной из групп противовирусных препаратов (адамантанов).

### Парамиксовирусы



Парамиксовирусы (PIV) — оболочечные одноцепочечные  $s-s$ -РНК-вирусы, которые принадлежат к семейству Paramyxoviridae. Это полиморфные вирусы размером 150–300 нм. Существует ряд парамиксовирусов, которые вызывают респираторные заболевания. Некоторые, такие как краснуха, вызывают характерные кожные высыпания и не будут рассматриваться далее в этой главе. PIV включают два вида в подсемействе Paramyxovirinae. Типы PIV1 и PIV3 относят к виду *Respirovirus*. Типы PIV2, PIV4A и PIV4B относят к виду *Rubulavirus* [55]. Респираторный синцитиальный вирус (RSV) и метапневмовирус человека (HMPV) относятся к двум видам, *Pneumovirus* и *Metapneumovirus* соответственно, подсемейства Pneumovirinae. Гемагглютинин-нейраминидаза, гликопротеин (HN) и гликопротеин слияния (F) — основные антигены, выступающие сквозь липидную оболочку парамиксовирусов. Вирусы подсемейства Pneumovirinae, включая RSV и HMPV, не имеют гемагглютинина, вместо него главными поверхностными белками являются гликопротеин (G) и гликопротеин слияния (F).

Гликопротеины HN парамиксовирусов прикрепляются к остаткам сиаловой кислоты на поверхности клетки хозяина, в то время как за прикрепление RSV и HMPV ответственен G-белок. Это прикрепление приводит к слиянию вируса с клеткой, которое опосредовано F-белком. Репликация вируса происходит в цитоплазме.

Четыре главных серотипа PIV человека разделяются на основе реакции связывания комплемента и гемагглютинирующих антигенов. Поскольку эти вирусы имеют общие антигены, часто отмечается гетеротипичный антителный ответ на инфицирование. RSV и HMPV подразделяются на два типа (А и В) и много дополнительных подтипов.

### ДНК-вирусы

#### Аденовирусы

Аденовирусы относятся к роду *Mastadenovirus* семейства Adenoviridae. Аденовирусы — безоболочечные, икосаэдрические вирусы примерно 70–90 нм в диаметре. Геном состоит из двухцепочечной ДНК длиной примерно 32 кДа. Существует шесть видов (которые раньше назывались подгруппами или подродами) — от А до F, — способных вызывать заболевания человека, и каждый вид содержит один и бо-

лее серотип. Виды могут подразделяться, в частности, по способности агглютинировать эритроциты крысы или обезьяны. Используются также другие характеристики для выделения аденовирусов в виды, включая филогенетический анализ вирусных генов, содержание GC-оснований в геноме, полиморфизм фрагментов рестрикции, антигенные отношения и онкогенность для грызунов. Виды А—Е вызывают респираторные заболевания, наиболее распространенными являются серотипы видов В и С. Вирус вида F вызывает гастроэнтерит.

### Вирусы герпеса

Некоторые вирусы семейства *Herpesviridae* могут вызывать респираторные клинические синдромы. Герпесвирусы — сложные оболочечные двухцепочечные ДНК-содержащие вирусы, размером примерно 200 нм. Семейство имеет три подсемейства, которые содержат штаммы, патогенные для человека: *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* и *Gammaherpesviridae*. Существует два рода альфагерпесвирусов, которые содержат вирус герпеса человека. Род *Simplexvirus* включает два вида вируса человека: *Human herpesvirus 1* (HHV-1) и *Human herpesvirus 2* (HHV-2), в то время как в роде *Varicellovirus* только один вид, патогенный для человека, *Human herpesvirus 3* (HHV-3), он же вирус ветряной оспы, или опоясывающего лишая (VZV). Цитомегаловирус человека (*Human herpesvirus 5*, CMV) и вирус Эпштейна—Барр (*Human herpesvirus 4*, EBV) являются бета- и гамма-герпесвирусами соответственно. В то время как каждый из этих вирусов вызывает специфические клинические синдромы, отличные от описанных в разделе «Клинические синдромы», их клинические проявления могут перекрываться с описанными выше, особенно у больных с нарушенной иммунной системой. Эти вирусы преимущественно вызывают заболевания у больных с иммуносупрессией и будут обсуждаться в гл. 24.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Большая часть респираторных инфекций имеет четко выраженную сезонность (табл. 15.4), хотя многие могут быть идентифицированы как причина инфекционного заболевания в течение всего года.

### Риновирус и другие пикорнавирусы

Риновирусы повсеместно вызывают респираторные заболевания во всех возрастных группах в течение всего года [20]. Риновирусы наиболее распространены в течение весеннего и осеннего периодов в странах умеренного климата [17]. В проспективных исследованиях с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) было показано, что риновирусы вызывают 50% простудных заболеваний [17]. Эти вирусы отвечают за миллионы потерянных рабочих дней, повышение пропусков в школе и большую часть вызовов врача

Таблица 15.4

**Эпидемиологические характеристики  
распространенных респираторных вирусов**

Вирус	Сезонность	Пути распространения	Инкубационный период
Риновирус	Осень и весна	Воздушно-капельный, контактный	1–5 дней
Коронавирус	Зима	Воздушно-капельный	2–5 дней
Аденовирус	Круглый год	Прямой, аэрозольный	4–7 дней
Вирус гриппа А и В	Зима	Аэрозольный, воздушно-капельный	1–4 дня
Вирусы парагриппа 1, 2, 3	Осень — тип 1, 2. Весна — тип 3	Воздушно-капельный	3–6 дней
Респираторный синцитиальный вирус	С осени до весны	Контактный, ± воздушно-капельный	2–8 дней
Человеческий метапневмовирус	С осени до весны	Воздушно-капельный, контактный	2–7 дней

на дом. Как правило, риновирусные инфекции протекают с клинической симптоматикой. Инфекции верхних дыхательных путей, вызванные риновирусами, часто приводят к необоснованному назначению антибиотиков [17]. Риновирусные инфекции также ассоциированы с заболеваниями нижних отделов дыхательных путей, включая обострение астмы и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхолиты и пневмонии у лиц старшего возраста и больных с нарушениями иммунитета.

Близкий домашний контакт — основной источник распространения риновирусов. Дети школьного возраста часто становятся источниками этой вирусной инфекции. Рецидивы вирусной инфекции в семье происходят в 25–70% случаев. Детские дошкольные учреждения и школы являются главными источниками распространения риновирусов [42]. Передача риновирусов может происходить при близком контакте и через предметы общего пользования и/или аэрозоли [56–60].

### *Коронавирус*

В эпидемиологических исследованиях среди взрослых показано, что коронавирусы являются причиной примерно 15% случаев простудных заболеваний взрослых людей [61, 62]. Обнаружено, что коронавирусы вызывают эпидемии каждые два-три года с последующим частым реинфицированием. Чувствительны люди всех возрастов. По данным эпидемиологических исследований, коронавирусы обычно вызывают инфекции верхних дыхательных путей, но иногда — пневмонию [63]. В странах умеренного климата HCoV-OC43 и HCoV-229E

распространяются преимущественно зимой. Люди старшего возраста в домах престарелых склонны к заболеваниям коронавирусами, что может приводить к госпитализации.

Помимо HCoV-OC43 и HCoV-229E недавно были идентифицированы другие коронавирусы. В 2003 г. сообщалось о новом коронавирусе, который вызывает тяжелый острый респираторный синдром (SARS) [6, 64].

В 2004 и 2005 гг. были описаны три близкородственных вида коронавирусов [9, 52, 65–67]. NL63 был выделен от ребенка с острым ринитом, конъюнктивитом, лихорадкой и бронхиолитом [68, 69]. Возраст больных, инфицированных вирусом HCoV-NL63, был от 1 мес. до 100 лет, но наибольшая частота инфекций приходится на возраст до пяти лет [70–73].

Вновь идентифицированный коронавирус человека II группы HCoV-NKU1 был обнаружен в респираторных образцах больных с лихорадкой и кашлем [74, 75]. В проспективном исследовании в Гонконге коронавирус был идентифицирован у 2,1% всех больных, помещенных в стационар с признаками и симптомами острого респираторного заболевания [76]. Сообщалось, что из 87 больных коронавирусной инфекцией у 13 пробы на HCoV-NKU1 были позитивны, у 17 пациентов — на HCoV-NL63, у 53 человек — на HCoV-OC43 и у 4 больных были позитивны пробы на HCoV-229E [77, 78].

В недавно проведенном проспективном исследовании респираторных вирусных инфекций среди госпитализированных больных у 5,7% был обнаружен коронавирус [79]. Инфекции нижних отделов дыхательной системы более распространены, чем инфекции верхних дыхательных путей: 75% и 25% соответственно. Более половины инфекций было вызвано OC43-подобными штаммами, примерно 20% 229E-подобными штаммами и примерно 20% штаммами NL63. Коронавирусные инфекции на первом году жизни были ассоциированы преимущественно с вирусами OC43.

## Вирус парагриппа

Вирусы парагриппа (PIV) являются важной причиной ряда респираторных инфекций как верхнего, так и нижнего отдела дыхательной системы [80]. После респираторного синцитиального вируса PIV — вторая причина госпитализации маленьких детей с заболеваниями системы дыхания.

Хотя PIV-инфекции возникают в течение всего года, для различных серотипов вируса парагриппа существует сезонность. В США инфицирование PIV-1 происходит преимущественно осенью в нечетные годы, инфекция PIV-2 наиболее часто распространена осенью в четные годы [81]. Инфицирование PIV-3 происходит круглогодично, но пики заболевания отмечаются каждую весну. Поскольку PIV-4 идентифицируется редко, выраженной сезонности для него не установлено. Сезонные колебания PIV в тропических и развивающихся



странах не описаны. Наиболее распространен RIV-3, за ним следуют RIV-1, RIV-2 и RIV-4.

Более 90% детей к пяти годам имеют антитела к RIV-3. Тем не менее накопление антител к RIV-1 и RIV-2 более медленное. К взрослому возрасту почти 100% людей имеет антитела к RIV-4.

RIV-1 и RIV-2 связаны с крупом и ларингитом, RIV-3 инфицирует более дистальные воздухоносные пути и поэтому ассоциирован с бронхолитом и пневмонией. Круп вызывается преимущественно RIV-1 и RIV-2, но может также быть связан с инфицированием RIV-3 и RIV-4 [32, 34]. Все RIV вызывают респираторные инфекции верхних дыхательных путей (РИВДП), включая простуду, средний отит, фарингиты. РИВДП наиболее распространенные заболевания во всех возрастных группах. Бронхолиты, пневмония и круп — частые причины госпитализации.

RIV-инфекции наиболее остро протекают у детей и взрослых с ослабленной иммунной системой. Чаще всего заражение происходит в местах скопления людей, но отмечены также случаи позокомиальной инфекции. Смертность у людей с ослабленной иммунной системой с инфицированием нижних отделов дыхательной системы достигает 35% [82]. Описаны случаи бессимптомной инфекции RIV-1 и RIV-3 у пациентов после трансплантации стволовых клеток. Однако многие больные могут иметь симптомы РИВДП без распространения на нижние отделы дыхательной системы и более тяжелых осложнений [83]. В одном сообщении о заболевании, вызванном у пациентов после трансплантации гемопоэтических клеток инфицированием RIV-3, было описано развитие симптомов от РИВДП до инфекции нижних отделов дыхательной системы у 13% больных [84]. Степень прогрессирования заболевания была в дозозависимой связи с применением кортикостероидов [85].

RIV — третья группа вирусов, обнаруживаемая у больных с обострением ХОБЛ [11]. Они также связаны с обострением астмы [86]. Вспышка инфекции RIV была описана в стационарах, санаториях и домах престарелых. В одной из вспышек инфекций, вызванных RIV-3, у 50% больных заболевание продолжалось более четырех недель, у 40% больных отмечалась лихорадка [87]. Другие клинические синдромы, которые отмечались при RIV-инфекции: асептический менингит, миокардит и синдром Гийона—Барр.

### Респираторный синцитиальный вирус



RSV является причиной ежегодных эпидемий от поздней осени до весны с продолжительностью эпидемий до 20 недель или более. Инфицирование происходит во всех возрастных группах, но преимущественно в первые два года жизни инфекция ассоциирована с наиболее серьезными проявлениями: бронхолитом и пневмонией.

На первом году жизни до 40% первичных инфекций протекают в форме инфекции нижних отделов дыхательной системы (бронхоли-

та и пневмонии), и RSV — наиболее частая причина госпитализации детей [88]. У более старших детей и молодых людей инфекция обычно протекает в форме умеренно выраженного простудного синдрома. У пожилых людей RSV вновь становится причиной заболеваний нижних отделов дыхательных путей, считается, что в США каждый год этот вирус приводит к гибели 11 000 человек [89]. RSV — основной возбудитель пневмонии у лиц с сильно пониженным иммунитетом. Пациенты после трансплантации гемопоэтических клеток имеют значительно больший риск развития инфекции и смерти от RSV, чем реципиенты после трансплантации органов [41]. Передача инфекции происходит через предметы и воздушно-капельным путем, при образовании крупных капель [90]. Многие нозокомиальные инфекции передаются от персонала или посетителей, и строгое ограничение посещений или организация специальной службы контроля состояния здоровья персонала может потребоваться для того, чтобы предупредить нозокомиальные инфекции в группах высокого риска [91].

### Метапневмовирус человека

Метапневмовирус человека (HMPV) вызывает заболевания, аналогичные тем, что вызываются RSV. Эти вирусы главным образом циркулируют в период от поздней осени до весны, но в некоторых группах людей могут обнаруживаться в течение всего года [92]. Первичное инфицирование происходит в раннем возрасте, но реинфицирование может происходить в течение всей жизни. В некоторых исследованиях HMPV рассматривается как вторая после RSV по распространенности причина бронхолита, также может вызвать простуду и быть связан с острым средним отитом. У детей старшего возраста и взрослых описано обострение астмы и ХОБЛ; у больных с выраженным нарушением иммунитета HMPV может вызывать пневмонию, иногда с летальным исходом [92].

### Вирус гриппа

Вирус гриппа вызывает ежегодные инфекции или лихорадочные респираторные заболевания в странах с умеренным климатом. Эпидемии обычно происходят с декабря по март, а в Южном полушарии — с мая по сентябрь. Эпидемию гриппа следует предполагать при быстром повышении числа лихорадочных респираторных заболеваний в определенных группах населения с сопутствующим возрастанием числа невыходов на работу и учебу. Продолжительность эпидемии обычно составляет от трех до восьми недель и связана преимущественно с вирусом гриппа подтипа А или В [93]. В дополнение к ежегодным локальным эпидемиям отмечаются эпидемии, распространенные по всему миру (пандемии), вызванные только вирусом гриппа А. Пандемии возникают при появлении в популяции человека вирусного штамма, имеющего новый гемагглютинин, к которому чувствительна вся популяция. Этот вирус легко передается от человека к человеку.

Потенциальная возможность развития пандемической инфекции привела к повышению интереса к таким штаммам птичьего гриппа, как А/Н5N1, А/Н7N7 и А/Н9N2, опасных для человека и обладающих новыми гемагглютинидами. Инфекции, вызванные этими вирусами, обычно следуют после контакта с домашней птицей, но не во всех случаях был доказан такой контакт.

Инфицирование эпидемическими штаммами наиболее распространено среди детей школьного возраста, госпитализация наиболее распространена среди детей младшего возраста и пожилых людей, смертельный исход также наиболее часто бывает у пожилых. Передача вируса осуществляется преимущественно аэрозольным и воздушно-капельным путем при кашле и чихании. В США во время эпидемии гриппа ежегодно умирает ~36 000 и госпитализируется ~300 000 человек [89, 93, 94]. Вирусы гриппа А/Н3N2 в последние годы оказывали наибольшее влияние на развитие эпидемий, но в 2009 г. наибольшую широту распространения получил штамм А/Н1N1. Эпидемии гриппа В также имеют место и связаны с высокой тяжестью и необходимостью госпитализации. Грипп С вызывает заболевания средней тяжести и редко выявляется в качестве причины респираторного заболевания.

## Аденовирус

Аденовирусы вызывают ряд заболеваний как дыхательных путей, так и других органов. Респираторные заболевания включают симптомы воспаления как верхних (фарингит, простуда), так и нижних (бронхиолиты, пневмония) дыхательных путей. Кератиноконъюнктивит, гастроэнтерит, менингоэнцефалит, геморрагический цистит, диссеминированные инфекции и другие заболевания могут быть связаны с аденовирусной инфекцией. Аденовирусы вызывают инфекции круглый год. Пик респираторных инфекций отмечается в зимний период, а пик фарингоконъюнктивитов — летом (например, при плавании в бассейнах).

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Дифференциальный диагноз клинических синдромов, вызванных респираторными вирусами, включает все респираторные вирусы (см. табл. 15.3). Другие возбудители, включая бактерии и грибы, также могут быть выделены, особенно в случае фарингита и пневмонии. Вероятность того, что данное заболевание вызвано определенным респираторным вирусом, зависит от ряда факторов: возраста, сопутствующих заболеваний, времени года. Тем не менее ни один из этих факторов не позволяет идентифицировать инфицирующий агент; требуется проведение диагностического исследования для подтверждения диагноза. Успешная идентификация инфекции, вызванной специфическим вирусом, влияет на последующее решение о проведении терапии, выборе противовирусного препарата, применения антибиотикотерапии и начала принятия соответствующих мер по предотвращению распространения инфекции.

## ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Типы образцов и методов исследования

Для диагностики вирусных инфекций могут быть использованы почти все респираторные образцы, но результат диагностических исследований различен в зависимости от типа образца и диагностического метода. Для быстрого выявления большинства респираторных вирусов часто используют мазки и аспираты из носоглотки [96, 97]. У старших детей и взрослых обычно берут мазки, в то время как аспираты обычно отбирают у младенцев и детей младшего возраста. Сбор образцов из носоглотки не всегда воспринимается хорошо больными, поэтому могут быть использованы другие типы. Многие клиницисты используют смывы из носа (введение солевого раствора в нос и последующий сбор вытекшей жидкости) и мазки из носа. В некоторых исследованиях сообщается, что мазки из носа менее информативны, чем мазки из носоглотки, однако в других публикациях результаты противоположны [98]. Недавно был разработан специальный тампон для взятия респираторных образцов, была показана большая чувствительность в отношении респираторных вирусов в случае их применения по сравнению с традиционными ватными тампонами [99–101]. Такие тампоны (Copan Diagnostic, Inc.) сделаны из волокон, которые наносятся напылением и прилипают к тампону перпендикулярно поверхности. Эта технология позволяет повысить количество эпителиальных клеток, которые собираются тампоном, в два-три раза. Количество инфицированных клеток, следовательно, также повышается [102].

Образцы со щечно-глоточной перепонки — еще один потенциальный источник для идентификации респираторных вирусов. Смывы из глотки и образцы слюны дают более высокий диагностический уровень раннего обнаружения коронавирусов SARS по сравнению с другими клиническими пробами [103]. Фарингеальные образцы в виде обычных мазков из зева менее чувствительны для обнаружения большинства других респираторных вирусов по сравнению с мазками из носа и носоглотки [104, 105]. Сбор комбинированных назальных и фарингеальных образцов позволяет получать образцы из обоих участков.

Респираторные вирусы также могут быть идентифицированы в пробах из нижних отделов дыхательной системы. Мокрота или бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) наиболее часто забираемые образцы из нижних дыхательных путей. Исследование БАЛ особенно полезно у пациентов со сниженным иммунитетом.

Как только образцы получены, их следует как можно быстрее переправить в клиническую лабораторию, особенно если должна быть исследована вирулентность вируса. Добавление сахарозной или бульонной транспортной среды повышает выживание вируса, когда используются мазки на тампонах [106]. Транспортная среда обычно содержит антибиотики и антимикотики для снижения микробного

раста. Транспортные среды могут влиять на результаты некоторых диагностических исследований. Поэтому сбор образцов и протоколы транспортировки должны строго следовать методике (культивирование, определение антигена, определение нуклеиновых кислот и т. д.). Существует ряд коммерческих транспортных сред.

Клинические образцы доставляются в лабораторию на льду для поддержания жизнеспособности вирусов. Выделение вирусов снижается при замораживании образцов после транспортировки без охлаждения. Если образцы не могут быть транспортированы немедленно, следует помнить, что многие респираторные вирусы остаются жизнеспособными в течение нескольких дней при хранении при 4 °С. [107]. При более длительной задержке образцы следует заморозить и хранить при -70 °С. Респираторный синцитиальный вирус особенно лабилен, и степень восстановления его жизнеспособности снижается при хранении и замораживании образца.

### Прямое исследование

Для прямого обнаружения вируса или вирусного антигена в клинических образцах могут быть использованы несколько методов. Наиболее распространены микроскопическое исследование, иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ (ИФА) и детекция нуклеиновых кислот. Некоторые из этих исследований требуют не более 15 мин и могут быть использованы в качестве тестов «у постели больного». Важным недостатком прямого обнаружения вируса по сравнению с методами культивирования является невозможность дальнейшего исследования вируса (в том числе его антигенной специфичности, чувствительности к противовирусным препаратам).

### Микроскопия

Электронная микроскопия иногда используется для идентификации респираторных вирусов, выделенных из клинических образцов [108]. Вирусы могут быть ориентировочно идентифицированы по морфологии и взаимодействию с иммунными сыворотками. Однако из-за необходимости специализированного оборудования и личного опыта исследователей в интерпретации полученного изображения, относительно высокой стоимости исследования и низкой чувствительности ЭМ по сравнению с другими диагностическими тестами электронная микроскопия не слишком часто применяется для диагностики респираторных вирусных инфекций. Оценка цитологических или гистологических образцов при помощи световой микроскопии позволяет обнаружить вирусные включения или другие гистопатологические изменения и предположить специфическую вирусную инфекцию (например, цитомегаловирус, RSV). Для идентификации вирусных антигенов в инфицированных тканях также могут быть полезны иммуногистохимические исследования. В иммуногистохимические исследования для подтверждения спе-

цифичности положительных результатов должны быть включены надлежащие контроли (например, предсенсibilизированная сыворотка).

### *Иммунофлуоресцентные исследования*

Исследования с использованием флуоресцентных антител были первым методом, который использовали для идентификации респираторных вирусных инфекций в 1950-х гг., он часто применяется во многих клинических лабораториях и в настоящее время [109]. Для детекции вируса используются два формата: прямое и непрямое исследование. В прямом методе (ПФЛА) флуоресцентным зондом (например, флуоресцеином) непосредственно метят вирусспецифичные антитела. В непрямом (НФЛА) методе флуоресцентно меченные специфичные антитела представляют собой видоспецифичные антииммуноглобулины, которые распознают вирусспецифичные антитела, реагирующие с инфицированными клетками. Метод НФЛА более чувствителен по сравнению с ПФЛА в результате амплификации сигнала вторичными антителами, но специфичность его обычно ниже в результате более высокой фоновой флуоресценции. Кроме того, для проведения НФЛА требуется больше времени, чем для ПФЛА.

Для интерпретации результатов иммунофлуоресцентного анализа требуется клеточный материал, таким образом, этот диагностический метод позволяет оценивать качество собранных образцов. Относительным недостатком метода является необходимость наличия флуоресцентного микроскопа. Наличие технического опыта для верной интерпретации окрашенных срезов и продолжительность исследования делают его менее предпочтительным по сравнению с быстрыми методами детекции антигена. Помимо применения непосредственно для клинических образцов, иммунофлуоресцентные исследования используются для идентификации вирусных антигенов в клеточной культуре как при выраженном цитопатическом действии, так и в качестве части исследования в культуре клеток во флаконах (см. ниже).

Коммерчески доступен ряд тестов для иммунофлуоресцентных исследований (табл. 15.5). Многие из этих наборов первоначально осуществляют выявление вирусов в мультиплексном формате с полным комплектом реагентов для того, чтобы определить, содержится ли в образце какой-то из набора респираторных вирусов-мишеней (вирус гриппа А, В, RSV, PIV типов 1–3, аденовирус). Если реакция положительна, вирус идентифицируют с использованием специфических реагентов на индивидуальные вирусы. Описаны также ИФл-методы для идентификации коронавирусов 229Е и OC43 [110]. Чувствительность ИФл-методов в респираторных образцах может достигать 90–95% по сравнению с культурой клеток, но по сообщениям многих лабораторий чувствительность составляет от 70 до 80% [111, 112]. Когда данные интерпретируются опытными исследователями, специфичность обычно составляет более 95%.

Таблица 15.5

Коммерчески доступные наборы для иммунофлуоресцентных исследований респираторных вирусов

Формат метода	Определяемые вирусы (чувствительность; специфичность)								
	Набор (производитель)	Аденовирус	Грипп А	Грипп В	P1V-1	P1V-2	P1V-3	RSV	
Прямой флуоресцентный анализ (ПФЛА)	Bartels RSV DFA (Trinity Biotech)	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да (88–100%; 100%)	
	D <sup>2</sup> DFA Respiratory virus Screening and ID Kit (Diagnostic Hybrids, Inc.) <sup>g</sup>	Да (100%; 100%)	Да (97–100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	
Light Diagnostics Simifluor Diagnostic Assays (Millipore) <sup>a</sup>	Imagen (Kemei Inc.)	Да (86–100%; 100%)	Грипп А и В (96%; 100%)	Грипп А и В (87%; 99.5%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (92%; 99%)	Да (93%; 98%)	
	Light Diagnostics Simifluor Diagnostic Assays (Millipore) <sup>a</sup>	Да, только подтверждение	RSV/Грипп А (96%; 99.6%), грипп А/Грипп В (80%; 99%)	Грипп А/Грипп В (50%; 100%)	Да, только подтверждение	Да, только подтверждение	Да, только подтверждение	Да (98%; 98.9%)	

	PathoDx Respiratory Virus Panel (Oxoid)	Да (92–100%; 100%)	Да (75–100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (93–100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (90–100%; 100%)
Не-прямой флуоресцентный анализ (НФЛА)	Bartels Respiratory Viral Detection Kit (Trinity Biotech)	Да (100%; 99,9%)	Да (86–100%; 99–99,9%)	Да (65–100%; 98–100%)	Да (100%; 100%)	Да (52–100%; 100%)	Да (100%; 100%)	Да (86–100%; 97–100%)
	Imagen Respiratory Virus Screen Kit (Remel Inc.)	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
	Light Diagnostics Respiratory Virus Screen (Millipore)	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне	Да, только подтверж-денне

\* Также изготавливаются индивидуальные наборы для прямого иммунофлуоресцентного анализа человеческих метапневмовирусов



*Иммуноферментный анализ и другие ферментные методы*

Иммуноферментный анализ (ИФА) может быть осуществлен с использованием ряда различных форматов, одним из наиболее распространенных ИФА-методов для выявления вирусных антигенов является «сэндвич»-метод. Для захвата вирусного антигена используется антисыворотка, для выявления применяется вторичная специфическая антисыворотка, которую либо метят ферментом, взаимодействующим с субстратом с генерацией колориметрического или флуориметрического сигнала, либо вторичными антителами, распознающимися при помощи третичной фермент-меченой антисыворотки, которая взаимодействует со специфическим субстратом с выделением положительного сигнала. В альтернативном методе вместо фермента может быть использована неферментная метка (например, изотоп или флуорофор). ИФА разработан для большинства респираторных вирусов, этот метод обычно занимает по меньшей мере два часа. Чувствительность зависит, в частности, от антисывороток, которые используются в методе. Для вируса гриппа чувствительность находится в диапазоне от 50 до 80% [113].

Метод ИФА адаптирован для быстрого получения результата в формате, обеспечивающем детекцию респираторных вирусов менее чем за 30 мин без потери качества исследования. Два главных применяемых метода — проточная иммунохроматография и латеральная проточная иммунохроматография. В методе проточной иммунохроматографии вирусные антигены концентрируются на мембране и затем идентифицируются при помощи меченных ферментом специфических антител, которые дают колориметрический сигнал при связывании с субстратом фермента. Латеральная проточная иммунохроматография основана на том, что клинический образец наносится на мембрану и вирусные антигены проникают через мембрану, захватываются вирусспецифичными антителами. Связанный антиген затем идентифицируется вторично мечеными антителами, которые визуализируются как полоса на тест-полоске. Коммерчески доступны наборы для быстрого иммуноанализа вирусов гриппа А и В, а также RSV (табл. 15.6). Вирусные антигены, которые используются в качестве мишеней для быстрого иммуноанализа, — консервативные (нуклеопротеин вируса гриппа, белок слияния RSV). Качество метода часто отличается от описываемого производителями и варьирует в различных популяциях, чувствительность может находиться в диапазоне от 60 до 90% [114, 115]. Тем не менее чувствительность одного из методов быстрого выявления антигена вируса H1N1, вызвавшего пандемию 2009 г., составила только 10% [116]. Некоторые наборы разрешены к использованию в качестве наборов для домашнего использования и проведения тестов «у постели больного».

Другая быстрая диагностическая платформа была разработана для обнаружения вируса гриппа. Метод исследования Zstatflu (ZymeTx) использует меченые производные сиаловой кислоты (субстрат ви-

Таблица 15.6

Коммерчески доступные наборы для иммуноферментного анализа и других ферментных исследований респираторных вирусов

Формат теста	Производитель	Название набора	Примлемые клинические образцы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Латеральная проточная ИФА-хроматография	Fisher Scientific	Sure-View RSV	НГМ, НА, НС	RSV: >99	99 >
	Genzyme	OSOM Flu A+B	НМ	Грипп А: 74 Грипп В: 60	96 96
	Inverness Medical Professional Diagnostics	BinaxNow Influenza A+B	НА, НГМ, НС	Грипп А: 81-83 Грипп В: 53-65	93-97 96-100
		BinaxNow RSV	НГМ, НС	RSV: 89-93	93-100
		Clearview RSV	НА, НГМ	RSV: 93-100	88-97
	Meridian	ImmunoCard STAT RSV Plus	НА, НГМ, НМ, НС	RSV: 78-94	78-100
	Quidel Corp.	Quickvue Influenza <sup>a</sup>	НА, НГМ, НС	Грипп: 73-81	96-99
		Quickvue Influenza A+B	НА, НГМ, НС	Грипп А: 72-94 Грипп В: 62-82	89-99 96-99
		Quickvue RSV	НА, НГМ, НС	RSV: 83-99	90-92
	Remel Inc.	Xpact A&B	НМ, НС, МЗ	Грипп А: 89-100 Грипп В: 83-100	100 100
		Xpact RSV	НГМ	RSV: 96	94
	Response Bio-medical Corp.	RAMP Influenza A/B Assay	НА, НГМ, НС	Грипп А: 70-92 Грипп В: 56-92	94-99 95-99
		SA FluAlert Influenza A Test	НА, НС	Грипп А: 76	98
		SA FluAlert Influenza B Test	НА, НС	Грипп В: 91	100

Окончание табл. 15.6

Формат теста	Производитель	Название набора	Примлемые клинические образцы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Прочная ИФА-хромография	Becton — Dickinson	Directigen Flu A	НА, НГМ, НС, МЗ	Грипп А: 67–96	88–97
		Directigen Flu A+B	БАЛ, НА, НГМ, НМ, НС, МЗ	Грипп А: 76–96	90–100
				Грипп В: 71–88	98–100
		Directigen Flu A+B/EZ	НА, НГМ, НС, МЗ	Грипп А: 77–91	86–99
		Directigen RSV	НА, НГМ, НС, ТА	Грипп В: 69–80	99–100
Оптическое иммуноаналитическое исследование	Inverness Medical Professional Diagnostics	BioStar Flu OIA <sup>a</sup>	НА, НГМ, слюна, МЗ	RSV: 93–97	90–97
		BioStar Flu A/B OIA	НА, НГМ, слюна, МЗ	Грипп: 62–88	52–80
		BioStar RSV OIA	НА, НГМ, слюна, МЗ	Грипп А и грипп В: как BioStar Flu OIA	Грипп А и грипп В: как BioStar Flu OIA
Небранин-плазма	Zymetix	ZstatFlu <sup>a</sup>	НА, НС	РСВ: 67–87	99

<sup>a</sup> Не дифференцирует вирусы гриппа А и В.

Сокращения: БАЛ — бронхо-альвеолярный лаваж; НА — назальный аспират; НГМ — носоглоточный мазок; НМ — назальный мазок; НС — назальный смыв; ТА — трахеальный аспират; МЗ — мазок из зева

русной нейраминидазы) для обнаружения присутствия вируса. Если нейраминидаза вируса гриппа присутствует в образце, субстрат расщепляется вирусным ферментом с образованием продукта, который может быть определен визуально. Этот метод не позволяет различить вирусы гриппа А и В и не обнаруживает вирус гриппа С (который не содержит нейраминидазу) и нейраминидазы РIV или бактериальных сиалидаз, поскольку эти ферменты не распознают производные сиаловой кислоты как субстрат и поэтому не катализируют их расщепление. Метод Zstatflu работает хуже для выявления вируса гриппа В, чем для вируса гриппа А, разрабатываются новые форматы исследования [117, 118].

### Обнаружение нуклеиновых кислот

Молекулярные методы все чаще используются для диагностики и характеристики респираторных вирусов. Чаще всего применяется полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием в качестве мишеней консервативных генов респираторных вирусов-мишеней. Моноплексные ПЦР и ОТ-ПЦР тест-системы разработаны для определения каждого респираторного вируса [12]. Для обнаружения некоторых респираторных вирусов разработаны другие форматы молекулярных исследований, включая реакцию транскрипционной амплификации (NASBA — *nucleic acids sequence-based amplification*) и изотермальную петлевую амплификацию (LAMP — *loop mediated isothermal amplification*). В большинстве случаев молекулярные исследования эффективны, по крайней мере, так же как клеточные культуры, и часто имеют ряд преимуществ, поскольку могут идентифицировать вирусы, которые сложно или невозможно культивировать. Препятствие развития моноплексных исследований в том, что вирусов, вызывающих респираторные заболевания, много, поэтому необходимо большое количество различных исследований для обнаружения даже широко распространенных вирусов. Однако моноплексные исследования повысили идентификацию респираторных вирусных инфекций у больных [11].

Проблема идентификации большого количества потенциальных причин, вызывающих респираторные заболевания, привела к разработке мультиплексных ОТ-ПЦР систем выявления (табл. 15.7). Первые попытки разработки мультиплексных исследований были осложнены снижением чувствительности исследований в результате взаимодействия между различными вирусспецифичными праймерами и зондами. Были разработаны некоторые методы исследования, которые позволяли обнаружить от двух до шести различных вирусов. Недавно опробованы мультиплексные методики, которые используют технологию микрочипов для различных продуктов с детекцией более десяти различных вирусов. Панель для респираторных вирусов xTAG™ Respiratory Virus Panel — один из таких коммерчески доступных методов анализа (табл. 15.7). Выделенный геном вируса подвергается мульти-

плексной ОТ-ПЦР амплификации путем инкубирования с парами вирусспецифичных праймеров для каждого из вирусов. После обработки получившихся ампликонов экзонуклеазой и щелочной фосфатазой для удаления оставшихся праймеров смесь подвергается воздействию мультиплексного комплекса вирусспецифичных праймеров (при этом каждый праймер имеет собственную последовательность, или Tag), биотинилированных дезоксинуклеотидов и ДНК-полимеразы. Удлинение праймера, специфичного для вируса-мишени, происходит, если специфичные олигонуклеотидные праймеры гибридизируются с образовавшимися в результате ПЦР ампликонами, удлинение олигонуклеотидных праймеров приводит к их мечению биотином. Биотинилированные олигонуклеотиды помечают флуоресцирующим стрептавидин-фикоэритриновым конъюгатом. Меченая последовательность вирусспецифичных олигонуклеотидных праймеров распознается после гибридизации с комплементарной последовательностью на соответствие специфичным микроносителям, каждый из которых несет свой вирусспецифичный флуоресцентный краситель. Полученные образцы анализируют с использованием проточного люминометра LumineX 100 с двумя лазерами — зеленым и красным. Зеленый лазер определяет наличие и количество фикоэритрина, красный — наличие вирусспецифичного флуоресцентного красителя. Программное обеспечение позволяет оценить наличие или отсутствие вирусов-мишеней [119, 120]. Анализатор xTAG™ RVP, одобренный FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) может обнаружить 10 различных вирусов (табл. 15.7) и также определить подтипы вируса гриппа А — H1 и H3. Метод может быть модифицирован для обнаружения 20 различных вирусов [119].

Другие мультиплексные анализаторы для молекулярной детекции респираторных вирусов находятся в разработке либо уже коммерчески доступны, но еще не одобрены FDA в качестве диагностического оборудования и доступны за пределами США [12, 119, 121–123]. Одним из таких методов является использование микрочиповых технологий для одновременного обнаружения нескольких вирусов [124, 125]. ДНК, комплементарная выделенной вирусной РНК, амплифицируется путем случайной (неспецифичной) ПЦР. Флуоресцентно меченная амплифицированная ДНК гибридизуется с микрочипами, содержащими вирусспецифичные олигонуклеотиды. Микрочипы более чувствительны, чем ПФЛА: их чувствительность близка к индивидуальному ОТ-ПЦР анализу [125]. Другой метод сочетает ПЦР-амплификацию с масс-спектрометрией на основе электрораспыления. Это позволяет обнаружить наличие определенных вирусов в образце. В последнем подходе масса ампликонов определяется с точностью, достаточной для того, чтобы определить вирус путем сравнения с базой данных. Метод успешно применяется для идентификации и серотипирования аденовирусов и идентификации респираторных вирусов в клинических образцах [126, 127].

Таблица 15.7

**Коммерчески доступные анализаторы ПЦР-РВ для  
обнаружения респираторных вирусов**

Название	Формат исследования	Производитель	Определяемые вирусы	Поддержка FDA (номер соответствия 510 (К))
CDC Human Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection and Characterization Panel	Мультиплексная ПЦР-РВ	CDC	Грипп А и В, идентификация субтипов А/Н1, А/Н3, А/Н5 (азиатское происхождение)	Да (K080570)
Influenza A/H5 (Asian lineage) virus Real-time RT-PCR Primer и Probe Set	ПЦР-РВ	CDC	Грипп А/Н5 (азиатское происхождение)	Да (K060159)
MultiCode-PLX RVP	Мультиплексная ПЦР-РВ, таргет-специфическое расширение праймера, жидкостные микрочипы с микроносителями	EraGen Bio-sciences	Грипп А и В; RSV подтипов А и В; парагрипп типы 1-3, 4а, 4б; hMPV; риновирус; аденовирус видов В, С и Е; коронавирусы 229Е, OC43, NL63	Нет
NGEN RVA ASR kit	Мультиплексная ПЦР-РВ	Nanogen Inc.	Грипп А и В; RSV; парагрипп типов 1-3	Нет
ProFlu+ Assay	Мультиплексная ПЦР-РВ	Prodesse	Грипп А и В; RSV	Да (K073029)
Pro hMPV+ Assay	ПЦР-РВ	Prodesse	hMPV	Да (K082688)
Pro Paraflu+ Assay	Мультиплексная ПЦР-РВ	Prodesse	Парагрипп типов 1-3	Да (K091053)
ResPlex II assay	Мультиплексная ПЦР-РВ, таргет-специфическое расширение праймера, жидкостные микрочипы с микроносителями	Qiagen	Грипп А и В; RSV подтипов А и В; парагрипп типов 1-4; hMPV; риновирус; энтеровирус	Нет

Окончание табл. 15.7

Название	Формат исследования	Производитель	Определяемые вирусы	Поддержка FDA (номер соответствия 510 (К))
Verigene Respiratory Virus Nucleic Acid Test	Мультиплексная ПЦР-РВ	Nanosphere, Inc.	Грипп А и В; RSV	Да (K083088)
xTAG™ Respiratory Virus Panel	Мультиплексная ПЦР-РВ, таргет-специфическое расширение праймера, жидкостные микрочипы с микроносителями	Luminex Molecular Diagnostics	Грипп А и В, грипп подтипов А/Н1 и А/Н3; RSV подтипов А и В; парагрипп типов 1–3 hMPV; риновирус; аденовирус	Да (K081483)

Таблица 15.8

## Клеточные линии для выделения вирусов

Вирус	Клеточная линия
Риновирус	Легкие эмбриона человека: WI-38, MRC-5
Коронавирусы	
229E	MRC-5
NL63	LLC-MK2, Vero-B4
SARS	Vero E6
Аденовирус	Почки эмбриона человека, A549, HeLa, Hep-2, KB
Вирус гриппа А и В	Первичная культура клеток почек обезьяны, клетки Мадин—Дарби почек собаки (MDCK), LLC-MK2
Вирус парагриппа	Первичная культура клеток почки обезьяны, LLC-MK2
Респираторный синцитиальный вирус	Человеческие гетероплоидные клетки: Hep-2, HeLa, A549
Человеческий метапневмовирус	LLC-MK2

## Выделение вирусов

Для выделения вирусов используется нескольких методов, включая введение животным (например, мышам), инокуляцию в эмбрионы куриного яйца (например, вирусы гриппа), клеточные культуры и культуры органов (например, кольца трахеи). Хотя куриные эмбрионы еще

используются в некоторых лабораториях для изучения гриппа, почти во всех диагностических вирусологических лабораториях, где культивируют респираторные вирусы, используют клеточную культуру. Выбор клеточной линии зависит от вируса (вирусов), который необходимо вводить в культуру. К сожалению, не существует одной клеточной линии, которая бы поддерживала рост всех респираторных вирусов (табл. 15.8), некоторые вирусы плохо растут (hMPV, коронавирусы 229E и NL63) или совсем не растут (короновирусы OC43 и HKU-1) в клеточной культуре. Обнаружено, что при совместном культивировании клеток из различных источников спектр культивируемых вирусных штаммов расширяется. Одной из таких коммерчески доступных смесей клеток является линия R-mix FreshCell (Diagnostyc Hybrids, Athens, OH) — комбинация клеток легкого порка (Mv1Lu) и клеток человеческой аденокарциномы (A549). Клетки R-mix имеют чувствительность к вирусам гриппа А и В, RSV, PIV и аденовирусам, близкую к наблюдаемой у отдельных клеточных линий [128–130].

Для того чтобы определенные вирусы могли расти в культуре, условия культивирования клеток должны быть модифицированы. Например, музейные клеточные линии не производят протеаз, которые необходимы для расщепления гемагглютинина сезонных штаммов вируса гриппа, поэтому для поддержания роста необходимо добавлять в культуру экзогенные протеазы (TPCK-трипсин). Присутствие экзогенного белка, например фетальной бычьей сыворотки, может инактивировать протеазы и подавить рост вирусов, поэтому, прежде чем к клеткам будут добавлена содержащая трипсин среда, ФБС-среда должна быть удалена и клетки промыты средой без ФБС. Некоторые риновирусы растут лучше при низкой температуре, поэтому инкубация культуры при 33–34 °С вместо 36–37 °С может улучшить восстановление и рост риновирусов.

Для мониторинга клеточной культуры после инокуляции вируса существует ряд методов. Визуальный осмотр культуры на предмет цитопатического действия может помочь определить особенности вирусной репликации, но для окончательной идентификации вируса должны быть проведены подтверждающие тесты (например, иммунофлуоресцентные или ИФА). Оценка гемадсорбции эритроцитов или активности гемагглютинина в супернатанте культуры может проводиться каждые два-три дня для выявления ранних стадий репликации гемадсорбирующего вируса гриппа или парагриппа. Недостаток такого метода в том, что для роста вируса до определяемого уровня в культуре может потребоваться до двух недель. Для преодоления этой проблемы разработан метод пробирочного культивирования, обеспечивающий более раннюю детекцию респираторных вирусов в клеточной культуре. Клинический образец инокулируется в клеточный монослой путем низкоскоростного центрифугирования и после 24–48 ч инкубирования клеточную линию фиксируют и окрашивают мечеными вирусспецифичными антителами (табл. 15.5). Такой подход может обеспечить чувствительность, сопоставимую со стандартной



культурой клеток при более длительной инкубации [130]. Но недостаток этого метода в том, что он не позволяет произвести дальнейшую характеристику вируса (например, антигенный анализ или оценку чувствительности к противовирусным препаратам).

Таблица 15.9

## Методы идентификации и типирования вирусов

Иммунологические подходы	Молекулярные подходы
Иммунофлуоресценция	ОТ-ПЦР
Иммуноферментные исследования	Гибридизация
Нейтрализация	Секвенирование
Ингибирование гемагглютинации	Применение микрочипов

## Системы идентификации и типирования

Для идентификации и дальнейшей характеристики вирусных штаммов и некультивируемых вирусов в клинических образцах можно использовать различные методы (табл. 15.9). Наиболее часто применяются иммунологические методы. Изолированные вирусы наиболее часто идентифицируют с помощью иммунофлуоресценции (применяемой к инфицированным клеткам) или ИФА. Те же реагенты и наборы, которые есть в продаже и применяются для идентификации вирусов в клинических образцах, могут быть использованы и для идентификации вирусных штаммов (см. табл. 15.5). Эти реагенты имеют чувствительность и специфичность от 98 до 100%. Хотя наборы для быстрого ИФА-определения, представленные в табл. 15.6, помогают идентифицировать вирусы гриппа и RSV в клеточных культурах, но данных, которые подтверждают эффективность их применения в этих целях, недостаточно. Они могут давать ложноотрицательные результаты, когда вирус присутствует в низкой концентрации и наборы не адаптированы для таких случаев. Для первоначального этапа исследования применяются общие для нескольких вирусов антигены, например нуклеопротеид вируса гриппа или белок слияния RSV. Для дальнейшей характеристики вируса до подтипа или даже до специфического антигенного типа могут быть использованы более специфичные антисыворотки. Такие тесты более специализированы и обычно не проводятся в клинических диагностических лабораториях. Коммерчески доступны также антисыворотки для идентификации некоторых менее распространенных штаммов вирусов, таких как вирус парагриппа 4а и 4в, и которые не включены во многие наборы для идентификации респираторных вирусов.

Каждый вирус гриппа и парагриппа имеет вирусный гемагглютинин, и еще одним методом идентификации и типирования вируса является метод ингибирования (реакция торможения) гемагглютинации (РТГА). Метод РТГА может быть штаммоспецифичным, типо-

специфичным и подтипспецифичным в зависимости от применяемой сыворотки. Метод нейтрализации также может быть использован для идентификации вирусов, но эти исследования более трудоемки, поскольку вирусный штамм обязательно надо выделить. Тем не менее это один из главных иммунологических подходов для типирования риновирусов и аденовирусов. РТГА также может быть использована для идентификации аденовирусов, которые способны к агглютинации эритроцитов крысы или обезьян.

Для идентификации и характеристики вирусов все чаще применяются молекулярные методы. Результат ОТ-ПЦР образцов или клеточных культур обычно позволяет идентифицировать вирусы до уровня генов, но может быть применима и дальнейшая характеристика вирусов с использованием ОТ-ПЦР [12]. Например, вирус гриппа и подтипы RSV могут быть определены путем ОТ-ПЦР-амплификации с последующим подтипспецифичным секвенированием [131, 132]. ОТ-ПЦР-ампликоны могут быть секвенированы для определения генотипа и далее сделано заключение о серотипе, как это было сделано для риновирусов человека [133]. Аналогичным образом метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) может быть использован для различения вариантов вируса внутри подтипа, когда известна последовательность генов двух вариантов [134].

Гибридизация — еще один метод идентификации вирусов. Он часто используется в сочетании с методом ОТ-ПЦР. В ОТ-ПЦР в реальном времени этап гибридизации встроен в амплификационный анализ (см. гл. 5). Гибридизация также может быть использована для прямой идентификации вирусов [135]. Анализ вирусов методом гибридизации макромолекул путем диффузии через точечные отверстия в матрице (дот-блот-анализ) не более чувствителен, чем иммунологические методы (такие как ИФА), но более трудоемкий и сложный, поэтому прямая идентификация респираторных вирусов с использованием гибридизационных технологий используется нечасто. Как отмечалось выше, для идентификации респираторных вирусов в клинических образцах сейчас разрабатываются микрочиповые методы. Эти методы также могут быть использованы для деления штаммов на подтипы и варианты путем разработки и включения в микрочипы олигонуклеотидных зондов, специфичных для данных подтипов и вариантов [136].

## Серология

Серологические методы также могут использоваться для идентификации респираторных вирусных инфекций, но они редко применяются для клинической диагностики, поскольку требуют исследования парных сывороток (острой фазы и фазы выздоровления), собранной по крайней мере с промежутком в две недели. Диагноз не может быть надежно установлен с помощью одной сыворотки. Следовательно, эти методы обычно используются для эпидемиологических и клиниче-

ских научных исследований. Если уровень антител в сыворотке возрастает в четыре и более раз, то это рассматривается как индикатор инфекции. Наиболее широко распространенные серологические методы приведены в табл. 15.10.

Реакция связывания комплемента (РСК) методически относительно проста, и метод разработан для определения вируса гриппа, RSV, парагриппа, аденовируса и коронавируса 229Е и ОС43. Мишени в этом методе — видо- или типоспецифические эпитопы. РСК не часто используется для диагностики риновирусов и энтеровирусов, поскольку они дают гетеротипичный ответ и низка корреляция серологической реакции и метода нейтрализации. РСК могла бы быть разработана, но еще не описана для недавно открытых вирусов, таких как HMPV и новые коронавирусы.

Таблица 15.10

## Серологические методы для различных респираторных вирусов

Вирус	Связывание комплемента	ИФА	РТГА	Реакция нейтрализации
Риновирус	Отсутствуют данные	Отсутствуют данные	Редко используется	Серотипспецифическая
Коронавирусы				
229Е	Серотипспецифическая	Серотипспецифическая	Отсутствуют данные	Серотипспецифическая
ОС43	Серотипспецифическая	Серотипспецифическая	Серотипспецифическая	Серотипспецифическая
NL63	Не описана	Серотипспецифическая	Отсутствуют данные	Серотипспецифическая
SARS	Не описана	Серотипспецифическая	Отсутствуют данные	Серотипспецифическая
Аденовирус	Видоспецифическая	Видоспецифическая	Серотипспецифическая	Серотипспецифическая
Вирусы гриппа А и В	Типоспецифическая	Типо- и подтипспецифическая	Подтипспецифическая	Подтипспецифическая
Парагрипп	Серотипспецифическая; перекрестная реакция между серотипами	Типоспецифическая	Серотипспецифическая; перекрестная реакция между серотипами	Серотипспецифическая
Респираторный синцициальный вирус	Видоспецифическая	Видо- или типоспецифическая	Отсутствуют данные	Видо- или типоспецифическая
Человеческий метапневмовирус	Не описана	Видо- или типоспецифическая	Отсутствуют данные	Видо- или типоспецифическая

Твердофазный иммуноферментный анализ (*ELISA* или в общем ИФА) — наиболее пластичный серологический метод. Антигены, которые используются в этих исследованиях, могут варьировать от цельных вирусов до вирусных белков. ИФА относительно легко осуществим и применяется для измерения уровня иммунного ответа не только в образцах сыворотки, но и в образцах респираторных секретов. ИФА может быть модифицирован для измерения специфических иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) после инфекции или вакцинации [137, 138].

Реакция РТГА применяется для определения вирусов, обладающих гемагглютинационной активностью: гриппа, парагриппа, коронавируса ОС43, некоторых аденовирусов и риновирусов, а также энтеровирусов. Не все вирусы агглютинируют эритроциты из отдельного образца, поэтому источники эритроцитов выбирают на основе РТГА, которые уже были проведены. РТГА наиболее широко применяют для диагностики гриппа и парагриппа. Для исследования вирусов гриппа обычно используют куриные или индюшачьи эритроциты, хотя для измерения уровня антител к вирусу гриппа А/Н5 лучше использовать эритроциты лошади [139]. Для проведения РТГА с целью диагностики парагриппа используют эритроциты морской свинки или человека. Человеческая сыворотка может содержать ингибиторы гемагглютининов, которые повлияют на проведение анализа РТГА. Эти ингибиторы могут быть удалены предварительной обработкой сыворотки с ферментом, разрушающим рецептор [140].

Реакция нейтрализации основана на способности сыворотки (или респираторного секрета) подавлять репликацию вируса, поэтому эти исследования могут быть осуществлены только для культивируемых вирусов. В настоящее время разработан ряд различных вариантов, включая реакцию макронеutralизации (в культуральной пробирке), микронеutralизации (в 96-луночной планшете), метод редукции бляшкообразования и редукции фокуса флуоресценции. Вирус перемешивается и инкубируется с разными разведениями сыворотки и затем вводится в клеточную культуру. Количество вируса, используемого в исследовании, зависит от метода и изучаемого вируса, но варьирует от менее чем 10 TCID<sub>50</sub> (*tissue culture infective dose*, доза инфицирования тканевой культуры для 50% пробирок с инокулятом) для реакции макронеutralизации риновируса до 100 TCID<sub>50</sub> для вирусов гриппа и парагриппа. Признаки нейтрализации в разведениях сыворотки также варьируют от метода к методу и включают отсутствие признаков цитопатического действия в культуре [141, 142], отсутствие гемагглютинации в супернатанте культуры [143] и редукцию бляшкообразующих единиц в клеточной культуре [144].

### Исследование чувствительности к противовирусным препаратам

Существует ограниченное число противовирусных препаратов, которые пригодны для лечения респираторных вирусных инфекций. Для

лечения RSV обычно используется рибавирин, при этом резистентности к нему не было обнаружено. Адамантаны и ингибиторы нейраминидазы — единственные противовирусные препараты, активные против вирусов гриппа. Резистентность к обоим классам лекарств была описана и может быть измерена *in vitro*.

Адамантаны (амантадин и ремантадин) — единственные активные препараты против вируса гриппа группы А. Единичная точечная мутация в трансмембранном сегменте одной из нескольких аминокислот вирусного белка М2 может привести к развитию резистентности к этому классу препаратов. Золотым стандартом определения резистентности является реакция ингибирования бляшкообразования [145]. ОТ-ПЦР амплификация гена М2 с постаmplификационным анализом методом ПДРФ или прямым секвенированием ампликонов может также идентифицировать генетические мутации, которые могут быть ассоциированы с резистентностью [146, 147]. Важность резистентности к адамантанам была связана с широким ее распространением среди вирусов гриппа А/Н3N2 [148]. Вирусы гриппа Н1N1, вызвавшие пандемию 2009 г., также обладали высокой частотой (>90%) резистентности к адамантанам [149].

Ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир и занамивир) активны против вирусов гриппа А и В. Резистентность к ингибиторам нейраминидазы описана для обеих групп вирусов [150]. Резистентность не может быть достоверно измерена с использованием ингибирования роста целых вирусов в клеточной культуре. Вместо этого для обнаружения резистентности вируса к препаратам используется способность препарата ингибировать ферментативную активность вирусной нейраминидазы методом хемилюминесценции или флуоресценции субстрата [151]. Способ оценки ингибиторов нейраминидазы разработан в виде коммерческих наборов (NA-Star, Applied Biosystems) и успешно используется в программах контроля для скрининга вирусов гриппа на резистентность к этой группе лекарств [152]. Другой подход определения резистентности путем секвенирования гена нейраминидазы после ОТ-ПЦР амплификации. Этот подход позволяет идентифицировать мутации, ассоциированные с резистентностью к озельтамивиру, занамивиру или обоим препаратам [153], но не выявить в гене новые мутации, которые могут вызвать резистентность. Недавно была обнаружена широко распространенная резистентность к озельтамивиру в США и Европе у >90% вирусов гриппа А Н1N1, в результате чего были скорректированы рекомендации по эмпирическому выбору препаратов для лечения гриппа и усилен контроль за противовирусной резистентностью [154]. Тем не менее среди новых вирусов гриппа Н1N1 2009 г. резистентность к озельтамивиру была менее 1% вплоть до конца 2009 г. [149].

### Выбор методов лабораторных исследований

Каждая лаборатория должна определить цели своих диагностических программ в отношении респираторных вирусов. Использование

быстрых диагностических наборов (для антигенного или молекулярного анализа) помогает ранней диагностике респираторной вирусной инфекции, противовирусной терапии направленного действия и обеспечению мер эпидемиологического контроля. Для образцов, которые дали отрицательные результаты в экспресс-исследованиях, могут быть использованы клеточные культуры, в то время как положительным пробам должны подвергнуться более тщательному дополнительному тестированию. Этот подход наиболее экономически эффективен, но не позволяет выделить вирус для дальнейшего исследования.

На выбор метода анализа, который может быть предложен диагностической лабораторией, влияет ряд факторов, включая опыт и квалификацию сотрудников, качество оборудования. Первоначальные затраты связаны с закупкой флуоресцентного микроскопа для иммунофлуоресцентных исследований или амплификатор для молекулярных исследований в реальном времени. Необходимы навыки специалиста для интерпретации данных иммунофлуоресцентных исследований и для проведения и диагностики вероятных ошибок при проведении более сложных молекулярных исследований. Недостаточно квалифицированный персонал или необходимость получения результатов круглосуточно может привести к решению сначала внедрить методы менее сложного иммунохроматографического анализа. Выбор методов анализа также зависит от способа сбора и типа клинических образцов. Как только решение в отношении предлагаемого метода принято, должны быть разработаны стандартные операционные процедуры, которые вводятся в действие при сборе, транспортировке и исследовании клинических образцов. Такие процедуры должны снизить вероятность неточности результатов исследований в результате неправильных манипуляций с пробами. Кроме того, в рамках системы контроля качества работы проведение каждого способа анализа должно периодически проверяться методами внутреннего и внешнего контроля качества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abed Y, Wang D, Boivin G. WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(12):1939–1941.
2. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008; 41(1):29–33.
3. Bosis S, Esposito S, Niesters HG, et al. Coronavirus HKU1 in an Italian preterm infant with bronchiolitis. *J Clin Virol* 2007; 38(3):251–253.
4. Falsey AR. Human metapneumovirus infection in adults. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27 (suppl 10):S80–S83.
5. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(16):6212–6216.
6. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(20):1953–1966.
7. Raoult D, La Scola B, Birtles R. The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clin Infect Dis* 2007; 45(1):95–102.

8. Sloots TP, Whitley DM, Lambert SB, et al. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008; 42(3):233-243.
9. van Elden LJ, van Loon AM, van Alphen F, et al. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2004; 189(4):652-657.
10. Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, et al. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(10):1665-1667.
11. Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, et al. Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. *J Infect* 2005; 50(4):322-330.
12. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4):716-747.
13. Mazzoneini JP Jr., Crowell CB, Kang CS. Human metapneumovirus: An emerging respiratory pathogen. *J Emerg Med* 2008.
14. Nicholls JM, Peiris JS. Avian influenza: Update on pathogenesis and laboratory diagnosis. *Respirology* 2008; 13 (suppl 1):S14-S18.
15. Pyre K, Berkhout B, van der HL. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 2007; 81(7):3051-3057.
16. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, et al. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr* 2009; 98(1):123-126.
17. Mackay IM. Human rhinoviruses: the cold wars resume. *J Clin Virol* 2008; 42(4):297-320.
18. Monto AS, Bryan ER, Ohmit S. Rhinovirus infections in Tecumseh, Michigan: frequency of illness and number of serotypes. *J Infect Dis* 1987; 156(1):43-49.
19. Gwaltney JM Jr, Heinz BA. Rhinovirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:995-1018.
20. Gwaltney JM Jr. Rhinoviruses. In: Evans AS, Kaslow RA, eds. *Viral Infections of Humans, Epidemiology and Control*. New York, NY: Plenum Medical Book Company, 1997:815.
21. Dingle KE, Crook D, Jeffery K. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1003-1011.
22. Gwaltney JM Jr, Hendley JO, Simon G, et al. Rhinovirus infections in an industrial population. I. The occurrence of illness. *N Engl J Med* 1966; 275(23):1261-1268.
23. McMillan JA, Sandstrom C, Weiner LB, et al. Viral and bacterial organisms associated with acute pharyngitis in a school-aged population. *J Pediatr* 1986; 109(5):747-752.
24. Glezen WP, Fernald GW, Lohr JA. Acute respiratory disease of university students with special reference to the etiologic role of Herpesvirus hominis. *Am J Epidemiol* 1975; 101(2):111-121.
25. Hare CB, Kahn JO. Primary HIV infection. *Curr Infect Dis Rep* 2004; 6(1):65-71.
26. Bisno AL. Acute pharyngitis: Etiology and diagnosis. *Pediatrics* 1996; 97(6 Pt 2):949-954.
27. Arola M, Ziegler T, Ruuskanen O. Respiratory virus infection as a cause of prolonged symptoms in acute otitis media. *J Pediatr* 1990; 116(5):697-701.

28. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis* 2008; 46(6):815–823.
29. Pitkaranta A, Virolainen A, Jero J, et al. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1998; 102(2 Pt 1):291–295.
30. Bjornson CL, Johnson DW. Croup. *Lancet* 2008; 371(9609):329–339.
31. Cherry JD. State of the evidence for standard-of-care treatments for croup: are we where we need to be? *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24 (suppl 11):S198-S202, discussion.
32. Cherry JD. Clinical practice. Croup. *N Engl J Med* 2008; 358(4):384–391.
33. Marx A, Torok TJ, Holman RC, et al. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): Biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis* 1997; 176(6):1423–1427.
34. Rihkanen H, Ronkko E, Nieminen T, et al. Respiratory viruses in laryngeal croup of young children. *J Pediatr* 2008; 152(5):661–665.
35. Wenzel RP, Fowler AA III. Clinical practice. Acute bronchitis. *N Engl J Med* 2006; 355(20):2125–2130.
36. Gonzales R, Bartlett JG, Besser RE, et al. Principles of appropriate antibiotic use for treatment of uncomplicated acute bronchitis: Background. *Ann Intern Med* 2001; 134(6): 521–529.
37. Yanney M, Vyas H. The treatment of bronchiolitis. *Arch Dis Child* 2008; 93(9):793–798.
38. Durbin WJ, Stille C. Pneumonia. *Pediatr Rev* 2008; 29(5):147–158.
39. Greenberg SB. Viral pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* 1991; 5(3):603–621.
40. Mohsen AH, McKendrick M. Varicella pneumonia in adults. *Eur Respir J* 2003; 21(5):886–891.
41. Kim YJ, Boeckh M, Englund JA. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: Hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28(2):222–242.
42. Peltola V, Waris M, Osterback R, et al. Rhinovirus transmission within families with children: Incidence of symptomatic and asymptomatic infections. *J Infect Dis* 2008; 197(3):382–389.
43. Peltola V, Waris M, Osterback R, et al. Clinical effects of rhinovirus infections. *J Clin Virol* 2008; 43(4):411–414.
44. Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989; 56(5):839–847.
45. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, et al. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5):1839–1842.
46. Uncapher CR, DeWitt CM, Colonna RJ. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology* 1991; 180(2):814–817.
47. McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, et al. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. *J Clin Virol* 2007; 39(2):67–75.
48. Kistler A, Avila PC, Rouskin S, et al. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J Infect Dis* 2007; 196(6):817–825.



49. Briese T, Renwick N, Venter M, et al. Global distribution of novel rhinovirus genotype. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(6):944-947.
50. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 1992; 357(6377):420-422.
51. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, et al. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(22):7988-7993.
52. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10(4):368-373.
53. van der Hoek L, Sure K, Ithorst G, et al. Group is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2005; 2(8):e240.
54. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30(5):760-773.
55. Piedra PA Jr., Englund JA, Glezen WP. Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:763-790.
56. Cheuk DK, Tang IW, Chan KH, et al. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: A prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(11):995-1000.
57. Come JM, Marshall C, Smith S, et al. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002; 359(9309):831-834.
58. Greenberg SB, Allen M, Wilson J, et al. Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(1):167-173.
59. Greenberg SB. Respiratory consequences of rhinovirus infection. *Arch Intern Med* 2003; 163(3):278-284.
60. Wos M, Sanak M, Soja J, et al. The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(10):1082-10.
61. Larson HE, Reed SE, Tyrrell DA. Isolation of rhinoviruses and coronaviruses from 38 colds in adults. *J Med Virol* 1980; 5(3):221-229.
62. Wenzel RP, Hendley JO, Davies JA, et al. Coronavirus infections in military recruits. Three-year study with coronavirus strains OC43 and 229E. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109(6):621-624.
63. Heugel J, Martin ET, Kuypers J, et al. Coronavirus-associated pneumonia in previously healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(8):753-755.
64. Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, et al. Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol* 2005; 77(4):602-608.
65. Dijkman R, Jebbink MF, El Idrissi NB, et al. Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7):2368-2373.
66. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(20):1967-1976.
67. Vabret A, Mourez T, Dina J, et al. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8):1225-1229.
68. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, et al. New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* 2005; 75(3):455-462.
69. Ebihara T, Endo R, Ma X, et al. Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J Med Virol* 2005; 75(3):463-465.

70. Bastien N, Anderson K, Hart L, et al. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 2005; 191(4):503–506.
71. Chiu SS, Chan KH, Chu KW, et al. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis* 2005; 40(12):1721–1729.
72. Vabret A, Dina J, Gouarin S, et al. Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child Health* 2008; 44(4):176–181.
73. Wu PS, Chang LY, Berkhout B, et al. Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *Eur J Pediatr* 2008; 167(1):75–80.
74. Esper F, Weibel C, Ferguson D, et al. Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(5):775–779.
75. Kupfer B, Simon A, Jonassen CM, et al. Two cases of severe obstructive pneumonia associated with an HKU1-like coronavirus. *Eur J Med Res* 2007; 12(3):134–138.
76. Lau SK, Woo PC, Yip CC, et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6):2063–2071.
77. Gerna G, Campanini G, Rovida F, et al. Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J Med Virol* 2006; 78(7):938–949.
78. Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, et al. Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol* 2007; 38(3):244–250.
79. Esper F, Weibel C, Ferguson D, et al. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 2005; 191(4):492–498.
80. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2):242–264.
81. Fry AM, Curns AT, Harbour K, et al. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990–2004. *Clin Infect Dis* 2006; 43(8):1016–1022.
82. Chemaly RF, Ghosh S, Bodey GP, et al. Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85(5):278–287.
83. Chakrabarti S, Collingham KE, Holder K, et al. Parainfluenza virus type 3 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: Response to ribavirin therapy. *Clin Infect Dis* 2000; 31(6):1516–1518.
84. Elizaga J, Olavarria E, Apperley J, et al. Parainfluenza virus 3 infection after stem cell transplant: Relevance to outcome of rapid diagnosis and ribavirin treatment. *Clin Infect Dis* 2001; 32(3):413–418.
85. Nichols WG, Corey L, Gooley T, et al. Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood* 2001; 98(3):573–578.
86. Atmar RL, Guy E, Guntupalli KK, et al. Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults. *Arch Intern Med* 1998; 158(22):2453–2459.
87. Todd Faulks J, Drinka PJ, Shult P. A serious outbreak of parainfluenza type 3 on a nursing unit. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48(10):1216–1218.
88. Yorita KL, Holman RC, Sejvar JJ, et al. Infectious disease hospitalizations among infants in the United States. *Pediatrics* 2008; 121(2):244–252.

89. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003; 289(2):179-186.
90. Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: The «Cold War» has not ended. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2):590-596.
91. Raad I, Abbas J, Whimbey E. Infection control of nosocomial respiratory viral disease in the immunocompromised host. *Am J Med* 1997; 102(3A):48-52.
92. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3):546-557.
93. Couch RB, Kasel JA, Glezen WP, et al. Influenza: Its control in persons and populations. *J Infect Dis* 1986; 153(3):431-440.
94. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 2004; 292(11):1333-1340.
95. World Health Organization. New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; 84(24):244-248.
96. Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, et al. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5):763-767.
97. Macfarlane P, Denham J, Assous J, et al. RSV testing in bronchiolitis: Which nasal sampling method is best? *Arch Dis Child* 2005; 90(6):634-635.
98. Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, et al. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4337-4339.
99. Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, et al. Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7):2414-2417.
100. Chan KH, Peiris JS, Lim W, et al. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *J Clin Virol* 2008; 42 (1):65-69.
101. Moore C, Corden S, Sinha J, et al. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virol Methods* 2008; 153(2):84-89.
102. Daley P, Castriciano S, Chernesky M, et al. Comparison of flocked and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6):2265-2267.
103. Wang WK, Chen SY, Liu IJ, et al. Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(7):1213-1219.
104. Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):3971-3974.
105. Robinson JL, Lee BE, Kothapalli S, et al. Use of throat swab or saliva specimens for detection of respiratory viruses in children. *Clin Infect Dis* 2008; 46(7):e61-e64.
106. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(2):120-131.
107. Baxter BD, Couch RB, Greenberg SB, et al. Maintenance of viability and comparison of identification methods for influenza and other respiratory viruses of humans. *J Clin Microbiol* 1977; 6(1):19-22.

108. Ptakova M, Tumova B. Detection of type A and B influenza viruses in clinical materials by immuno-electron microscopy. *Acta Virol* 1985; 29(1):19–24.
109. Liu C. Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein-labeled antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:883–887.
110. Sizun J, Arbour N, Talbot PJ. Comparison of immunofluorescence with monoclonal antibodies and RT-PCR for the detection of human coronaviruses 229E and OC43 in cell culture. *J Virol Methods* 1998; 72(2):145–152.
111. Dominguez EA, Taber LH, Couch RB. Comparison of rapid diagnostic techniques for respiratory syncytial and influenza A virus respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol* 1993; 31(9):2286–2290.
112. Swierkosz EM, Flanders R, Melvin L, et al. Evaluation of the Abbott TEST-PAK RSV enzyme immunoassay for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol* 1989; 27(6):1151–1154.
113. Zambon M. Laboratory diagnosis of influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza*. London, UK: Blackwell Science Ltd., 1988:291–313.
114. Selvarangan R, Abel D, Hamilton M. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(2):157–161.
115. Uyeki TM. Influenza diagnosis and treatment in children: A review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(2):164–177.
116. Ginochio CC, Zhang F, Manji R, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009; 45(3):191–195.
117. Achyuthan KE, Pence LM, Appleman JR, et al. ZstatFlu-II test: A chemiluminescent neuraminidase assay for influenza viral diagnostics. *Luminescence* 2003; 18(3):131–139.
118. Noyola DE, Clark B, O'Donnell FT, et al. Comparison of a new neuraminidase detection assay with an enzyme immunoassay, immunofluorescence, and culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3):1161–1165.
119. Mahony J, Chong S, Merante F, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2965–2970.
120. Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J Clin Virol* 2007; 40 (suppl 1):S31–S35.
121. Tillmann RL, Simon A, Muller A, et al. Sensitive commercial NASBA assay for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen. *PLoS One* 2007; 2(12):e1357.
122. Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, et al. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7):2105–2109.
123. Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, et al. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2779–2786.

124. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24):15687-15692.
125. Chiu CY, Urisman A, Greenhow TL, et al. Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children. *J Pediatr* 2008; 153 (1):76-83.
126. Blyn LB, Hall TA, Libby B, et al. Rapid detection and molecular serotyping of adenovirus by use of PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2):644-651.
127. Lodes MJ, Suci D, Wilmoth JL, et al. Identification of upper respiratory tract pathogens using electrochemical detection on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2007; 2(9):e924.
128. Weinberg A, Brewster L, Clark J, et al. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2004; 30(1):100-105.
129. St George K, Patel NM, Hartwig RA, et al. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J Clin Virol* 2002; 24(1-2):107-115.
130. Barenfanger J, Drake C, Mueller T, et al. R-Mix cells are faster, at least as sensitive and marginally more costly than conventional cell lines for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2001; 22(1):101-110.
131. Atmar RL, Baxter BD. Typing and subtyping clinical isolates of influenza virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 1996; 7(2):77-84.
132. Stockton J, Ellis JS, Saville M, et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2990-2995.
133. Lee WM, Kiesner C, Pappas T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One* 2007; 2(10):e966.
134. O'Donnell FT, Munoz FM, Atmar RL, et al. Epidemiology and molecular characterization of co-circulating influenza A/H3N2 virus variants in children: Houston, Texas, 1997-8. *Epidemiol Infect* 2003; 130(3):521-531.
135. Lehtomaki K, Julkunen I, Sandelin K, et al. Rapid diagnosis of respiratory adenovirus infections in young adult men. *J Clin Microbiol* 1986; 24(1):108-111.
136. Wang Z, Malanoski AP, Lin B, et al. Resequencing microarray probe design for typing genetically diverse viruses: human rhinoviruses and enteroviruses. *BMC Genomics* 2008; 9:577.
137. Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, et al. Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 2000; 181(3):1133-1137.
138. Burlington DB, Clements ML, Meiklejohn G, et al. Hemagglutinin-specific antibody responses in immunoglobulin G, A, and M isotypes as measured by enzyme-linked immunosorbent assay after primary or secondary infection of humans with influenza A virus. *Infect Immun* 1983; 41(2):540-545.
139. Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, et al. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J Med Virol* 2003; 70(3):391-398.
140. Dowdle WR, Kendal AP, Noble GR. Influenza viruses. In: Lennette EH, Schmidt NJ, eds. *Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. Washington, DC: American Public Health Association, 1979:585-609.

141. Douglas RG Jr., Fleet WF, Cate TR, et al. Antibody to rhinovirus in human sera. I. Standardization of a neutralization test. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127(2):497–502.
142. Piedra PA, Wyde PR, Castleman WL, et al. Enhanced pulmonary pathology associated with the use of formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine in cotton rats is not a unique viral phenomenon. *Vaccine* 1993; 11(14):1415–1423.
143. Frank AL, Puck J, Hughes BJ, et al. Microneutralization test for influenza A and B and parainfluenza 1 and 2 viruses that uses continuous cell lines and fresh serum enhancement. *J Clin Microbiol* 1980; 12(3):426–432.
144. Siber GR, Leombruno D, Leszczynski J, et al. Comparison of antibody concentrations and protective activity of respiratory syncytial virus immune globulin and conventional immune globulin. *J Infect Dis* 1994; 169(6):1368–1373.
145. Hayden FG, Cote KM, Douglas RG Jr. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17(5):865–870.
146. Englund JA, Champlin RE, Wyde PR, et al. Common emergence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A viruses in symptomatic immunocompromised adults. *Clin Infect Dis* 1998; 26(6):1418–1424.
147. Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, et al. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J Infect Dis* 1995; 172(5):1352–1355.
148. Bright RA, Shay DK, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295(8):891–894.
149. <https://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2009-2010/weekly47.htm>.
150. Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, et al. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J Infect Dis* 2006; 193(6):760–764.
151. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(7):2264–2272.
152. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9):3284–3292.
153. Lackenby A, Thompson CI, Democratis J. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(6):626–638.
154. CDC. Update: Influenza activity — United States, September 28, 2008–January 31, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58(5):115–119.



# 16 ИНФЕКЦИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

**Р.Л. Этмар, М.К. Эстес**

Robert L. Atmar and Mary K. Estes, Department of Medicine and Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Гастроэнтерит — одно из самых распространенных заболеваний человечества. Кишечные вирусы — важная причина гастроэнтерита, но их вклад в этиологию этого заболевания неизвестен. Диспептические симптомы (диарея, боль в животе, рвота) могут наблюдаться и при заражении другими вирусами (например, гриппом, коронавирусом SARS, вирусами денге или гепатита), хотя такие инфекции можно заподозрить при наличии других характерных клинических признаков и симптомов. В этой главе мы сосредоточимся на идентификации и диагностике кишечных вирусов человека, которые первично вызывают желудочно-кишечные инфекции.

## КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Клинические проявления заболеваний, вызываемых вирусами гастроэнтерита, включают абдоминальные и системные симптомы, хотя может возникать субклиническая или бессимптомная инфекция. Ключевой симптом — водянистая диарея или, редко, кровавистая диарея. Еще один распространенный симптом — рвота, она может быть ассоциирована с диареей или возникать без нее. Другие симптомы — анорексия, тошнота, боль в животе, недомогание, миалгии, головная боль и лихорадка.

Клинические проявления начальной стадии инфекций, вызванных разными вирусами гастроэнтерита, во многом схожи, поэтому дифференциальная диагностика не может опираться только на симптоматику. Обильная диарея с последующим уменьшением объема стула и лихорадкой у ребенка младше 2 лет характерна для ротавирусной инфекции [1]. Вспышки острого гастроэнтерита, связанные с приемом пищи или воды в больницах, школах, детских садах, на круизных лайнерах, в интернатах, с основной жалобой на рвоту наводят на мысль о норовирусной инфекции [2–4]. И ротавирус, и норовирус могут стать причиной диареи путешественников. Каждая из основных групп вирусов гастроэнтерита может приводить к затяжной диарее у пациентов с нарушенным иммунитетом [1, 5–8].

## ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ

Гастроэнтерит вызывают вирусы из четырех семейств (табл. 16.1). В качестве причины гастроэнтерита были предложены и другие вирусы, обнаруженные в образцах фекалий пациентов с диареей, но в настоящее время недостаточно данных о роли этих вирусов в патогенезе гастроэнтерита у человека. Сюда входят вирусы, вызывающие диарею у животных (например, коронавирусы, торовирусы, пикобирнавирусы и пестивирусы), а также возбудители, данные о которых ограничены (например, вирус Аичи). В этой главе будут рассмотрены только вирусы, точно вызывающие гастроэнтерит.

### Ротавирус

*Rotavirus* — род в семействе *Reoviridae*. Название происходит от лат. *rota* — колесо, что отражает морфологические особенности вируса при электронной микроскопии. Ротавирусы — безоболочные икосаэдрические вирусы 75 нм в диаметре (100 нм, если учитывать VP4-шипы). Геном состоит из 11 сегментов двуцепочной РНК, заключенной в трехслойный белковый капсид. Внутренний слой образован белками VP1, VP2 и VP3, которые участвуют в вирусной репликации и синтезе мРНК. Средний слой образует белок VP6, составляющий 50% массы вирусной частицы и являющийся группоспецифическим антигеном. Наружный слой образован VP7 с выступающими шипами VP4, и оба этих белка служат мишенями для серотипирования. При заражении клетки более чем одним штаммом может происходить реаранжировка вирусных генов благодаря сегментарности генома вируса.

Ротавирусы делятся на группы исходя из наличия перекрестно-реагирующих эпитопов на белке VP6. Самая частая причина заражения человека — ротавирусы группы А. Ротавирусы других групп (В—F) вызывают инфекции животных, хотя иногда человека могут инфицировать ротавирусы групп В и С. Ротавирусы группы А классифицируются серотипически по наличию двух поверхностных белков: гликопротеина VP7 (G-тип) и чувствительного к протеазе P4 (P-тип). И наоборот, последовательность генов, кодирующих VP7 и VP4, может использоваться для генотипической классификации. Результаты определения серотипа и генотипа VP7 совпадают, их называют G-серотипом. Определения генотипа и серотипа VP4 не всегда согласуются, поэтому VP4 классифицируется либо по серотипу, либо по генотипу (номер генотипа указывают в скобках). В настоящее время обнаружено 19 G-типов и 32 [P]-типа.

### Кальцивирус

Семейство *Calciviridae* включает два рода, *Norovirus* и *Sapovirus*, вызывающие инфекцию у человека. Название семейства происходит от лат. *calyx* — чаша, кубок; это отражает чашеобразные вдавления на поверхности вирусной частицы. Кальцивирусы — безоболоч-



ные икосаэдрические вирусы размером приблизительно 28–40 нм. Геном — одноцепочная «+»-цепь РНК, кодирующая неструктурные белки и два структурных — VP1 и VP2. Саповирусы отличаются от норовирусов тем, что главный структурный белок VP1 находится в той же рамке считывания, что и неструктурные белки, а VP1 норовирусов кодируется отдельной открытой рамкой считывания. Саповирусы имеют классическую «кальцивирусную» морфологию при ЭМ.

### *Norovirus*

Норовирусы подразделяются на пять геногрупп на основании секвенирования вирусного генома. Геногруппы I, II и IV представляют вирусы, патогенные для человека, а геногруппы III и V — для крупного рогатого скота и мышей соответственно. Каждая геногруппа подразделяется на генотипы (или генетические кластеры) на основании аминокислотной последовательности VP1. В настоящее время имеется 8, 19, 2, 2 и 1 генотип в геногруппах I, II, III, IV и V соответственно; в геногруппах I и II есть дополнительные генотипы, которым еще не присвоены номера. Геногруппе присваивается римский номер, а генотипу — арабский. Таким образом, вирус Норфолк, который представляет собой прототипный норовирусный штамм и принадлежит к геногруппе I, генотипу 1, обозначается как штамм GI.1. Поскольку норовирусы человека невозможно вырастить в культуре клеток, неясно, насколько точно схема классификации генотипов отражает серотипические различия между группами.

### *Саповирус*

Саповирусы также подразделяются на пять геногрупп. Штаммы геногруппы III заражают свиней, а вирусы всех остальных могут заражать человека. Аналогично норовирусам, саповирусы далее подразделяются на генотипы. Геногруппы I и II содержат пять и шесть генотипов, соответственно три другие геногруппы содержат по одному генотипу.

### **Аденовирус**

Кишечные аденовирусы относятся к роду *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae*. Название рода происходит от греч. *aden* — железа и связано с аденоидной железой, из которой был изолирован прототипный штамм. Аденовирусы — безоболочные икосаэдрические вирусы, их размер приблизительно 70–90 нм. Геном состоит из двуцепочной ДНК длиной приблизительно 32 т. п. н. Известно шесть видов (ранее называемых подгруппами или подродами) А–F, вызывающих заболевания человека, и каждый вид содержит один или более серотипов. Виды разделяются по их способности агглютинировать эритроциты крысы или обезьяны. Кишечные аденовирусы относятся к виду F, который частично агглютинирует эритроциты крысы; имеется два серотипа (типы 40 и 41).

## Астровирус

Астровирусы, патогенные для человека, относятся к роду *Mamastrovirus* семейства *Astroviridae*. Названия семейства и рода происходят от греч. *astron*, — звезда; вирион при ЭМ похож на 5- или 6-конечную звезду. Астровирусы — безоболочные, икосаэдрические вирусы размером приблизительно 28–30 нм. Геном — одноцепочная, положительно направленная РНК. Вирусный капсид состоит из трех белков, получающихся в результате протеолитического расщепления одного более крупного белка, экспрессируемого с открытой рамки считывания 2 вирусного генома. Существует восемь серотипов штаммов, инфицирующих человека, и дополнительные серотипы, патогенные для животных (коров, кур, индеек). Филогенетический анализ капсидного гена позволяет разделить астровирусы человека на восемь генотипов. Серология и филогенетический анализ дают совпадающие результаты, поэтому можно пользоваться любой из этих схем классификации.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Вирусный гастроэнтерит возникает круглогодично, но группы вирусов имеют сезонные различия в распространении. Ротавирус — главная причина обезвоживания во всем мире — имеет зимний пик, приходящий на более холодные месяцы в умеренном климате, но в тропиках сезонность не прослеживается. Аналогичный зимний пик есть у вспышек норовирусной инфекции, хотя эндемичные случаи возникают круглогодично. Астровирусная инфекция чаще всего отмечается зимой в умеренном климате и в сезон дождей в тропиках. Для саповирусов и кишечных аденовирусов не отмечено сезонного подъема заболеваемости.

От инфекций, вызванных ротавирусами группы А, ежегодно умирают 600–800 тыс. детей младше 5 лет, преимущественно в развивающихся странах. Смертность из-за ротавируса нетипична для США, но первичная инфекция приводит к 55–70 тыс. случаев госпитализации ежегодно. Инфекция у детей постарше и взрослых может возникать после контакта с больным ребенком или в составе вспышки (пищевой, водной или в закрытой популяции, например в школах, детских садах). Ротавирусы групп В и С гораздо реже вызывают заболевание у человека, но могут быть причиной спорадических заболеваний или вспышек гастроэнтерита.

Кальцивирусы человека заражают лиц всех возрастов, большинство инфекций — норовирусные. Согласно оценкам, в США ежегодно отмечается 23 млн случаев норовирусной инфекции — это вторая по распространенности (после ротавируса) причина госпитализации маленьких детей [2, 9]. В развитых странах из-за норовирусов ежегодно госпитализируют 64 200 человек, в развивающихся странах — более миллиона, умирает 218 тыс. человек [10]. Норовирусы вызывают как эндемичные инфекции, так и эпидемии, которые связаны

с сезонным подъемом вспышек гастроэнтерита. От 70 до более 95% вспышек небактериального гастроэнтерита во всем мире связано с норовирусами. Однако саповирусы оказываются причиной вспышек лишь иногда, чаще всего они вызывают гастроэнтерит у маленьких детей.

Астровирусы инфицируют преимущественно маленьких детей, но заразиться могут пациенты с нарушенным иммунитетом, пожилые люди, а также здоровые лица при контакте с загрязненной пищей или водой. Исследования в общинах показали, что астровирусы вызывают приблизительно 2–6% случаев острого гастроэнтерита. Клиническое течение болезни может быть затяжным у пациентов с тяжелым нарушением иммунитета (например, после пересадки костного мозга). Лишь изредка астровирусы были идентифицированы как причина пищевых или водных вспышек.

Кишечные аденовирусы вызывают 1–2% случаев гастроэнтерита в большинстве исследований, симптоматическое заражение более вероятно у детей младше 2 лет. Хроническая диарея была также ассоциирована с ВИЧ-инфекцией.

Преобладающий механизм передачи кишечных вирусов — фекально-оральный путь. Передача может происходить от человека к человеку, при контакте с рвотными массами или при употреблении зараженной пищи или воды. Значимость этих путей передачи для разных кишечных вирусов отличается. В передаче норовирусов также играл роль контакт с рвотными массами — непосредственный или при попадании аэрозоля (воздушный путь).

## ЛАБОРАТОРНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

### Типы образцов и их обработка

Кишечные вирусы первично выделяются со стулом, поэтому образцы фекалий — основные образцы для диагностического исследования. В некоторых случаях можно использовать также образцы рвотных масс и сыворотки. В первые дни заболевания выделяется больше вирусов, затем их количество снижается; в малых количествах вирус может выделяться несколько недель. Таким образом, максимальную диагностическую ценность имеют образцы, полученные в первые дни болезни. В целом вероятность выявить вирусы энтерита в ректальных мазках меньше, чем в образцах фекалий, поэтому последние предпочтительнее [11]. Также можно использовать полоски хроматографической бумаги, предварительно обработанные додецилсульфатом натрия-ЭДТА — для сбора, транспортировки и хранения образцов, подлежащих тестированию методом ПЦР-РВ [12, 13]. Нуклеиновые кислоты ротавируса и кальцивируса можно выявить в течение месяца, если образцы хранятся при комнатной температуре, и позже, если при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а инфекционность ротавируса и кошачьего кальцивируса (близкий к кальцивирусу человека) теряется при контакте с бумагой.

Такой метод может быть полезен для проведения эпидемиологических исследований, когда образцы забирают сами пациенты.

Несколько граммов фекалий следует поместить в чистый контейнер и плотно запечатать для транспортировки в лабораторию. Собирать диарейный стул у детей в подгузниках можно несколькими способами. Можно подстелить клеенку, чтобы жидкий стул не просачивался в подгузник. Также допускается сбор стула с подгузника деревянным шпателем для осмотра горла или выжимание вырезанного кусочка подгузника в стерильную воду или физраствор на фосфатном буфере.

В клинические образцы для вирусологической диагностики часто добавляют среду, консерванты, сыворотку животных или детергенты в целях повышения стабильности вирусов, но эти вещества могут мешать проведению некоторых диагностических проб (таких как иммуноферментный анализ и латекс-агглютинация), поэтому их не следует добавлять в образцы фекалий. В лаборатории образцы можно хранить при 4 °С от нескольких дней до нескольких недель. Образцы длительного хранения замораживают до -70 °С, хотя в некоторых наборах выявления антигена указано, что допустимо замораживание только до -20 °С.

### Прямое выявление вируса

Для прямого выявления вирусов гастроэнтерита в клинических образцах применяется несколько методов, в том числе ЭМ, выявление антигена и нуклеиновых кислот. Принципы каждого из этих методов детально описаны в предыдущих главах. В разных лабораториях используются те или иные методы в зависимости от способов забора образцов, местных особенностей и ресурсов лаборатории.

#### *Электронная микроскопия*

ЭМ была первым методом выявления вирусов гастроэнтерита. Принципиальные преимущества ЭМ перед другими методами диагностики — возможность скрининга большого количества разных кишечных вирусов в одной пробе и выявление штаммов, не найденных в пробах на наиболее распространенные циркулирующие кишечные вирусы. Например, коммерческие наборы для выявления антигенов обнаруживают ротавирус только группы А, а ЭМ может выявить также ротавирусы групп В и С. Недостатки метода — высокая стоимость оборудования, необходимость специальной подготовки персонала и меньшая чувствительность по сравнению с другими диагностическими методами. Чувствительность можно повысить при использовании гипериммунной сыворотки для агрегации вирусов (иммуноэлектронная микроскопия), но даже при этой модификации предел обнаружения составляет приблизительно  $10^5$ – $10^6$  вирусных частиц в 1 мл. Сообщалось, что ЭМ дала положительный результат не более чем у 50% пациентов с острой норовирусной инфекцией, чувствительность ЭМ в отношении ротавирусов меньше, чем у ИФА [14, 15].

## Выявление антигена

Для каждого из вирусов гастроэнтерита доступны методы выявления антигена (табл. 16.2). Используются различные методы, в том числе твердофазный ИФА, иммунохроматография и агглютинация латекса. ТИФА проводится в клинической лаборатории, результат получают через 2 ч. Иммунохроматография и агглютинация латекса просты в исполнении и занимают менее 30 мин; по некоторым сообщениям, чувствительность агглютинации латекса ниже (70–90%), чем других методов (>90%) [16, 17].

Таблица 16.2

## Доступные в продаже пробы выявления антигена для вирусов гастроэнтерита

Формат теста	Выявляемый(е) вирус(-ы)	Название набора	Производитель (веб-сайт)
Иммуноферментная проба	Ротавирус	Vidas® Rotavirus Pathfinder® Rotavirus	bioMerieux, Inc. (www.bioMerieux-diagnostics.com)
	Ротавирус	Premier™ Adenoclone®	Bio-Rad Laboratories (www.bio-rad.com)
	Ротавирус, аденовирус	Premier™ Adenoclone® Type 40/41	Meridian Bioscience, Inc. (www.meridianbioscience.com)
	Ротавирус, аденовирус	Rotascreen®, Adenoscreen®	Microgen Bioproducts (www.microgenbioproducts.com)
	Ротавирус, аденовирус, астровирус, норовирус	IDEIA Rotavirus, IDEIA Adenovirus Amplified IDEIA Astrovirus®, Amplified IDEIA Norovirus®	Oxoid (www.oxoid.com)
	Ротавирус, аденовирус, астровирус, норовирус	RIDASCREEN® Rotavirus®, RIDASC-REEN® Adenovirus, RIDASCREEN Astrovirus®, RIDASCREEN® Norovirus®	R-Biopharm AG (www.r-biopharm.com)
	Норовирус	NV-AD®	Denka-Seiken Co., Ltd. (http://denka-seiken.jp/english/)
Иммунохроматография	Ротавирус, аденовирус	BIOCARD™ Rota stick®, BIOCARD™ Adeno stick®	ANI Biotech Oy (www.anibiotech.fi)
	Ротавирус, аденовирус	Vikia® Rota-adeno®	bioMerieux, Inc. (www.bioMerieux-diagnostics.com)

Окончание табл. 16.2

Формат теста	Выявляемый(е) вирус(-ы)	Название набора	Производитель (веб-сайт)
	Ротавирус	ImmunoCard STAT!® Rotavirus	Meridian Bioscience, Inc. ( <a href="http://www.meridianbioscience.com">www.meridianbioscience.com</a> )
	Ротавирус, аденовирус	Rotascreen® <sup>a</sup> , Adenoscreen®	Microgen Bioproducts ( <a href="http://www.microgenbioproducts.com">www.microgenbioproducts.com</a> )
	Ротавирус, аденовирус	RIDA®QUICK Rotavirus, RIDA® QUICK Rotavirus/Adenovirus Combi <sup>a</sup>	R-Biopharm AG ( <a href="http://www.r-biopharm.com">www.r-biopharm.com</a> )
	Ротавирус, аденовирус	Xpect®Rotavirus, SAS™ Adeno Test Kit <sup>a</sup>	Remel ( <a href="http://www.remel.com">www.remel.com</a> )
Агглютинация латекса	Ротавирус	Pastorex®Rotavirus	Bio-Rad Laboratories ( <a href="http://www.bio-rad.com">www.bio-rad.com</a> )
	Ротавирус	Virogen®Rotatest®	Inverness Medical Professional Diagnostics ( <a href="http://www.invernessmedicalpd.com">www.invernessmedicalpd.com</a> )
	Ротавирус, аденовирус	Rotascreen® <sup>a</sup> , Adenoscreen®	Microgen Bioproducts ( <a href="http://www.microgenbioproducts.com">www.microgenbioproducts.com</a> )
	Ротавирус, аденовирус	Diarlex Rota, Diarlex Adeno, Diarlex Rota-Adeno, Rotalex <sup>+</sup> , Adenolex	Orion Diagnostica Oy ( <a href="http://www.oriondiagnostica.fi">www.oriondiagnostica.fi</a> )
	Ротавирус	Rotavirus Test kit	Remel ( <a href="http://www.oriondiagnostica.com/">http://www.oriondiagnostica.com/</a> )

<sup>a</sup> Определяет серотипы аденовируса (не только типы 40 и 41)

Выявление антигена — основной способ диагностики ротавирусной инфекции. Используются моноклональные или поликлональные антисыворотки для распознавания белка VP6 штаммов группы А, поэтому штаммы ротавируса других групп часто не распознаются. Чувствительность проб такая же или выше, чем у ЭМ. Антиген ротавируса может быть выявлен в сыворотке детей с острой инфекцией [18]. Хотя при оценке образцов фекалий на ротавирусный антиген чувствительность метода выше, пробы на сывороточный антиген выявляют инфекцию у некоторых детей с отсутствием антигена в стуле [19].

В образцах фекалий можно выявить аденовирусы с помощью доступных в продаже наборов для определения антигена. Большинство методов не различает кишечные (группы F) и аденовирусы других групп, а Adenoclone® Type40/41 может не распознать некоторые штаммы группы F (возможно, из-за появления новых антигенных вариантов) [20].

Коммерческие наборы для выявления антигена были созданы также для астровирусов и норовирусов. У методов определения антигенов норовирусов были проблемы с чувствительностью и специфичностью, и некоторые генотипы не выявлялись вообще [21]. Тем не менее эти методы оказались полезными для выявления инфекций, вызванных норовирусами, когда можно было тестировать много (шесть и более) образцов фекалий из вспышки [22]. Чтобы индивидуально диагностировать норовирусную инфекцию, нужна дальнейшая доработка. Для саповирусов не создано коммерческих проб на выявление антигена.

### *Выявление нуклеиновых кислот*

Для выявления вирусов гастроэнтерита было разработано несколько разных методов обнаружения нуклеиновых кислот. Чаще всего используется ПЦР, хотя для РНК-вирусов описаны методы сиквенса-амплификации (NASBA). Другие методы, такие как прямое выявление вирусных геномов после хроматографии и выявление с использованием методов дот-блот гибридизации, широко не используются, потому что их чувствительность ниже по сравнению с молекулярными методами на основе амплификации.

Для всех вирусов гастроэнтерита ПЦР имеет более высокую чувствительность, чем ЭМ и антигенная диагностика. Перед постановкой ПЦР-амплификации для каждого РНК-вируса надо синтезировать комплементарную ДНК. Затем используются вирусспецифичные праймеры для амплификации консервативных частей генома. Специфичность пробы определяется по гибридизации со специфическим зондом или прямым секвенированием ампликонов. Создание ПЦР-РВ (табл. 16.3) значительно сократило время анализа: с момента постановки пробы до получения результата проходит несколько часов. Анализ в реальном времени позволяет либо выявлять вирусные ампликоны с помощью вирусспецифичного зонда, либо анализировать кривую плавления с помощью неспецифического флуоресцентного красителя, такого как SYBR-зеленый. С помощью этого метода можно получать количественные данные. Еще одно преимущество ПЦР в реальном времени — отпала необходимость подтверждения специфичности пробы, что снижает вероятность заражения лаборатории продуктами амплификации, которые затем приводят к ложноположительным результатам.

В образцах фекалий часто содержатся вещества, ингибирующие функцию ферментов, использующихся при амплификации нуклеиновых кислот, что может мешать выявлению вируса. Разработано множество путей снижения актуальности этой проблемы. Существуют методы эффективного удаления ингибиторов из большей части образцов фекалий, варьирующие по сложности. Простейший подход заключается в приготовлении 10% суспензии фекалий с последующим прогреванием образца до 95 °С для выхода вирусной нуклеиновой кислоты из капсида [23]; при таком подходе образец тестируют

сразу после прогревания во избежание распада нуклеиновых кислот. Методы с применением детергентов и денатуратов (таких как тиоцианат гуанидина) требуют дополнительных усилий, но получающиеся экстракты нуклеиновых кислот более стабильны [24]. Сейчас доступен ряд коммерческих наборов для эффективной экстракции вирусных нуклеиновых кислот из образцов фекалий [24–26]. К экстрагированному образцу можно добавить нуклеиновую кислоту для внутреннего контроля — это распространенный подход к выявлению ингибиторов [23].

Таблица 16.3

**Некоторые пробы ПЦР в реальном времени для выявления вирусов гастроэнтерита**

Вирус	Ген(ы)-мишень(и)	Праймеры	Метод выявления ампликона	Ссылка
Рота-вирус	NSP3 (группа А)	NVP3F, NVP3R	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	67
	NSP3 (группа А)	NVP3Deg, NVP3R1	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	68
	NSP3 (группа А)	NSP3F, NSP3R	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	69
	VP6 (группа А)	VP6-F, VP6-R	SYBR зеленый	70
	VP6 (группа А)	RotaA-fwd1, RotaA-fwd-2, RotaA.rev1, RotaA.rev2	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	27
	VP7	RotaC.fwd, RotaC.rev	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	27
Норо-вирус	GI и GII-полимеразы/капсид	GI—COG1F, COG1R; GII—COG2F, COG2R	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	71
	GI-капсид, GII-полимераза	GI—CapA, CapB GII—p110; SR46	SYBR зеленый	67
	GIV-полимераза/капсид	Mon4F, Mon4R	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопроба	72
	GI, GII и GIV-полимераза	GI-GI.fwd, GI.rev; GII и GIV-GII.fwd, GIV.fwd, GII и GIV.rev	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	73



Окончание табл. 16.3

Вирус	Ген(ы)-мишень(и)	Праймеры	Метод выявления ампликона	Ссылка
Сапо-вирус	GI, GII, GIV и GV-полимераза	Sav124F, Sav1F, Sav5F, Sav1245R sapo.fwdA, sapo.fwd.B, sapo.rev	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	74
	GI, GII и GIV-полипротеин		Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	73
Астро-вирус	3'-нетранслируемый участок (UTR)	MM2, MM67	SYBR зеленый. Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	75
	Предшественник белка капсида	Hast.fwd, Hast.rev		73
Адено-вирус	Ген гексона (все виды аденовирусов)	AQ1, AQ2	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	76
	Ген гексона (все виды аденовирусов)	AdnU-S', AdnU-A2	SYBR-зеленый	77
	Ген гексона (вид F)	Adeno.fwd, Adeno.rev	Двойная метка, вирусспецифич. FRET олигопробы	27

Относительная чувствительность методов на основе нуклеиновых кислот по сравнению с методами выявления антигена варьирует в зависимости от вируса. При идентификации ротавирусов группы А в клинических образцах чувствительность ПЦР-РВ такая же или немного выше, чем у выявления антигена [11, 27]. ПЦР и ПЦР-РВ более чувствительны, чем выявление антигена при идентификации кишечных аденовирусов и астровирусов [27, 28]. При выявлении норовирусов и саповирусов предпочтительны пробы ПЦР-РВ.

## Выделение вируса

Изоляция вируса не является рутинным методом идентификации вирусов гастроэнтерита в клинических образцах, хотя в некоторых случаях может с успехом применяться. Невозможно вырастить в культуре ни один из кальцивирусов человека; требуют специальных условий культивирования и другие кишечные вирусы. Ротавирусы группы А можно изолировать из образцов фекалий в различных клеточных линиях (например, MA104, CaCo-2, первичная культура клеток почки обезьяны), но требуется серийный пассаж вирусов [29, 30]. Получение культуры из анального мазка менее вероятно, чем из образца

фекалий. Методы культивирования ротавирусов группы А занимают больше времени, более затратны, но не обладают большей чувствительностью, чем методы выявления антигена [29, 31]. Описана успешная изоляция ротавирусов групп В и С [32].

Кишечные аденовирусы впервые были изолированы на конъюнктивальных клетках Чанга, сейчас многие вирусологи используют клетки Грэм (Graham) 293 для изоляции этих вирусов [33–35]. Цитопатический эффект в культуре от этих вирусов слабый или его вообще нет, их труднее изолировать, чем другие аденовирусы человека [33].

Астровирусы можно культивировать в нескольких разных клеточных линиях, наиболее чувствительными оказались клеточные линии, полученные из тканей кишечника человека (CaCo-2, T84) [36, 37]. Быстро обнаружить положительные культуры можно с помощью посева во флаконы, где вирусный антиген выявляется в клетках культуры с помощью иммунофлуоресценции через 18 ч после инокуляции [36]. Еще один метод идентификации астровирусов — амплификация вируса в клетках культуры с последующим выявлением с помощью ПЦР-РВ [38].

#### Идентификация и системы типирования

Для идентификации и типирования вирусов гастроэнтерита доступно множество методов. Их можно применять непосредственно на клинических образцах или на вирусах, выделенных из клеточной культуры. Возможен анализ как антигенов, так и генотипов. Для вирусов, растущих в культуре, серотипы определяются в перекрестных пробах с типоспецифическими антисыворотками.

#### Ротавирусы

Ротавирусы группы А можно классифицировать на G (гликопротеиновые VP7) и P (чувствительные к протеазе VP4) серотипы. Созданы моноклональные антитела для идентификации обоих серотипов, но моноклональные антитела не всегда доступны для клинических лабораторий [39, 40]. Поэтому были разработаны методы на основе ПЦР, где генотипы можно идентифицировать с помощью типоспецифичных праймеров [41–44]. Иногда с помощью этих методов либо не удавалось определить генотип штамма, либо классификация оказывалась неправильной из-за появления новых штаммов или точечных мутаций в участках, на которые нацелены праймеры [45, 46]. Недавно для классификации штаммов была рекомендована более полная система генотипирования, основанная на анализе последовательности всех 11 геновых сегментов [47]. Этот подход позволяет идентифицировать недавно возникшие штаммы и штаммы с перестановками генов.

#### Кальцивирусы

Невозможность культивировать человеческие кальцивирусы *in vitro* помешала созданию системы классификации на основе серотипи-

рования. Для разделения антигенных типов норовирусов человека была использована твердофазная иммуноэлектронная микроскопия (SPIEM) с применением сыворотки реконвалесцентов; для большинства лабораторий это подход непрактичен ввиду отсутствия стандартных реактивов [48]. Кроме того, биологическая значимость идентифицированных серотипов остается неясной. Норо- и саповирусы классифицируют на геногруппы и генотипы с помощью молекулярных методов. Геногруппа и генотип определяются на основании полной последовательности гена VP1, но для определения генотипа можно использовать более короткие последовательности [49–51]. Хотя для генотипирования норовирусов использовался также ген полимеразы, из-за способности этих вирусов к рекомбинации генотип может оказаться некорректно определенным, если учитывать информацию о последовательности только этого гена [52, 53]. Данные о последовательности как полимеразного, так и капсидного генов позволяют определить генотип и идентифицировать рекомбинантные штаммы. Генотип вируса можно идентифицировать также с помощью геногруппоспецифичной ПЦР-РВ, если невозможно секвенирование ампликонов с помощью методов гибридизации [49, 54, 55]. Пробы для классификации саповирусов разработаны хуже, хотя описаны геногруппоспецифичные ПЦР-РВ [56].

#### Кишечные аденовирусы

Кишечные аденовирусы классифицируют либо по антигенам, либо по генотипу. Аденовирусы человека подразделяют по их способности агглютинировать эритроциты крысы или обезьяны; кишечные аденовирусы (виды F, а также С и Е) частично агглютинируют эритроциты крысы. Видо- и типоспецифичные эпитопы находят также в гексоне и структурных белках нитей, и для классификации можно использовать моноклональные антитела, распознающие эти эпитопы [57, 58]. Генотипическую классификацию кишечных аденовирусов можно проводить также методами дот-блот-гибридизации, рестрикционного анализа геномной ДНК или типоспецифичной ПЦР [27, 58].

#### Астровирусы

Астровирусы классифицируются на серотипы с помощью типоспецифических антисывороток, эти пробы можно ставить в формате ИФА [59]. Для классификации астровирусов приемлемы также молекулярные методы. Генотипы, имеющие прямое соответствие серотипам, можно определять секвенированием ампликонов, которые получают в пробах ПЦР-РВ с праймерами, амплифицирующими все штаммы астровирусов, или путем измерения размера ампликона в пробе ПЦР с типоспецифичными праймерами, дающими ампликоны различного размера в зависимости от генотипа штамма [59–61].

## Серологическое тестирование

Серологию обычно не используют для диагностики индивидуальных случаев инфекционного вирусного гастроэнтерита, хотя для такого тестирования доступно множество методов. Серологические тесты чаще всего проводятся для эпидемиологических и вакцинных исследований. Чаще всего используются методы ИФА, где антигенной мишенью является цельный вирус, его фрагменты или отдельные вирусные белки [49, 62, 63]. Повышение в 4 и более раз уровня антител в сыворотке острого периода и реконвалесцентной сыворотке, взятой через 2–4 недели, указывает на острую инфекцию. Можно модифицировать ИФА для выявления не общих антител, а отдельных их классов (IgM, IgG и IgA) или подклассов. Самый мощный ответ в сыворотке бывает на гомологичный антиген, но во многих пробах можно наблюдать и гетерологичный ответ.

Для ротавирусов и астровирусов разработаны пробы нейтрализации антител [64, 65]. Маловероятно, что эти пробы выявят гетерологичный ответ от штаммов, относящихся к другим серотипам, но их постановка более сложна из-за необходимости работать с живым вирусом.

## Тестирование противовирусной резистентности

В настоящее время нет лицензированных противовирусных средств, доступных для лечения и профилактики инфекционного вирусного гастроэнтерита, описанного в этой главе.

## Оценка результатов лабораторных исследований

Как описано выше, для диагностики инфекционного вирусного гастроэнтерита доступно множество различных методов. Диагностическая лаборатория выбирает метод, исходя из следующих факторов: категория диагностируемого населения (дети, взрослые, лица с нарушениями иммунной системы), вероятности выявления различных вирусных патогенов, доступности необходимого оборудования и навыков персонала для интерпретации результатов, а также затратности. Каждая лаборатория должна определить цели своей программы по вирусам гастроэнтерита и учесть необходимость более специфичной диагностики (например, выявление серотипов и генотипов), а также идентификации вирусов, для которых отсутствуют быстрые антигенные тесты (например, норовирусы и саповирусы), и вирусов, реже вызывающих вирусный гастроэнтерит (например, ротавирусы групп В и С).

Результаты индивидуального диагностического теста следует интерпретировать в контексте общей клинической картины. В подходящей клинической ситуации (например, хроническая диарея у пациента с нарушенным иммунитетом) отрицательный результат на вирусный патоген в одной пробе не подразумевает постановки других проб на тот же патоген, поскольку ни одна из проб не имеет 100% чувстви-

тельности. Положительный результат повлияет на ведение пациента и на мероприятия по контролю инфекции (изолирование). Например, поскольку норовирусы часто оказываются причиной внутрибольничных вспышек гастроэнтерита, выявление норовирусной инфекции позволит усилить наблюдение за заболевшими пациентами и работниками здравоохранения, повысить внимание к уборке и дезинфекции и ограничить посещения, если зафиксирована вспышка [66]. Весьма вероятно, что в ближайшем будущем появятся новые коммерческие наборы (антигенные, молекулярные) для диагностики вирусных гастроэнтеритов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: Use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990; 22(3):259–267.
2. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35(2):275–290.
3. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, et al. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982; 72(12):1329–1332.
4. Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, et al. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998–2000. *Clin Infect Dis* 2006; 42(7):964–969.
5. Coppo P, Scieux C, Ferchal F, et al. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann Hematol* 2000; 79(1):43–45.
6. Gilger MA, Matson DO, Conner ME, et al. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr* 1992; 120(6):912–917.
7. Lee BE, Pang XL, Robinson JL, et al. Chronic norovirus and adenovirus infection in a solid organ transplant recipient. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(4):360–362.
8. Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: Accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003; 77(24):13117–13124.
9. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(5):607–625.
10. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(8):1224–1231.
11. Stockman LJ, Staat MA, Holloway M, et al. Optimum diagnostic assay and clinical specimen for routine rotavirus surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5):1842–1843.
12. Rahman M, Goegebauer T, De Leener K, et al. Chromatography paper strip method for collection, transportation, and storage of rotavirus RNA in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4):1605–1608.
13. Wollants E, Maes P, Thoelen I, et al. Evaluation of a norovirus sampling method using sodium dodecyl sulfate/EDTA-pretreated chromatography paper strips. *J Virol Methods* 2004; 122(1):45–48.

14. Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A, et al. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: Comparison with electron-microscopy, immunoelectro-osmophoresis, and fluorescent antibody techniques. *J Med Virol* 1981; 7(1):29-40.
15. Thornhill TS, Kalica AR, Wyatt RG, et al. Pattern of shedding of the Norwalk particle in stools during experimentally induced gastroenteritis in volunteers as determined by immune electron microscopy. *J Infect Dis* 1975; 132(1):28-34.
16. Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26(9):1630-1634.
17. Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, et al. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(10):741-743.
18. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: A common event? *Lancet* 2003; 362(9394):1445-1449.
19. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 2007; 4(4):e121.
20. Moore PL, Steele AD, Alexander JJ. Relevance of commercial diagnostic tests to detection of enteric adenovirus infections in South Africa. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1661-1663.
21. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, et al. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2587-2595.
22. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(10):1349-1355.
23. Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, et al. Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35(2):511-514.
24. Rasool NB, Monroe SS, Glass RI. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. *J Virol Methods* 2002; 100(1-2):1-16.
25. Ishida S, Yoshizumi S, Ikeda T, et al. Sensitive and rapid detection of norovirus using duplex TaqMan reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2008; 80(5):913-920.
26. Iturriza-Gomara M, Xerry J, Gallimore CI, et al. Evaluation of the Loopamp (loop-mediated isothermal amplification) kit for detecting Norovirus RNA in faecal samples. *J Clin Virol* 2008; 42(4):389-393.
27. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3189-3195.
28. Rohayem J, Berger S, Juretzek T, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 2004; 118(1):49-59.
29. Cumino AC, Giordano MO, Martinez LC, et al. Culture amplification in human colon adenocarcinoma cell line (CaCo-2) combined with an ELISA as a supplementary assay for accurate diagnosis of rotavirus. *J Virol Methods* 1998; 76(1-2):81-85.
30. Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol* 1984; 19(6):748-753.

31. Cicek C, Karatas T, AJITuglu I, et al. Comparison of ELISA with shell vial cell culture method for the detection of human rotavirus in fecal specimens. *New Microbiol* 2007; 30(2):113-118.
32. Sanekata T, Kuwamoto Y, Akamatsu S, et al. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3):759-761.
33. Cromeans TL, Lu X, Erdman DD, et al. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *J Virol Methods* 2008; 151(1):140-145.
34. Kidd AH, Madeley CR. In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *J Clin Pathol* 1981; 34(2):213-216.
35. Wigand R, Baumeister HG, Maass G, et al. Isolation and identification of enteric adenoviruses. *J Med Virol* 1983; 11(3):233-240.
36. Brinker JP, Blacklow NR, Herrmann JE. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol* 2000; 145(9):1847-1856.
37. Willcocks MM, Carter MJ, Laidler FR, et al. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch Virol* 1990; 113(1-2):73-81.
38. Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. *J Clin Virol* 1998; 11(2):103-107.
39. Ramachandran M, Gentsch JR, Parashar UD, et al. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11):3223-3229.
40. Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, et al. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987; 155(6):1159-1166.
41. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7):1820-1822.
42. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6):1365-1373.
43. Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28(2):276-282.
44. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 2008; 42(4):368-373.
45. Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 2004; 31(4):259-265.
46. Rahman M, Sultana R, Podder G, et al. Typing of human rotaviruses: Nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. *Virol J* 2005; 2:24.
47. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 2008; 153(8):1621-1629.
48. Lewis D, Ando T, Humphrey CD, et al. Use of solid-phase immune electron microscopy for classification of Norwalk-like viruses into six antigenic groups from 10 outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Clin Microbiol* 1995; 33(2):501-504.

49. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1):15-37.
50. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Human sapoviruses: Genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 2007; 17(2):133-141.
51. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346(2):312-323.
52. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007; 88 (Pt 12):3347-3359.
53. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of «Norwalk-like viruses» associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186(1):1-7.
54. Vinje J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1423-1433.
55. Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of «Norwalk-like viruses» by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7):2595-2601.
56. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, et al. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 2006; 151(12):2503-2509.
57. Herrmann JE, Perron-Henry DM, Blacklow NR. Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. *J Infect Dis* 1987; 155(6):1167-1171.
58. Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 2395-2436.
59. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(4):797-801.
60. Guix S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus diagnosis and typing: Current and future prospects. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41(2):103-105.
61. Matsui M, Ushijima H, Hachiya M, et al. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol* 1998; 42(8):539-547.
62. Estes MK. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1917-1974.
63. Noel J, Cubitt D. Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981-1993. *Epidemiol Infect* 1994; 113(1):153-159.
64. Gerna G, Battaglia M, Milenesi G, et al. Serotyping of cell culture-adapted subgroup 2 human rotavirus strains by neutralization. *Infect Immun* 1984; 43(2):722-729.
65. Hudson RW, Herrmann JE, Blacklow NR. Plaque quantitation and virus neutralization assays for human astroviruses. *Arch Virol* 1989; 108(1-2):33-38.
66. Greig JD, Lee MB. Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: A review. *Epidemiol Infect* 2009; 137(2):145-155.



67. Pang X, Lee B, Chui L, et al. Evaluation and validation of real-time reverse transcription-PCR assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10):4679-4685.
68. Freeman MM, Kerin T, Hull J, et al. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay. *J Med Virol* 2008; 80(8):1489-1496.
69. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2008; 153(2):12-23.
70. Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction: Correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol* 2004; 73(1):118-122.
71. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1548-1557.
72. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4):1405-1412.
73. Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods* 2007; 146(1-2):36-44.
74. Oka T, Katayama K, Hansman GS, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006; 78(10):1347-1353.
75. Zhang Z, Mitchell DK, Afflerbach C, et al. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. *J Virol Methods* 2006; 134(1-2):190-196.
76. Heim A, Ebnet C, Harste G, et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003; 70(2):228-239.
77. Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, et al. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3):958-967.



# 17 ИНФЕКЦИИ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК

**П. Раванфар**

Parisa Ravanfar, Department of Dermatology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, New Hampshire, U.S.A.

**Н. Мендоза, А. Сатьяпракаш, Р. Крид, С. Тайринг**

Natalia Mendoza, Anita Satyaprakash, Rosella Creed, and Stephen Tyring, Center for Clinical Studies, Houston, Texas, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство вирусов, способных вызывать инфекцию у человека, поражают кожу и слизистые оболочки. В то время как одни вирусные инфекции распознаются клинически по характерным кожным проявлениям, другие вирусы реже ассоциируются с поражением кожи и могут не иметь характерной картины. Клинические проявления могут сильно варьировать в зависимости от исходного состояния здоровья. Поэтому во многих случаях вирусных инфекций с поражением кожи и слизистых оболочек необходима лабораторная диагностика.

## ДНК-ВИРУСЫ

### Вирус папилломы человека

Вирусы папилломы человека (HPV) относятся к семейству Papillomavirus, вызывающих инфекцию у человека. Они содержат кольцевую двуниговую ДНК, кодирующую ранние и поздние белки. Ранние белки (E1–E7) обеспечивают репликацию ДНК и транскрипцию РНК, а поздние (L1–L2) — белки капсида, формирующие вирионы. Наблюдается три основных вида поражений кожи: подошвенные бородавки, вызываемые HPV-1, обыкновенные бородавки (*verruca vulgaris*), вызываемые HPV-2, и плоские бородавки (*verruca planta*), вызываемые HPV-3. Кожные HPV-поражения проявляются в виде разросшихся папул телесного цвета; они чаще всего обнаруживаются на ладонях и пальцах пациентов, хотя могут возникать на любых участках кожи. Чаще всего кожные бородавки возникают у детей, поражая до 20% школьников. Морфология поражений варьирует в зависимости от вируса и локализации на теле. Наиболее распространены обыкновенные бородавки, затем плоские. HPV может также вызывать аногенитальные поражения; отвечающие за эти поражения типы HPV будут рассмотрены в гл. 22.

Обычно HPV-поражения диагностируются клинически; при биопсиях бородавок видны тканевые повреждения в виде акантоза, папил-

ломатоза, гиперкератоза, паракератоза и тромбоза капилляров дермы. Другая типичная находка биопсии — наличие койлоцитов. Это крупные кератиноциты с эксцентричным пикнотичным ядром и околоядерным гало. Часто биопсию делают, чтобы выявить возможную неоплазию или дисплазию. Цитопатический анализ образцов шейки матки проводят на мазках по Папаниколау.

Высокоспецифичный лабораторный метод выявления HPV — иммуногистохимическое окрашивание на антигены капсида HPV. Однако чувствительность этого метода низкая, поскольку диспластические или неопластические поражения могут содержать мало (или вообще не содержать) капсидных белков, что приводит к ложноотрицательному результату.

Другие методы диагностики HPV — высокочувствительные и высокоспецифичные методы выявления ДНК и РНК. Для обнаружения типов HPV высокого риска на тонких водных препаратах шейки матки используется метод гибридизации ДНК [1]. Методика начинается с добавления к препарату щелочного раствора для высвобождения нуклеиновых кислот. Затем вирусная ДНК-мишень сливается с вирусспецифичными РНК-зондами, образуя гибрид ДНК—РНК. Далее гибриды нуклеиновых кислот помещаются на твердофазное покрытие, где они связываются с антителами, специфичными для таких ДНК—РНК-гибридов. Захваченные гибриды выявляются антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой, что приводит к хемилюминесценции, которую можно усилить и выявить. Чувствительность гибридизации ДНК превышает 90% [1].

ПЦР также высокочувствительный и высокоспецифичный метод выявления вируса, но в настоящее время он используется в первую очередь в исследовательских целях.

## ВИРУСЫ ОСПЫ

### Вирус натуральной оспы

Вирус натуральной оспы относится к семейству Poxviridae, подсемейство Chordopoxvirinae, род *Orthopoxvirus*. Вирус содержит линейную двуединицевую ДНК, реплицируется в цитоплазме клетки хозяина.

Последняя природная вспышка оспы была отмечена в Сомали в 1977 г., последний случай инфекции натуральной оспы в США был в 1949 г. Всемирная организация здравоохранения провозгласила глобальное искоренение натуральной оспы в 1980 г., и в настоящее время штаммы вируса натуральной оспы имеют только две лаборатории во всем мире. Существует серьезная опасность, что, если вирус попадет не в те руки, он будет использован как опасное биологическое оружие.

При угрозе возникновения инфекции оспы быстрая и надежная диагностика имеет решающее значение. При подозрении на натуральную оспу необходимо немедленно уведомить органы здравоохранения.

Надо отправить в центр контроля и профилактики заболеваний соскобы кожных поражений, образцы крови и мазки с миндалин. В сомнительных случаях надо исключить инфекции, вызванные VZV, HSV и энтеровирусом [2]. При подозрении на натуральную оспу в целях безопасности диагностику образцов проводит специальная усиленная лаборатория BSL-3 [2].

Существует много лабораторных методов подтверждения диагноза натуральной оспы. Одни из них специфичны для вируса натуральной оспы, другие выявляют ортопоксвирусы в целом. Согласно инструкции центра контроля и профилактики заболеваний, необходимо ПЦР-тестирование на вирус натуральной оспы и прочие ортопоксвирусы. ПЦР позволяет быстро выявить вирус натуральной оспы и имеет высокую чувствительность. ПЦР на все ортопоксвирусы также выявляет вирус натуральной оспы.

Один из рекомендованных специфических методов — изучение образцов на наличие вирионов под электронным микроскопом (ЭМ) при его доступности. Негативное контрастирование выявляет частицы ортопоксвирусов приблизительно в 95% образцов от пациентов с натуральной оспой или оспой обезьян, а также 65% — от пациентов с вакцинной инфекцией [3]. Под ЭМ вирионы натуральной оспы имеют размер приблизительно  $225 \times 300$  нм и вид прямоугольника или кирпича, если смотреть сбоку, и овала, если смотреть с тыла, — это их отличительный признак [3]. Однако такую же морфологию имеют вирусы оспы коров, обезьян и контагиозного моллюска. Хотя с помощью ЭМ можно отличить ортопоксвирусы от других вирусов, метод не так чувствителен, как ПЦР.

Было разработано множество лабораторных тестов на основе ПЦР, в том числе групповая проба на ортопоксвирусы, специфичная для ортопоксвирусов ПЦР-РВ, проба TaqMan®. Эти методы быстрые и высокоспецифичные, однако следует иметь в виду, что распространенность натуральной оспы во всем мире равна нулю, что может приводить к высоким ложноположительным результатам. Поэтому методы на основе ПЦР лучше использовать при высоком клиническом подозрении на натуральную оспу.

Подтвердить эту инфекцию можно изоляцией вируса в живых клеточных культурах с последующим применением ПЦР для выявления специфичных ДНК- или РНК-последовательностей, выделенных из микроорганизма. Инфекцию натуральной оспы можно подтвердить также культивированием вируса на хориоаллантоисной оболочке яйца (ХА) и выявлением характерных оспенных поражений. Этот метод идентификации вируса широко использовался до искоренения натуральной оспы. ХА специфичен, но из-за того, что он не быстрый и низкочувствительный, лучше его использовать для подтверждения.

Благодаря относительно большому размеру вируса натуральной оспы можно непосредственно изучать материал из пузырьков или пустул на наличие вирусных частиц, и этот метод широко использовался. Вирусные агрегации (тельца Гарньери) видны в световом ми-

микроскопе в цитоплазме при окрашивании материала гематоксилин-эозином или серебрении [4].

Вирусный антиген можно выявить иммуногистохимически. Можно провести серологические исследования, но они не дифференцируют разные ортопоксвирусы [5].

### Коровья оспа (вакцина)

Вирус коровьей оспы — крупный оболочный вирус с линейной двуцепочной ДНК, входит в семейство Poxviridae. Он получил известность благодаря использованию для вакцинации против натуральной оспы, позволившей искоренить ее во всем мире. Поскольку вакцина живая, возможны клинические осложнения после вакцинации (особенно у лиц с иммунными заболеваниями), в том числе: поствакцинальный некроз, бактериальная суперинфекция, генерализованная вакцинация, экзема, мультиформная эритема и энцефалит [6]. Хотя рутинная вакцинация против натуральной оспы больше не проводится, за последнее десятилетие было много отчетов об инфекции людей после вакцинации [7]. Это зоонозное заболевание было связано с контактом людей и коров. Инфекция коровьей оспы приводит к поражению кожи в виде пузырьков и изъязвлений.

Идентифицировать вирус можно таким методом, как выявление оспенных поражений на хориоаллантоисной оболочке куриных зародышей. Можно провести электронную микроскопию или атомную силовую микроскопию, ПЦР или секвенирование. Эффективными и чувствительными методами не только выявления, но и идентификации вариантов *вируса коровьей оспы* зарекомендовали себя пробы ПЦР в реальном времени [7].

### Оспа обезьян

Вирус оспы обезьян был впервые изолирован в 1959 г. из образцов сыпи приматов, содержащихся в неволе. Оспа обезьян у человека — зоонозное заболевание, возникающее в результате контакта с больными животными, но может передаваться и среди людей. Клинические проявления очень похожи на натуральную оспу. У большинства людей бывает продромальный период с головной болью, лихорадкой, обильным потоотделением и везикулярно-пустулезной сыпью, появляющейся на туловище и распространяющейся на периферию. От натуральной оспы отличается выраженной лимфаденопатией.

Сообщалось о 400 случаях обезьяньей оспы у людей в Африке между 1970 и 1986 гг.; 95% из них было в Заире. О первых случаях обезьяньей оспы у людей в Западном полушарии сообщалось как о вспышке в июне 2003 г. на Среднем Западе США. Виновниками этой вспышки были инфицированные сурикаты, содержащиеся вместе с гамбийскими крысами [8].

Для диагностики часто требуется лабораторное тестирование на обезьянью оспу. Антиген ортопоксвирусов можно выявить иммуногисто-

химическим окрашиванием поликлональными антителами кролика против вируса коровьей оспы. Также можно выявить цитопатические изменения через 1–4 сут. в вирусной культуре в виде бляшек из вытянутых или округлых клеток с цитоплазматическими мостиками и образованием синцитиев [8]. При ЭМ контрастированных препаратов бывают видны похожие на кирпичи вирионы, что свидетельствует о поксвирусной инфекции. Как уже упоминалось, этот метод не позволяет дифференцировать вакцинию, контагиозный моллюск, натуральную и обезьянью оспу, а также не особенно информативен, когда эти инфекции под вопросом.

Для идентификации вируса обезьяньей оспы разработано множество методов определения нуклеиновых кислот. Быстрый и чувствительный метод — ПЦР в реальном времени. Пробы ПЦР-ВР нацелены на два ортопоксвирусных гена: ДНК-полимеразу (E9L) и белок оболочки (B6R). Ли с соавт. подсчитали предел выявления с использованием ПЦР-ВР E9L с достоверностью 95% — 2,54 фрагмента вирусной ДНК (~12,5 геномов). Проба E9L-NVAR (E9L не-натуральной оспы) может надежно выявить 12,5 геномов очищенной вакцины или ДНК вируса обезьяньей оспы без появления ложноположительных результатов [9].

#### *Контагиозный моллюск*

Вирус контагиозного моллюска (MCV) — ДНК-поксвирус, вызывающий доброкачественную инфекцию эпидермиса и слизистых. Существует 4 подтипа вируса контагиозного моллюска: MCV1, MCV2, MCV3 и MCV4, а внутри каждого подтипа — множество вариантов. Самый частый подтип — MCV1. Контагиозный моллюск — это преимущественно клинический диагноз, который ставится на основании выявления папул телесного цвета размером 3–6 мм с центральным впячиванием. Каждая папула имеет сердцевину из клеточного материала, который можно выдавить при кюретаже. Диагноз подтверждается окрашиванием полученного препарата по Райту, Гимзе, Граму или Папаниколау для визуализации вирусных включений — телец Хендерсона—Патерсона. Эти же диагностические находки можно сделать при окрашивании гематоксилин-эозином биоцсийного материала, фиксированного формалином. Опубликованы отчеты об использовании 10%-го раствора гидроксида калия, который наносят на удаленный моллюск и раздавливают материал сердцевинки между двумя предметными стеклами [10]. Эта методика позволяет визуализировать кластеры телец Хендерсона—Патерсона в образце. Диагноз можно подтвердить и молекулярными методами, в том числе ДНК-гибридизацией и рестрикционным картированием. Еще один лабораторный метод, сочетающий быстроту, высокую чувствительность и специфичность при минимальной инвазивности — ПЦР в реальном времени с последующим секвенированием ДНК.

## Контагиозный пустулезный дерматит

Вирус контагиозного пустулезного дерматита — подвид рода *Parapoxvirus* и причина эктимы у скота. У людей инфекция проникает через ссадины на коже; сначала возникают пятнышки, затем прогрессируют в папулы, большие узлы или папилломатозные поражения. Часто возникают на руках, лице, они скорее единичные, чем множественные [11].

Контагиозный пустулезный дерматит диагностируется клинически, но может потребоваться и лабораторная диагностика. Самый распространенный метод — ЭМ. Вирус контагиозного пустулезного дерматита идентифицируется по характерной овальной форме, присущей всем ортопоксвирусам, а также спиральной укладке филаментов на поверхности [3]. Еще один метод — изоляция вируса, но для нее нужны клетки овцы или быка. Доступны также серологические методы. Показано, что высокочувствительным и специфичным методом диагностики контагиозного пустулезного дерматита является ПЦР [12].

## ВИРУСЫ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА (HSV)

### Вирусы простого герпеса 1 и 2

Вирус простого герпеса (HSV) — двунилевой ДНК-вирус, классифицируемый на 2 типа — HSV-1 и HSV-2. HSV-1 ассоциируется с поражением слизистой губ (лабиальный герпес). HSV-2 обычно вызывает генитальные поражения (генитальный герпес). HSV-2 будет обсуждаться в гл. 22.

HSV-1 — оболочный вирус, реплицирующийся в ядре. Его масса  $96 \cdot 10^6$  кДа, он состоит из трех основных структурных компонентов: нуклеокапсида, содержащего геном, оболочки и тегумента (белково-подобный слой между нуклеокапсидом и оболочкой).

Инфекция простого герпеса протекает в две фазы: в первой происходит первичная инфекция, когда вирус проникает в нервный ганглий, а во второй фазе возникает рецидивирующая инфекция, когда вирус распространяется по нерву.

Лабиальный герпес — распространенная инфекция, до 90% взрослых имеют серологическое подтверждение HSV-1 [13]. В большинстве случаев первичная инфекция протекает бессимптомно, ее можно выявить только по повышению уровня IgG [14].

Первичная инфекция HSV-1 возникает после контакта с инфицированными жидкостями организма, жидкостью из пузырьков или непосредственного контакта с областью поражения. Первичная инфекция часто бессимптомна, но у 10–30% пациентов могут возникать клинические признаки и симптомы [14,15]. Инкубационный период варьирует от 2 до 20 сут. Могут возникать генерализованные симптомы (миалгия, головная боль, лихорадка и недомогание), затем через 1–3 дня появляются группы очагов поражений кожи/слизистых. Поражения HSV-1 характеризуются болезненными группами пузырьков раз-

мером 1–2 мм на слизистой ротовой полости, окруженных эритемой. Они прорываются, сливаясь, и образуют мелкие язвочки неправильной формы, которые покрываются корочкой и разрешаются в течение 2–4 нед., иногда с поствоспалительной гипо- или гиперпигментацией. У большинства людей развивается бессимптомное носительство вируса; он дремлет в нервных ганглиях и периодически реактивируется (часто во время стресса). Рецидивы с клинической симптоматикой возникают у трети инфицированных. HSV-1 может вызывать также герпетический панариций (герпетическая паронихия), глазные инфекции (блефарит, конъюнктивит, эпителиальный кератит, стоматальный кератит, иридоциклит, ретинит), а также похожую на HSV-2 генитальную инфекцию с последующими герпетическими инфекциями у новорожденных при вертикальной передаче. Другие сопутствующие HSV-1 инфекции — мультиформная эритема, болезнь Бехчета, паралич Белла и болезнь Меньера. Более того, HSV — самая распространенная причина вирусного энцефалита у взрослых вне тропических районов [15]. HSV-1 диагностируется на основании анализа и по типичным поражениям в виде лабиального герпеса. Однако для нетипичных поражений требуется лабораторная диагностика.

В качестве лабораторного подтверждения проводится выделение вируса в культуру. Культуру получают из мазка с ложа пузырьков с помощью специальных наборов для культивирования HSV. Культуру для идентификации вируса и его типа можно получить за 24–48 ч [17]. Еще один метод — мазок Цанка, когда ватной палочкой жидкость из пузырька размазывается по стеклу и окрашивается. В положительном мазке видны характерные многоядерные клетки. Однако мазок Цанка не позволяет дифференцировать HSV-1, HSV-2 и VZV.

Можно подтвердить HSV быстрым методом прямой иммунофлуоресценции. Дифференцировать HSV-1 и HSV-2, первичную инфекцию и вторичную позволяет серологическое исследование.

## ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Цитология

Для выявления цитологических изменений в поражениях, подозреваемых на HSV, делают препарат Цанка. Характерные находки — гигантские синцитиальные клетки, внутриядерные включения Кодри типа А и пузырчатая цитоплазма. Хотя этот тест недорогой, в клинических условиях он непопулярен из-за низкой чувствительности (менее 60%) и недостаточной специфичности, поскольку не может идентифицировать тип вируса [15].

### Культуральный метод

Выявление HSV-1 путем изоляции вируса в культуре тканей — популярный метод с высокой специфичностью, позволяющий типировать



вирус. Вирус можно выявить в культуре через 24–48 ч, этот метод относительно недорогой. Однако чувствительность вирусной культуры низкая, особенно при рецидивах, и еще ниже для заживающих поражений [18, 19]. Очень низкую чувствительность имеет вирусная культура из СМЖ.

### Прямая иммунофлуоресценция

Прямая иммунофлуоресценция, или иммунопероксидазная проба, позволяет быстро обнаружить HSV, но имеет низкую чувствительность и высокий уровень ложноположительных результатов. В некоторых тестах не различаются типы вируса [15]. Более того, отрицательный или неопределяемый результат требует подтверждения культуральным методом или ПЦР [15].

### ПЦР



ПЦР для ДНК HSV — самый чувствительный метод диагностики HSV [20] (рис. 17.1). ПЦР-РВ позволяет быстро диагностировать и дифференцировать типы HSV. Способность дифференцировать типы вируса по кривым плавления позволяет минимизировать количество реакций [20]. Метод выбора для диагностики HSV-инфекций ЦНС — амплификация нуклеиновых кислот [21].

### Серологическое тестирование

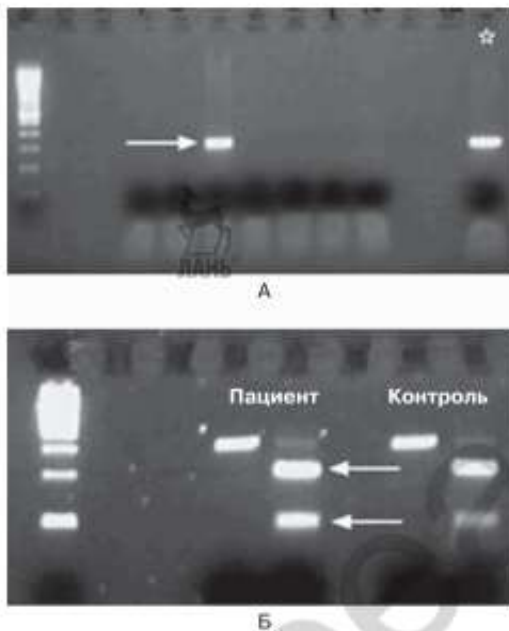
После инфицирования HSV появляются как типоспецифические, так и общие антитела, они существуют пожизненно. Золотой стандарт выявления антител — вестерн-блот, обладающий чувствительностью более 99%, специфичностью для диагностики манифестных инфекций, длящихся свыше 6 мес. [23]. Точные типоспецифические HSV-1 серологические пробы, определяющие гликопротеин G1 HSV-1, появились в продаже в 1999 г. [23], они особенно точны [21, 23]. Одобренные FDA IgG-специфические пробы включают HerpeSelect TM-1® иммуносорбентную пробу ИФА IgG и HerpeSelect TM-1 иммуноблот IgG. Чувствительность этих проб варьирует от 80 до 98%, а специфичность — от 96 до 100% [23]. Ложноположительные результаты более вероятны у пациентов со слабым подозрением на HSV-инфекцию.

Определение IgM не повышает чувствительности серологической диагностики у пациентов с клиническими признаками HSV, а рецидивирующие HSV-инфекции не всегда сопровождаются значимым повышением титров антител, поскольку большинство пациентов уже серологически позитивны на HSV [15].

## Вирус варицелла зостер (HSV-3)

### Варицелла (ветрянка)

Первичная инфекция VZV начинается как ветрянка, проявляясь слабой лихорадкой, недомоганием и диссеминированными зудящими по-



**Рис. 17.1.** Проба полимеразной цепи в образце спинномозговой жидкости на ДНК вируса простого герпеса. Продукты ПЦР фракционируются в 2%-м агарозном геле (Sigma-Aldrich) вместе со стандартом молекулярного веса ДНК (панель **А**). Предполагаемый продукт 290 п. н., амплифицированный из образца цереброспинальной жидкости, показан стрелкой, положительный контроль — звездочкой. Отрицательные контроли расположены по бокам от образца пациента. Расщепление амплифицированного продукта из образца пациента рестрикционной эндонуклеазой ApaI (New England Biolabs) приводит к образованию двух продуктов расщепления, 190 п. н. и 100 п. н. (стрелки на панели **Б**). Расщепление положительного контроля дает идентичную картину. *Источник:* [22].

ражениями на всех стадиях сыпи (пузырьки, пустулы и корочки). Клинический диагноз ветрянки можно подтвердить выделением вируса или мазком Цанка. Быстрая и чувствительная процедура — прямая иммунофлуоресценция жидкости из пузырька [24]. Варицелла рассмотрена в гл. 14.

#### *Герпес зостер (опоясывающий лишай)*



В 1988 г. фон Бокей обнаружил клиническую связь между варицеллой и герпесом зостер: дети, не имевшие иммунитета к ветрянке, заболели ветрянкой после контакта с больным опоясывающим лишаем [25]. В 1954 г. Томас Веллер изолировал VZV из везикулярной жидкости поражений как варицеллы, так и герпеса зостер [25].

VZV — ДНК-вирус семейства герпесвирусов, как и другие альфа-герпесвирусы, персистирует в организме после первичной инфекции и сохраняется в латентном виде в ганглиях чувствительных нервов.

У 20% людей с нормальной иммунной системой и у 50% пациентов с нарушенным иммунитетом VZV реактивируется как герпес зостер, известный под названием «опоясывающий лишай», поражая кожу одного или смежных дерматомов. Лица, дожившие до 85 лет, имеют 50%-й шанс заболеть. Реактивация связана с такими факторами риска, как престарелый возраст, подавление иммунитета, внутриутробное заражение, первичная инфекция варицеллы в возрасте до 18 мес. в анамнезе и положительная семейная история по герпесу зостер. Пациенты с ослабленным иммунитетом имеют риск развития диссеминированного герпеса зостер, вызывающего множественные кожные поражения и затрагивающего ЦНС, легкие и печень. Распространенное осложнение из-за герпеса зостер — постгерпетическая невралгия, характеризующаяся болью в области герпетических поражений дольше 3 мес. с момента их разрешения.

### Вирусологические тесты

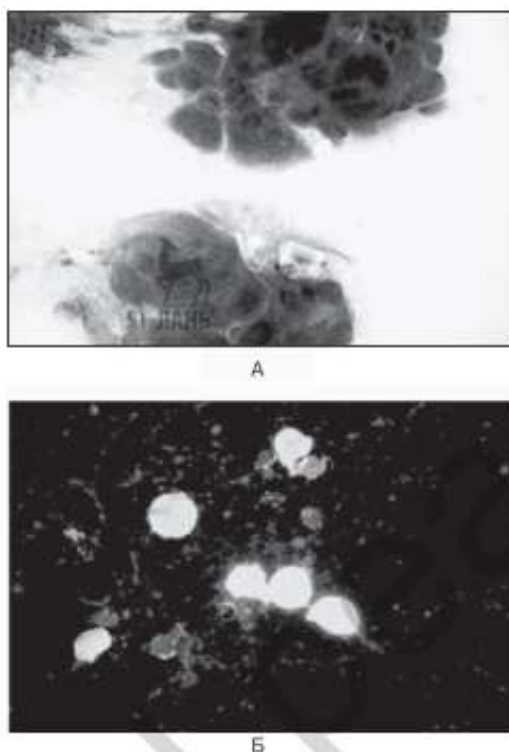
Лабораторная диагностика герпеса зостер требуется нечасто — в атипичных случаях.

VZV можно изолировать в культуре тканей, лабораторные методики позволяют дифференцировать штаммы дикого типа от вакцинных. Хотя вирусная культура — метод специфичный, но не очень чувствительный, поскольку вирус сложно изолировать. Можно приготовить мазок Цанка из пузырьков герпеса зостер для поиска гигантских многоядерных клеток, но, как уже упоминалось, препараты Цанка неспецифичны, и их заменили более точные лабораторные методы.

Метод выбора для быстрой диагностики VZV-инфекции — ПЦР. Самый чувствительный и специфичный метод диагностики VZV — ПЦР в реальном времени, дающая результат за несколько часов [25]. Когда ПЦР недоступна, для лабораторного подтверждения можно использовать прямую иммунофлуоресценцию (ПИФЛА) (рис. 17.2), но ее чувствительность ниже, чем у ПЦР, а результаты зависят от забора и обработки образца. В идеале образец получают вскрытием пузырька с жидкостью и осушением ложа поражения ватной палочкой [25]. Эффективно также брать образцы для ПЦР из поражений, покрывшихся корочкой. ПЦР и ПИФЛА позволяют выявлять вирусные компоненты даже при отрицательном результате посева, поскольку ДНК и вирусные белки сохраняются после утраты вирусом способности развиваться в культуре [25].

### Серологические методы

Для ретроспективной диагностики герпеса зостер можно использовать пробы фиксации комплемента. Другие серологические методы — непрямая иммунофлуоресценция (НИФЛА), выявление мембранного антигена с помощью флуоресцирующих антител, нейтрализация, непрягая геммагглютинация, иммуноадгезивная геммагглютинация, радиоиммуноанализ (РИА), агглютинация латекса и ИФА. ИФА — чув-



**Рис. 17.2.** (см. также цветную вклейку). Диагностика герпеса зостер. На панели **А** показан положительный мазок Цанка (400×). Окрашивание по Райту позволяет выявить гигантские многоядерные клетки. На панели **Б** показана положительная проба прямой иммунофлуоресценции (400×). Клетки окрашены моноклональными антителами к вирусу варицелла зостер, конъюгированными с флуоресцеином; зеленая флуоресценция указывает на наличие антигенов вируса варицелла зостер. *Источник:* [27]

ствительный, специфичный и доступный тест. Агглютинация латекса чувствительнее, чем ИФА, но у него выше уровень ложноположительных результатов [25]. Их частоту можно уменьшить, если ставить реакцию с серией разведений исходного образца [25]. ИФА и агглютинация латекса могут быть полезны при скрининге пациентов на наличие иммунитета к вирусу варицеллы. Т-клеточный иммунитет к VZV значительно точнее определяет иммунный ответ на VZV и имеет прямую корреляцию с клиническим исходом — в противоположность гуморальному иммунитету, у которого такая корреляция отсутствует [28].

### Вирус Эпштейна—Барр (HGV-4)

Вирус Эпштейна—Барр (EBV) вызывает инфекционный мононуклеоз и ассоциирован со многими видами рака, такими как лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, назофарингеальная карцинома,

оральная волосатая лейкоплакия, карцинома желудка, воспалительная псевдоопухоль и посттрансплантационное лимфолифферативное расстройство. В мазках периферической крови пациентов с инфекционным мононуклеозом часто бывает больше 10% атипичных лимфоцитов.

Инфекционный мононуклеоз обычно начинается с признаков и симптомов недомогания, головной боли с последующей лихорадкой, болью в горле и лимфаденопатией. Нередко бывает спленомегалия. Вирусная EBV-экзантема чаще всего проявляется в виде красных папул на фоне розовых пятен, реже как кореподобная, скарлатиноподобная инфекция, эритема, пузырьки и пурпура. В первые недели заболевания возникает вирусная экзантема. У трети пациентов могут быть мелкие петехии на слизистой полости рта на границе мягкого и твердого нёба. Если инфекция лечится неправильно (ампициллином или другими антибиотиками пенициллинового ряда), часто на туловище и конечностях появляется доброкачественное эритематозное кореподобное высыпание, которое начинает шелушиться через неделю.

Лабораторное подтверждение инфекционного мононуклеоза должно начинаться с теста моноспот. Это серологическая проба на наличие гетерофильных антител, разработанная еще в 1932 г. — до того, как EBV был идентифицирован как возбудитель инфекционного мононуклеоза [29]. Оригинальный тест основывался на наблюдении того, что сыворотка или плазма пациентов с инфекционным мононуклеозом агглютинирует эритроциты лошади или овцы. В современном варианте этого теста вместо эритроцитов используются латексные частицы, покрытые бычьими гетерофильными антителами. Тест моноспот позволяет быстро серологически подтверждать клинические случаи с признаками и симптомами инфекционного мононуклеоза.

Если есть подозрение, что тест моноспот ложноотрицательный, что возможно у маленьких детей или пожилых людей, необходимо провести дополнительные лабораторные тесты. Например, тест непрямой иммунофлуоресценции с антителами против комплексов вирусных белков, совместно идентифицируемых как ранний антиген (EA), антиген вирусного капсида (VCA) или EBNA [30], однако этот тест субъективен и трудоемок. Более быстрые и объективные тесты — ИФА, ПЦР и ПЦР-РВ. Тестирование ДНК EBV часто проводится при атипичных проявлениях заболевания или обследовании пациентов с подавленным иммунитетом [29].

### EBER-гибридизация *in situ*

Золотой стандарт выявления и локализации латентного EBV в образцах тканей — гибридизация *in situ* РНК EBV (EBER) [31]. EBER — маленькие некодирующие гены вирусной РНК. EBER-гибридизация используется для подтверждения диагноза посттрансплантационных лимфолифферативных расстройств, обусловленных EBV. При вызванной EBV болезни Ходжкина EBER обычно находят только в клет-

ках Рид—Березовского—Штернберга и различных мононуклеарах; при мононуклеозе выявляются мелкие и крупные EBV-положительные клетки, в том числе иммунобласты, окружающие зоны некроза [29].

Другие лабораторные тесты на EBV включают метод клональной оценки EBV с помощью Саузерн-блота, амплификацию ДНК EBV, определение вирусной нагрузки EBV, иммуногистохимию, посев EBV или зараженных EBV В-лимфоцитов, электронную микроскопию, серологию и ПЦР-РВ.

### Цитомегаловирус (HGV-5)

Цитомегаловирус (CMV) обнаруживается во всех географических областях и среди всех групп населения. Согласно оценкам, 50–80% всех взрослых в США инфицируются CMV к 40-летнему возрасту [32]. Большинство CMV-инфекций бессимптомны и часто не диагностируются, однако CMV-инфекция может давать высокую заболеваемость и смертность у пациентов с нарушенным иммунитетом и беременных женщин с первичной CMV-инфекцией. У пациентов без нарушений иммунной системы может развиваться CMV-мононуклеоз с такими же клиническими проявлениями, как и EBV-мононуклеоз (с лихорадкой, утомляемостью, болью в горле, лимфаденопатией, гепатоспленомегалией и возможной органомегалией). У трети пациентов CMV-мононуклеоз может проявляться генерализованной кореподобной сыпью или (реже) перифолликулярными папулопустулами, везикулобуллезной сыпью или узловыми/язвенными поражениями.

Материнская CMV-инфекция — самая распространенная врожденная вирусная инфекция. Первичная CMV-инфекция у беременных женщин приводит к врожденным поражениям ЦНС, потере слуха, врожденным порокам, тромбоцитопении, гепатоспленомегалии и внутриутробной задержке развития. Типичные кожные поражения у новорожденного получили название «черничный кекс» из-за наличия пурпурных пятнышек и папул, вторично возникающих из-за стойкого кожного гемопоэза. Большинство CMV-инфекций бессимптомны и потому не диагностируются; при подозрении на симптоматическую CMV-инфекцию доступны различные лабораторные тесты.

#### Серологические исследования

Диагностика первичной CMV-инфекции проста, если можно показать сероконверсию. Однако документирование сероконверсии не всегда возможно, учитывая отсутствие программы скрининга на CMV-инфекцию. Для выявления активной или свежей инфекции выявляют IgM к CMV с чувствительностью от 30 до 88% в зависимости от метода [33]. Хотя IgM-антитела к CMV могут указывать на острую или свежую инфекцию, часто бывают ложноположительные результаты. Самый надежный метод идентификации первичной инфекции у беременных женщин — пробы avidности IgG-антител к CMV [33]. Чувствительность проб avidности IgG варьирует от 92,8 до 100%,

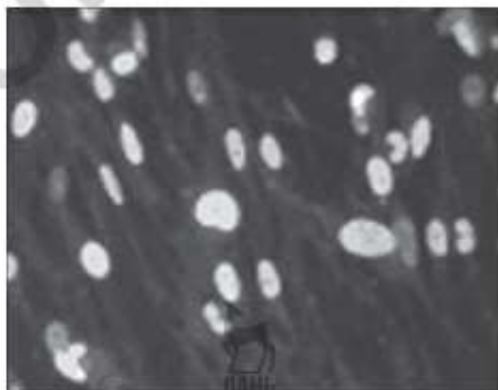
а специфичность от 82,5 до 100% [33]. Авидность — показатель прочности связывания поливалентного антитела с поливалентным антигеном. Поэтому в ходе первичного иммунного ответа авидность антител ниже, чем при зрелом иммунном ответе в повторной инфекции. Золотой стандарт подтверждения наличия IgM-антител в сыворотке — иммуноблот, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью.

### Вирусологические исследования

При первичной CMV-инфекции вирус можно обнаружить в таких жидкостях организма, как слюна, моча и вагинальный секрет, однако вирус может выделяться также после реинфекции или реактивации вируса, следовательно, выявление вируса в секретах — ненадежный способ диагностики первичной инфекции [34]. Разработаны различные лабораторные методы выявления и количественной оценки CMV в крови.

Методы определения и измерения вирусемии традиционно занимали много времени, поскольку зависели от появления цитопатического эффекта, определения 50%-й дозы заражения клеточной культуры и бляшкообразования [34]. На смену пришло культивирование в однослойных культурах, позволяющее получить результат через 24 ч. Эта проба основана на постулате, что каждая клетка в монослое фибробластов человека, положительная на промежуточно-ранний антиген (p72), была заражена одним лейкоцитом, несущим CMV [35]. Монослой окрашивают либо иммунофлуоресцентным, либо иммунопероксидазным методом и моноклональными антителами, реагирующими на главный промежуточно-ранний белок CMV [35] (рис. 17.3). Затем подсчитывают количество положительных ядер.

Выявление антигемии позволяет количественно определить лейкоциты периферической крови, положительные на pp65-фосфопротеин



**Рис. 17.3.** (см. также на цветной вклейке). Однослойная микрокультура для цитомегаловируса (иммунофлуоресцентный краситель, 400 $\times$ ). Источник: [36]

матрикса CMV. Это очень чувствительный и быстрый метод (результаты можно получить через несколько часов), однако его ограничение — субъективность оценки стекол.

Выявить и определить количество ДНК CMV в крови можно в пробах ПЦР или методом гибридизации. ПЦР выявляет вирусный генетический материал высокоспецифично и чувствительно. Обнаружение РНК CMV в крови указывает на репликацию РНК *in vivo*, а на поздних стадиях — диссеминацию вирусной репликации [37, 38].

Распознавание циркулирующих цитомегалических эндотелиальных клеток (ЦЭК) в крови новорожденных и плодов с симптоматической врожденной CMV-инфекцией позволяет диагностировать CMV, но определение эндотелиемии не обладает высокой чувствительностью при диагностике CMV-инфекции.

Диагноз врожденной цитомегалии подтверждается, если вирус обнаружен в моче, слюне или крови новорожденного в первые три недели после рождения. Диагноз опирается на обнаружение вируса, а не антител.

### Вирус герпеса человека-6 (HGV-6)

HGV-6 впервые был изолирован в 1986 г.; в 1988 г. Yamanishi и соавт. обнаружили, что он связан с младенческой розеолой (внезапная экзантема). Свыше 90% людей с раннего детства заражены HGV-6, и вирус может реактивироваться независимо от иммунного статуса. Первичная инфекция HGV-6 часто возникает до 2-летнего возраста и бывает ассоциирована с неясным фебрилитетом. У части пациентов может быть классическая сыпь розеолы. Характерная сыпь выявляется либо во время болезни, либо после нормализации температуры приблизительно у 20% пациентов с первичной HGV-6-инфекцией [39]. HGV-6 может вызвать тяжелое заболевание у пациентов с нарушенным иммунитетом.

Кожные болезни, сопутствующие HGV-6, включают внезапную экзантему, синдром «перчаток и носков», реакции гиперчувствительности к лекарствам, синдром Джанотти—Крости, розовый лишай и злокачественные лимфопролиферативные заболевания.

Лабораторную диагностику обычно не проводят, поскольку вирус распространен повсеместно и часто не дает симптомов.

Для подтверждения диагноза можно использовать ИФА, однако это не позволит дифференцировать варианты А и В и может давать ложноположительные результаты из-за перекрестных реакций с другими герпесвирусами.

Определение антител к HGV-6 еще один доступный метод. Возрастание титра IgM в 20 и более раз указывает на свежую инфекцию или реактивацию вируса. Титр IgG 10 и выше указывает на предшествующую инфекцию HGV-6. Из-за широкого распространения HGV-6 корреляция между перенесенным заболеванием и однократным определением титра антител неинформативна. Четырехкратное повышение



или сероконверсия титров IgG или IgM отражает острую инфекцию или реактивацию.

### **Вирус герпеса человека-7 (HGV-7)**

Герпесвирус-7 впервые был изолирован в 1990 г., он очень похож на HGV-6. Как и HGV-6, он распространен во всем мире и свыше 90% людей перенесли первичную инфекцию в возрасте до 10 лет. Инфекция передается со слюной. О патогенности HGV-7 известно еще меньше, чем о HGV-6. HGV-7 назван возбудителем розового лишая, предлагалось считать его еще одним возбудителем внезапной экзантемы. Кроме того, HGV-7-инфекция связана с синдромом хронической усталости, посттрансплантационными кожными высыпаниями, реактивацией HGV-6-инфекции и младенческим фебрилитетом [41].

Диагностика HGV-7 аналогична диагностике HGV-6 (лабораторная клиническая диагностика проводится редко). В настоящее время нет стандартизированных проб для HGV-7. Доступны специфические антитела к HGV-7, их можно использовать для дифференциации HGV-7 и HGV-6. Как и HGV-6, вирус культивируется и можно показать повышение титров IgG.

### **Вирус герпеса человека-8 (HGV-8)**

HGV-8 относится к подсемейству *Gammaherpesvirinae*, которое далее подразделяется на гамма-1/лимфокриптовирусы и гамма-2/радиновирусы. HGV-8 — единственный вирус в роду радиновирус [42].

HGV-8 впервые был идентифицирован в поражениях саркомы Капоши; из-за высокой распространенности этого заболевания среди больных СПИДом считалось, что оно передается половым путем. В отличие от многих других герпесвирусов, HGV-8 не является убиквитным, наличие специфических антител варьирует в зависимости от региона и ВИЧ-статуса. Например, в северных странах антитела обнаруживают у 1–5% здоровых лиц, а в некоторых регионах Африки — до 50% [43, 44].

HGV-8 выделяется в первую очередь со слюной, но может передаваться и с другими жидкостями организма. HGV-8 ассоциирован с саркомой Капоши (СК), сосудистыми опухолями, которые чаще всего возникают у гомо- и бисексуальных мужчин со СПИДом [45]. Реже классический вариант СК наблюдается у пожилых мужчин Средиземноморья и Средней Европы, а эндемический (африканский) вариант возникает у детей и молодых взрослых в некоторых частях Африки. Поражения СК проявляются как темно-красные или пурпурные пятна, превращающиеся в папулы, бляшки и опухоли; они могут возникнуть в любом органе. СК — самый распространенный в развитых странах тип опухолей, связанных со СПИДом. С HGV-8 ассоциировано еще одно лимфопролиферативное заболевание — болезнь Кастанельмана; оно обусловлено гиперпролиферацией В-клеток и характеризуется опухолями во всех лимфоузлах. С инфекцией HGV-8 ассоциирована

также первичная выпотная лимфома — редкая В-лимфома, выявляемая почти исключительно у ВИЧ-инфицированных.

Высокочувствительный метод выявления ДНК HGV-8 в областях поражения, особенно при СК — это ПЦР. Однако из-за высокой чувствительности ПЦР есть риск загрязнения и ложноположительных результатов [46]. ПЦР — очень надежный и быстрый лабораторный метод выявления инфекции HGV-8, а ПЦР в реальном времени позволяет быстро выявлять и количественно определять вирус.

Для подтверждения СК может потребоваться биопсия кожи (рис. 17.4). Ценный метод выявления HGV-8 в тканях — иммуногистохимия с антителами против латентного ядерного антигена-1 (LANA1) [47, 48]. LANA1 — латентный белок, экспрессирующийся в ядре клеток, зараженных HGV-8 [47, 48]. Антитела распознают повторяющуюся последовательность белка, что позволяет его выявлять [49]. Использование иммуногистохимии — идеальный способ подтверждения диагноза СК, мультицентрической болезни Кастаньяна и лимфом, связанных с HGV-8 [45].

Для обнаружения антител против HGV-8 применяют серологические пробы первого поколения [51]. Разработан также иммуноблот второго поколения; сообщалось о его высокой чувствительности и специфичности при выявлении инфекции HGV-8 [52].

## Парвовирус В-19

Парвовирус В-19 человека был обнаружен в 1975 г., он входит в семейство Parvoviridae, род *Parvovirus*. Он не имеет оболочки и состоит из линейной одноцепочной ДНК, кодирующей три белка: два структурных, или капсидных (VP1 и VP2), и один неструктурный (NS1).

Хотя инфекции, вызванные парвовирусом В19, возникают во всех возрастных группах и во все сезоны, чаще всего они встречаются у детей школьного возраста в конце зимы — начале весны [53]. С возрастом развивается иммунитет к В19: до 75% взрослых старше 40 лет имеют IgG-антитела к В19 [54].

Клинические проявления инфекции В19 разнообразны, возможны дерматологические, ревматологические и гематологические. С вирусом В19 ассоциирована инфекционная эритема, или пятая болезнь; она характеризуется трехстадийной сыпью, возникающей после контагиозного периода.

Для первой стадии характерна эритематозная экзантема на обеих щеках. На второй стадии эритематозно-папулезная сыпь сетчатого характера на конечностях, туловище и ягодицах. На последней стадии сыпь возвращается в связи с инсоляцией, жарой или стрессом. Другое дерматологическое проявление инфекции В19 — синдром папулезно-геморрагической сыпи в виде перчаток и носков. В19 также связан с артропатией. У пациентов с гематологическими нарушениями возникает транзиторный апластический криз.

Диагностика В19 часто базируется на клинических признаках, однако для нетипичных случаев и подтверждения может потребоваться лабораторная диагностика. Доступны иммуноферментные пробы на IgG и IgM В19; у них высокая чувствительность (97–100%) и высокая специфичность (7–99%) [55].



А



Б

**Рис. 17.4.** (см. также цветную вклейку). Саркома Капоши. На панели **А** показаны поражения классической саркомы Капоши. На панели **Б** показаны характерные гистологические признаки (гематоксилин-эозин, 20х). Проплиферация веретеновидных опухолевых клеток привела к образованию аномальных сосудистых щелей (в некоторых есть эритроциты). В этом поражении нет митотической активности, степень плеоморфизма опухолевых клеток слабая. *Источник:* [50]

Поскольку невозможно рутинно культивировать парвовирус В19, лабораторная диагностика этой инфекции проводится либо прямым выявлением антигена В19 в образцах, либо выявлением специфических антител в сыворотке.

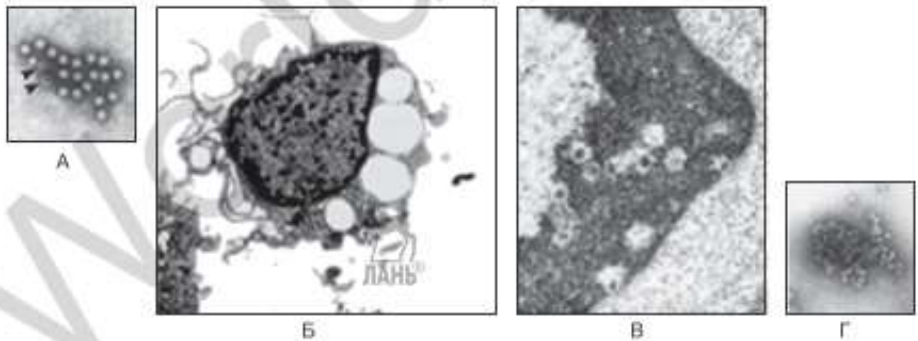
Антиген В19 можно выявлять методом встречного иммуноэлектрофореза (ИЭМ), иммунной электронной микроскопии (ВИЭФ), радиоиммуноанализа (РИА), иммуноферментного анализа (ИФА) и рецепторной геммагглютинации.

Заявленная чувствительность ИФА, выявляющей специфические IgM-антитела (Bitrim Parvovirus B19) — 89,1%, специфичность — 99,4% [56]. ИЭМ используется в первую очередь для подтверждения положительных результатов других проб на В19 [57].

Серологическую диагностику инфекции парвовируса В19 можно проводить, выявляя IgG-антитела с помощью ИФА, РИА или НИФЛА с подтверждением вестерн-блотом. IgM-антитела как индикатор свежей инфекции можно выявлять также с помощью ИФА, РИА или НИФЛА с подтверждением вестерн-блотом.

Вирусологическую лабораторную диагностику В19 можно проводить путем выявления вирусного антигена В19 с помощью ИФА, ВИЭФ или НИФЛА. ДНК В19 можно выявлять методом гибридизации. Кроме того, можно использовать ПЦР для амплификации и выявления ДНК В19.

Инфекцию В19 также можно определить методом ЭМ — визуализируя и идентифицируя вирусные частицы В19. На микрофотографиях зараженных В19 клеток видна вакуоляризация цитоплазмы, псевдоподии, измененные митохондрии и вирусные частицы В19 в сгустках



**Рис. 17.5.** Электронные микрофотографии нативного парвовируса В19 в сыворотке и клетках и рекомбинантные капсиды. На панели **А** показаны симметричные икосаздрические частицы диаметром около 25 нм и пустые капсиды (острия стрелок) в сыворотке инфицированного. На панели **Б** показаны человеческие эритроидные клетки-предшественники, зараженные вирусом *in vitro*; имеются вакуоли и цитоплазматические псевдоподии (10 000×). На панели **В** (большее увеличение панели **Б**) видно, что пристеночный хроматин содержит собранные капсиды (100 000×). На панели **Г** показаны пустые рекомбинантные капсиды парвовируса, полученные в системе *baculovirus* (154 000×). Источник: [60]

пристеночного ядерного хроматина (рис. 17.5) [58, 59]. Внутриядерные включения и гигантские пронормобласты, возникающие в результате инфекции В19, видны и в световой микроскоп. Повысить чувствительность диагностики можно с помощью иммуногистохимии *in situ* для выявления антигенов В19 и гибридизации *in situ* для выявления ДНК В19 [53].

## РНК-ВИРУСЫ



### Энтеровирусы

Энтеровирусы относятся к семейству Picornaviridae, род *Enterovirus* и являются наиболее распространенной причиной вирусных инфекций у людей. Энтеровирусы дают широкий спектр клинических проявлений. Самые частые проявления на коже и слизистых — болезнь рук-ног-рта (HFMD), герпангина, пятнистая и папулезная сыпь, розеолоподобные поражения, бостонская экзантема, сыпь в виде крапивницы и рассеяного псевдоангиоматоза.

Проявления при болезни HFMD включают афтоподобные эрозии и красные пятна на коже, превращающиеся в белые овальные пузырьки без окружающей эритемы. Пузырьки имеют характерную форму ромба и появляются преимущественно на кистях, стопах, тыльных поверхностях пальцев и изредка на лице, ягодицах и голених [61]. Пузырьки вскрываются и превращаются в мелкие болезненные язвы, заживающие без рубцов приблизительно за неделю.

С HFMD чаще всего ассоциирован коксакивирус А-16, однако описаны вспышки, обусловленные энтеровирусом-71 (EV-71). Коксакивирус группы А (CVA) серотипов CVA-4, -5, -6, -7, -9, -10 и коксакивирус группы В (CVB) типов CVB-5 и -13 также могут быть ассоциированы с HFMD.

Герпангина — острая инфекция у детей в возрасте 1–7 лет, сопровождающаяся высокой температурой, болью в горле, дисфагией и общим плохим самочувствием [62] помимо поражения слизистых. Последние характеризуются мелкими серовато-белыми пузырьками с красным галом на заднем небе, языке и миндалинах. Пузырьки изъязвляются и спонтанно заживают приблизительно за семь дней. Возбудителями герпангины обычно бывают коксакивирусы А (А2, А4, А5, А5, А6, А10) и коксакивирусы В, эховирусы и другие энтеровирусы.

Диагностика часто клиническая, но разработано множество лабораторных методов. Сначала золотым стандартом выявления энтеровирусов было выделение вирусов с идентификацией в реакции нейтрализации с типоспецифичными антисыворотками. Для энтеровирусов также имеются иммунофлуоресцентные пробы с моноклональными антителами. Вирусную культуру вытеснила панэнтеровирусная ПЦР, но она не позволяет дифференцировать вирусы. Современным методом выбора для типирования энтеровирусов является секвенирование

гена VP1. Ген VP1 кодирует типоспецифичные эпитопы и поэтому коррелирует с серотипом.

Другие энтеровирусы подробнее обсуждаются в гл. 16.

## РЕЗЮМЕ

Многие вирусные инфекции кожи и слизистых диагностируются клинически, однако для некоторых из них может понадобиться лабораторное подтверждение. Самые используемые лабораторные методы — выделение вирусов, прямая иммунофлуоресценция и серология. Набирает популярность ПЦР благодаря высоким чувствительности и специфичности, но для многих вирусов пока нет праймеров в продаже. Выбор метода зависит от клинических данных, вероятности вирусной инфекции, чувствительности и специфичности теста.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vernick JP, Steigman CK. The HPV DNA virus hybrid capture assay: what is it — and where do we go from here? *MLO Med Lab Obs* 2003; 35(3):8–10, 3; quiz 4–5.
2. Acute, Generalized Vesicular or Pustular Rash Illness Testing Protocol in the United States. <https://www.cdc.gov/smallpox/pdfs/rash-illness-protocol.pdf>.
3. Negative Staining Electron Microscopy Protocol for Rash Illness. <https://www.cdc.gov/smallpox/lab-personnel/specimen-collection/negative-stain.html>.
4. IDSA. Smallpox: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. [www.cidrap.umn.edu/idsa/bt/smallpox/biofacts/smlpxsummary.html](http://www.cidrap.umn.edu/idsa/bt/smallpox/biofacts/smlpxsummary.html). IDSA, 2008. Accessed August 26, 2008.
5. Breman JG, Henderson DA. Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med* 2002; 346(17): 1300–1308.
6. Guharoy R, Panzik R, Noviasky JA, et al. Smallpox: clinical features, prevention, and management. *Ann Pharmacother* 2004; 38(3):440–447.
7. Trindade GD, Li Y, Olson VA, et al. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J Virol Methods* 2008; 152(1–2):63–71.
8. Reed KD, Melski JW, Graham MB, et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med* 2004; 350(4):342–350.
9. Li Y, Olson VA, Laue T, et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J Clin Virol* 2006; 36(3):194–203.
10. Bauer JH, Miller OF, Peckham SJ. Medical Pearl: confirming the diagnosis of molluscum contagiosum using 10% potassium hydroxide. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56 (suppl 5):S104 — S105.
11. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, et al. Poxviridae. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ, eds. *Veterinary virology*. San Diego, CA: Academy Press, 1999:277–291.
12. Torfason EG, Gunadottir S. Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections. *J Clin Virol* 2002; 24(1–2):79–84.

13. Bader C, Crumpacker CS, Schnipper LE, et al. The natural history of recurrent facial-oral infection with herpes simplex virus. *J Infect Dis* 1978; 138(6):897-905.
14. Habif T CJ, Chapman MS, Dinulos J, et al. Genital Herpes Simplex. In: Habif TP, ed. *Skin Disease Diagnosis and Treatment*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby, 2005:176-179.
15. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(2):107-121.
16. Chauvin PJ, Ajar AH. Acute herpetic gingivostomatitis in adults: a review of 13 cases, including diagnosis and management. *J Can Dent Assoc* 2002; 68(4):247-251.
17. Habif TP, Campbell JL, Chapman MS, et al. Herpes Zoster (Shingles). In: Habif TP, ed. *Skin Disease Diagnosis and Treatment*. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby, 2005:210-215.
18. Scoular A, Gillespie G, Carman WF. Polymerase chain reaction for diagnosis of genital herpes in a genitourinary medicine clinic. *Sex Transm Infect* 2002; 78(1):21-25.
19. Wald A, Huang ML, Carrell D, et al. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis* 2003; 188(9):1345-1351.
20. Whiley DM, Syrmis MW, Mackay IM, et al. Preliminary comparison of three LightCycler PCR assays for the detection of herpes simplex virus in swab specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(12):764-767.
21. Schloss L, van Loon AM, Cinque P, et al. An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J Clin Virol* 2003; 28(2):175-185.
22. Harris LN, et al. Massachusetts Medical Society. «Case 26-2003 — A 50 Year-Old Colombian Man with Fever and Seizures». *N Eng J Med* 2003; 349:789-796.
23. Song B, Dwyer DE, Mindel A. HSV type specific serology in sexual health clinics: use, benefits, and who gets tested. *Sex Transm Infect* 2004; 80(2):113-117.
24. Habif TP, Campbell JL, Chapman MS, et al. In: Habif TP, ed. *Skin Disease Diagnosis and Treatment*. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby, 2005:204-209.
25. Atkinson WHJ, McIntyre L, Wolfe S, eds. Center of Disease Control. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book*. In: 10th ed. Varicella. Atlanta: Public Health Foundation, 2008.
26. Hicks LD, Cook-Norris RH, Mendoza N, et al. Family history as a risk factor for herpes zoster: a case-control study. *Arch Dermatol* 2008; 144(5):603-608.
27. Gnann JW, Whitley RJ; Massachusetts Medical Society. «Herpes Zoster.» *N Eng J Med* 2002; 347: 340-346.
28. Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, et al. Varicella-zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine. *J Infect Dis* 2008; 197(6):825-835.
29. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 2008; 10(4):279-292.
30. Zeytinoglu A, Altuglu I, Karatas E, et al. Comparison of immunofluorescence assay and multiplexed microparticle-based immunoassay for detecting

- Epstein-Barr virus viral capsid antigen antibodies. *J Virol Methods* 2008; 148(1-2):300-302.
31. Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, et al. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol* 1996; 27(1):20-27.
  32. <https://www.cdc.gov/cmvc/clinical/index.html>
  33. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, et al. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008; 41(3):192-197.
  34. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4):680-715.
  35. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, et al. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12):2681-2688.
  36. Modlin JF, et al. Massachusetts Medical Society. Case 25-2003 — A newborn boy with petechiae and thrombocytopenia. *N Eng J Med* 2003; 349:691-700.
  37. Gozlan J, Laporte JP, Lesage S, et al. Monitoring of cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription-PCR and comparison with PCR and blood and urine cultures. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9):2085-2088.
  38. Lam KM, Oldenburg N, Khan MA, et al. Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17(6):555-565.
  39. Pruksananonda P, Hall CB, Insel RA, et al. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med* 1992; 326(22):1445-1450.
  40. Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 2000; 10(3):155-173.
  41. De Araujo T, Berman B, Weinstein A. Human herpesviruses 6 and 7. *Dermatol Clin* 2002; 20(2): 301-306.
  42. Moore PS, Chang Y. Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356(1408):499-516.
  43. Gao SJ, Kingsley L, Li M, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1996; 2(8):925-928.
  44. Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 2006; 208(2):187-198.
  45. Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, et al. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 1990; 335(8682):123-128.
  46. Laurent C, Meggetto F, Brousset P. Human herpesvirus 8 infections in patients with immunodeficiencies. *Hum Pathol* 2008; 39(7):983-993.
  47. Kellam P, Boshoff C, Whitby D, et al. Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol* 1997; 1(1):19-29.
  48. Dupin N, Fisher C, Kellam P, et al. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(8):4546-4551.
  49. Kellam P, Bourbouliou D, Dupin N, et al. Characterization of monoclonal antibodies raised against the latent nuclear antigen of human herpesvirus 8. *J Virol* 1999; 73(6):5149-5155.



50. Antman K, Chang Y; Massachusetts Medical Society. Medical progress: Kaposi's sarcoma. *N Eng J Med* 2000; 342:1027-1038.
51. Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* 1996; 70(1):549-558.
52. Gao SJ, Moore PS. Molecular approaches to the identification of unculturable infectious agents. *Emerg Infect Dis* 1996; 2(3):159-167.
53. Centers for Disease Control and Prevention. Current Trends Risks Associated with Human Parvovirus B19 Infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989; 38(6):81-88, 93-97. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001348.htm>.
54. Kelly HA, Siebert D, Hammond R, et al. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. *Epidemiol Infect* 2000; 124(3):449-457.
55. Sloots T, Devine PL. Evaluation of four commercial enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15(9):758-761.
56. Ramirez MM, Mastrobattista JM. Diagnosis and management of human parvovirus B19 infection. *Clin Perinatol* 2005; 32(3):697-704.
57. Zerbini M, Gallinella G, Cricca M, et al. Diagnostic procedures in B19 infection. *Pathol Biol (Paris)* 2002; 50(5):332-338.
58. Field AM, Cohen BJ, Brown KE, et al. Detection of B19 parvovirus in human fetal tissues by electron microscopy. *J Med Virol* 1991; 35(2):85-95.
59. Young N, Harrison M, Moore J, et al. Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *J Clin Invest* 1984; 74(6):2024-2032.
60. Young NS, Brown KE; Massachusetts Medical Society. Parvovirus B19. *N Eng J Med* 2004; 350:586-597.
61. Habif TP, Campbell JI, Chapman S, et al. Food and mouth disease. In: Habif TP, ed. *Skin Diseases Diagnosis and Treatment*. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby, 2005:216-219.
62. Nakayama T, Urano T, Osano M, et al. Outbreak of herpangina associated with Coxsackievirus B3 infection. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8(8):495-498

# 18 ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ СЕРДЦА И СОСУДОВ

**Х.-П. Шультайсс, У. Кюль**

Heinz-Peter Schultheiss and Uwe Kühl, Medizinische Klinik II,  
Cardiology und Pneumology, Charite — Universitätsmedizin  
Berlin, Berlin, Germany



## ВВЕДЕНИЕ

Считается, что воспалительные процессы, вызванные вирусами и бактериями, являются одним из главных механизмов развития миокардита и воспалительной кардиомиопатии (дилатационная кардиомиопатия, воспалительная — ДКМИ). Хотя теоретически любой бактериальный возбудитель может вызвать воспаление и дисфункцию миокарда, в западных странах вирусы считаются самой распространенной причиной приобретенных кардиомиопатий в наше время. Причастность коксакивируса к миокардиту у детей доказана благодаря прямой изоляции вируса, а вывод о его причастности к заболеваниям сердца у взрослых основывается на серологии и прямом выявлении энтеровирусной РНК в сердечной мышце методами гибридизации нуклеиновых кислот и ПЦР-РВ. Благодаря последующим молекулярно-биологическим исследованиям было установлено наличие различных генотипов и подтипов вирусов в миокарде пациентов с острыми и хроническими заболеваниями сердца. Улучшение функции желудочков после исчезновения вирусов, полное или частичное восстановление функции желудочков после противовирусной терапии, нарастание дисфункции миокарда и неблагоприятный прогноз у пациентов с персистирующими вирусными инфекциями позволили предположить, что дилатационная кардиомиопатия (ДКМ) может являться отдаленным последствием вирусного миокардита.

До сих пор не проведены всесторонние исследования персистенции вирусов и долгосрочного прогноза у пациентов с хроническими вирусными заболеваниями сердца, не получено доказательств того, что единственная причина прогрессирования миокардита в ДКМ — персистенция вируса, хотя получены документальные подтверждения, что у 12% пациентов с клинической картиной миокардита и 40% пациентов с подтвержденным при биопсии миокардитом происходит трансформация в ДКМ, а при остром миокардите уровень смертности за 5–6 лет составил 20–56%. В ранних работах не проводилось исследований миокарда на наличие вирусов, не приведено доказательств персистенции вирусов как причины исхода [1–5].

Частое несовпадение результатов исследований можно отнести на счет динамики вирусных эпидемий во времени, региональных различий в этиологии вирусов, различий в диагностических тестах по времени проведения биопсии и участия разных подтипов виру-

са, а также клинических различий между изученными выборками пациентов. Поскольку точность диагностики имеет принципиальное эпидемиологическое и клиническое значение, данные по вирусным заболеваниям сердца рассмотрены в данной главе с точки зрения современных концепций патогенеза. Также обсуждаются возможности и ограничения существующих диагностических инструментов применительно к инфекциям сердечно-сосудистой системы.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА

Согласно оценкам, частота миокардита среди вирусных инфекций составляет от 3 до 6% [6]. На самом деле, распространенность вирусного миокардита или кардиомиопатии оценена очень неточно, поскольку вирусные заболевания сердца могут протекать латентно, их трудно диагностировать, и они варьируют в зависимости от циркулирующих в популяции вирусов [7–15]. Когда стали использоваться более чувствительные и быстрые молекулярно-биологические методики исследования биопсий эндомиокарда, частота выявления вирусных геномов значительно возросла, обнаружены географические и временные особенности. Помимо энтеровирусов, анализ образцов биопсии с помощью молекулярно-биологических методик позволил выявить (с географическими различиями и различной частотой) отчетливые генотипы эритровирусов (парвовирус В19), герпесвируса человека 6 (HGV-6), аденовирусов, а также вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса 2-го типа и вирус гепатита С (HCV) [16–39]. С учетом значительного количества случаев подозрения вирусной инфекции (недавно возникшая аритмия, нарушение сократительной способности миокарда, кардиодилатация, увеличение сердца) цифры будут еще выше [40, 41].

В подробном исследовании Bowels и соавт. была проведена ПЦР-амплификация вируса и положительный результат получен в 40% образцов от 773 преимущественно молодых американцев (до 18 лет) с миокардитом ( $n = 624$ ) или ДКМ ( $n = 149$ ), преобладали адено- и энтеровирусы. Только в 1% протестированных образцов был выявлен парвовирус [20]. В различных немецких исследованиях вирусные геномы зафиксированы в 30–73% образцов биопсии эндомиокарда у пациентов с дисфункцией левого желудочка, а парвовирусные геномы выявляли с той же частотой, что и энтеровирусные [25, 36, 42]. Исследования в Западной Европе и США показали снижение распространенности адено- и энтеровирусов, а ареновирусы выявлялись чаще [24, 25, 37]. Кардиомиопатия, ассоциированная с HCV, выявлялась в первую очередь в азиатских странах, особенно в Японии [39, 43]. Часто встречающаяся протозойная кардиомиопатия Шагаса ограничена Центральной и Южной Америкой.

Хотя вирусные инфекции могут вызвать тяжелые заболевания человека, большинство из них протекают латентно и потому часто не признаются причиной последующих заболеваний сердца [44].

В прошлом вирусный миокардит и хронические вирусные заболевания сердца были скорее клиническим диагнозом или исключением, чем объективно подтвержденным диагнозом. Раннему выявлению таких пациентов мешало несколько факторов: изменение вирусных эпидемий во времени и различия в географической распространенности отдельных вирусов, наличие вариантов вирусов, способных и неспособных вызывать миокардит, и огромная вариабельность клинических симптомов вирусных заболеваний сердца (от бессимптомного течения до выраженной сердечной недостаточности) и отсутствие общего алгоритма проведения вирусологического анализа. В большинстве случаев из-за этих факторов не были получены достоверные эпидемиологические данные.

## ПАТОГЕНЕЗ

При большинстве инфекций вирусы поражают лимфоидные органы и могут размножаться в иммунных клетках (лимфоциты, макрофаги). Затем они достигают органа-мишени инфекции гематогенным или лимфогенным путем. Ранняя фаза миокардита инициируется заражением кардиомиоцитов, фибробластов или эндотелиальных клеток (ЭК) путем рецептор-опосредованного эндоцитоза [23, 45–47].

Энтеровирусы, традиционно считающиеся наиболее распространенным возбудителем миокардита и острой или конечной стадии ДКМ, непосредственно поражают кардиомиоциты в моделях на животных и при заболевании человека [48]. Вирус связывается с коксаки-аденовирусным рецептором (CAR) и ускоряющим распад фактором (DAF, CD55), который выступает в роли корецептора для интернализации энтеровируса — и он проникает в клетку-хозяина. CAR — белок плотного контакта, локализующийся в клетках сердечно-сосудистой, иммунной и нервной систем, критически важный для интернализации вируса [49]. Его индукции *de novo* на поверхности 60% миоцитов при ДКМ и колонизации корецепторами аденовирусной интернализации avβ3 avβ5 свидетельствуют о том, что CAR — важная молекулярная детерминанта кардиотропизма как коксаки-, так и аденовирусов [49, 50].

Напротив, эритровирусы не поражают миоциты или интерстициальные клетки сердечной ткани. Их геномы были локализованы в ЭК венул, мелких артерий или артериол при скоротечном миокардите или внезапно возникшей сердечной недостаточности [35, 48, 51]. При хронической воспалительной кардиомиопатии PVB19 обнаруживался преимущественно в ЭК мелких капилляров [48, 51]. Предварительные данные указывают на то, что герпесвирус-6 может заражать и кардиомиоциты, и ЭК [52], а точки поражения других кардиотропных вирусов при заболеваниях человека детально не установлены.

Вирусный миокардит развивается в три характерные патологические стадии (рис. 18.1) [43, 53]. Информация по этому вопросу известна для энтеровирусных инфекций, для которых разработаны мо-

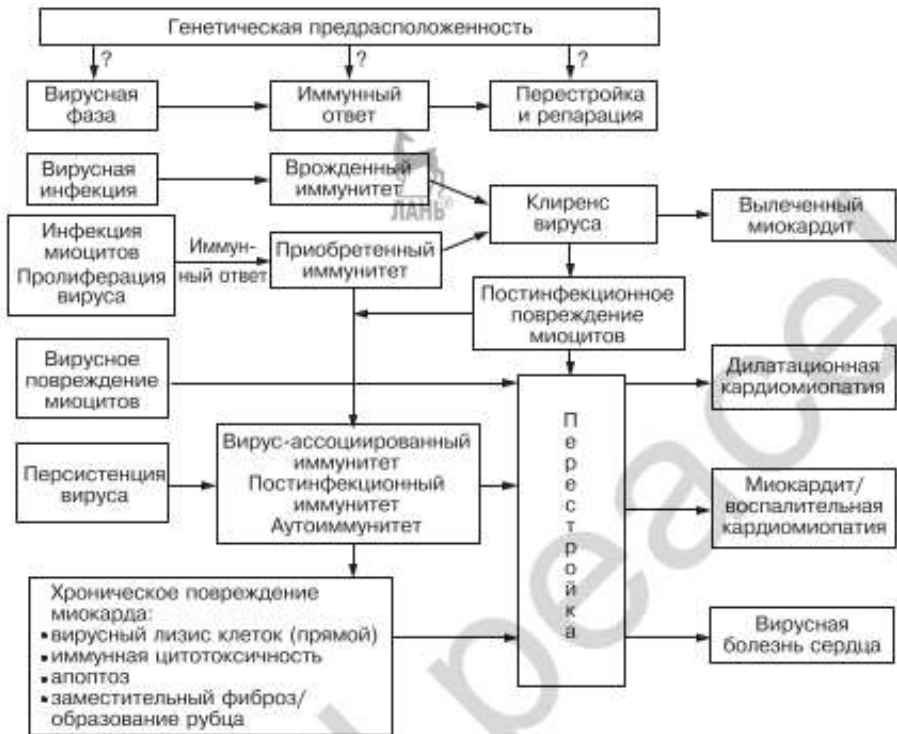


Рис. 18.1. Трехфазная модель сердечно-сосудистой инфекции

дели на животных. После интернализации энтеровируса происходит обратная транскрипция РНК и синтезируется комплементарная цепь [22, 54]. Прямое цитолитическое действие выявляется до того, как образуется воспалительный инфильтрат, он играет решающую роль при остром миокардите (*первая фаза*). Возникающий в результате некроз миоцитов может приводить к существенной утрате сократительной функции, что становится причиной быстро прогрессирующей сердечной недостаточностью и ранней смерти. Ранние механизмы противовирусной защиты со стороны врожденного иммунитета запускаются чужеродными молекулярными антигенами, активирующими *toll*-подобные рецепторы [55–57]. Раннему повреждению и ухудшению функции миокарда способствуют выделяемые макрофагами цитокины и активация натуральных киллеров, непосредственно уничтожающих инфицированные вирусом клетки сердца путем опосредованного перфорином и гранзимами лизиса [58–62].

Активация антигенспецифичного клеточного иммунитета открывает *вторую фазу* защиты от вируса [63–68]. Поскольку зараженные вирусом клетки уничтожаются иммунными эффекторными клетками в результате активации воспалительной реакции, борьба с вирусом происходит за счет уничтожения зараженных миоцитов. Поражение

миокарда зависит от количества инфицированных клеток; наряду с ранним вирусным и иммунным повреждением (фаза 1) вносит вклад в перестройку ткани и развитие болезни. Поэтому процесс заживления связан с разрушением ткани миокарда, неспособной к регенерации.

Отрицательная иммуномодуляция (важная функция интактной иммунной системы, направленная на предотвращение чрезмерного повреждения ткани в ходе иммунного ответа, в норме происходит вскоре после успешного уничтожения патогенов. Хроническая иммунная стимуляция и аутоиммунная реакция связаны с неполным излечением от вирусной инфекции и хроническим вирусным или иммунным повреждением ткани. Свой вклад в эти процессы могут вносить антигенный триггер (постоянно синтезирующиеся вирусные белки) и собственные белки, постоянно высвобождающиеся из поврежденных некрозу или апоптозу клеток миокарда.

Патогенные механизмы инициации и поддержания этих процессов включают скрытую вирусную инфекцию без выявляемой репликации вируса, низкие вирусные нагрузки, молекулярную мимикрию, высвобождение вирусных или внутриклеточных белков миоцитов, аутоантитела, активацию разрушающих матрикс протеаз с последующей перестройкой путем репаративного фиброза [69–74]. Такие механизмы могут изначально повреждать отдельные клетки, но воздействуют и на весь миокард. В итоге возникает клиническая картина, совпадающая с другими необратимыми ДКМ [1].

В *третьей фазе* перестройки вирус может быть полностью элиминирован, а противовирусные иммунные реакции регулярно активироваться. Степень повреждения миокарда определяет дальнейшее клиническое течение у пациентов, которых при биопсии диагностирована идиопатическая ДКМ. Постинфекционную болезнь можно диагностировать только при наличии анамнеза или документированной ранее перенесенной инфекции, или воспаления. При этом латентная вирусная инфекция, вирус-ассоциированная слабая иммунная реактивность и/или аутоиммунные процессы могут непрерывно оказывать негативное воздействие на функцию миокарда. Биопсия в таких ситуациях будет соответствовать воспалительной кардиомиопатии или персистирующему вирусному заболеванию сердца. Без скрупулезного диагностического анализа клиническая картина неотличима от ДКМ.

## **КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЦА**

Если противовирусный иммунитет отработал быстро и эффективно, инфицированные клетки были быстро уничтожены, остаточное повреждение миокарда может быть ограниченным, и остальной миокард может компенсировать частичную утрату сократимой ткани. Такие пациенты могут полностью восстановиться с минимальными клиническими признаками поражения сердца. Результатом контрольной биопсии будет картина излеченного миокардита.

В зависимости от тяжести течения инфекции у пациентов может сохраняться различная степень повреждения миокарда. При умеренной утрате сократимой ткани с более выраженной перестройкой матрикса миокарда восстановление функции происходит лишь частично. Спустя недели или месяцы после острого заболевания у них может наблюдаться существенное улучшение функции миокарда, хотя полное восстановление случается редко. Однако трудно оценить, отражает ли такое улучшение подлинное восстановление миокарда на клеточном уровне или же оно обусловлено применением современных методов медикаментозного лечения сердечной недостаточности. На поздних сроках у многих пациентов сердечная недостаточность прогрессирует, несмотря на регулярный прием лекарств. В это время гистологически диагностируется идиопатическая ДКМ.

На клиническую картину влияет не только выраженность необратимых изменений матрикса и компенсаторный потенциал миокарда. Она также может зависеть от активности персистирующей вирусной инфекции в ткани сердца, подострого воспалительного процесса и аутоиммунных механизмов. Данные биопсии соответствуют воспалительной кардиомиопатии или хроническому вирусному заболеванию сердца.

Одна из основных трудностей анализа биопсии при остром заболевании связана с ошибкой при заборе образца, поскольку на ранней стадии заболевание имеет очаговый характер, его можно недооценивать, если проанализировано недостаточное количество образцов. При хроническом заболевании, когда данные анамнеза зачастую не указывают на определенную патологию, например на перенесенную инфекцию, только положительный результат биопсии имеет диагностическую значимость. Фиброз может быть результатом предшествующей вирусной инфекции или воспаления, важно установить истинную причину изменений миокарда в биопсиях пациентов с «идиопатической» ДКМ. Следует иметь в виду, что подтверждение вирусной инфекции лишь дает подсказку о возможной причине заболевания. Но не доказывает, что вирусная инфекция — единственная причина сердечной недостаточности или прогрессирования заболевания.

Переход миокардита в ДКМ после повреждения миокарда непосредственно вирусом или иммунными механизмами в литературе обычно принимается и поддерживается. Однако длительное повреждение миокарда в результате персистенции вирусной инфекции и/или иммунных процессов при заболевании человека однозначно доказано не было. Несоответствие полученных данных порождает изрядную долю скептицизма. Это несоответствие обусловлено невысоким уровнем диагностики и недостаточно продолжительным наблюдением пациентов. Получено несколько убедительных исследований клинических групп, позволяющих считать, что эти механизмы на самом деле могут быть причиной развития сердечной недостаточности и неблагоприятного прогноза заболевания. Механизмы пагуб-

ного влияния на миокард латентных вирусных инфекций и хронического воспаления или аутоиммунных процессов в настоящее время не совсем понятны и не могут быть доказаны без дополнительного изучения.

Why с коллегами изучили клиническую значимость персистирующих энтеровирусных геномов в миокарде и показали более высокую смертность через 25 месяцев (25% против 4%) у 41 пациента с персистирующей энтеровирусной инфекцией [75]. Похожая тенденция прослеживается в отчете Frustaci и соавт. о ретроспективном анализе пациентов с воспалительной кардиомиопатией на фоне иммуносупрессии [37]. У пациентов с персистенцией различных вирусов (кроме HCV) улучшения не было или даже наблюдалось ухудшение на фоне иммуносупрессии, в то время как у пациентов с отсутствием вируса происходило существенное улучшение. За 9 мес. семерым пациентам без положительной реакции на лечение была сделана трансплантация или они погибли. В статье Saforio и соавт. сообщили о двухлетнем наблюдении за пациентами с активным ( $n = 85$ ) и субактивным ( $n = 89$ ) миокардитом, когда персистенция вируса и наличие аутоантител к сердечной ткани и клинические признаки недостаточности левых и правых отделов сердца четко указывали на неблагоприятный прогноз [74].

При быстро разрешающемся миокардите клиренс вируса, похоже, происходит очень рано — в первые две недели после возникновения симптомов. В исследованиях, анализирующих хроническое заболевание сердца, предполагались персистенция вируса, поскольку вирусные геномы выявлялись на поздней стадии заболевания. Попытка доказать персистенцию вируса с помощью ПЦР за весь период исследования никогда не предпринималась. Поэтому до сих пор неизвестно, следует ли связывать неблагоприятный прогноз с ранним и более выраженным повреждением ткани у вирусологически положительных пациентов или же он обусловлен латентной или вялотекущей вирусной инфекцией.

Чтобы получить больше информации по этому важному вопросу, мы повторно проанализировали результаты биопсий и гемодинамических измерений 172 пациентов с дисфункцией левого желудочка и подтвержденной биопсией вирусной инфекции спустя в среднем 6,8 мес. (от 5,4 до 11,9 мес.) [5]. Вирусные геномы персистировали у 64% пациентов с одной вирусной инфекцией. Спонтанный клиренс наблюдался в 50% случаев энтеровирусной инфекции против 36% — при аденовирусной, 22% — при парвовирусной B19 и 44% — при HGV-6. Эти данные показывают, что клиренс вирусной инфекции может быть поздним, и поэтому однократная биопсия не может однозначно подтвердить персистирование вируса. Клиренс вирусных геномов был ассоциирован с существенным уменьшением размеров левого желудочка и улучшением фракции выброса левого желудочка (LVEF) на ( $p < 0,001$ ). Напротив, функция ЛЖ понизилась на 3% ( $p < 0,01$ ) у пациентов с персистенцией вирусных геномов. В нерандомизиро-



ванном исследовании лечения  $\beta$ -интерферонами 22 пациентов с хронической энтеровирусной и аденовирусной персистенцией (в среднем 44 мес.) клиренс наблюдался у всех [76]. Клиренс вирусов сопровождался существенным уменьшением размеров желудочков и жалоб, LVEF улучшилось на 8,5% ( $p < 0,001$ ). Сравнение гистологических, иммунологических и молекулярно-биологических данных показало, что воспаление миокарда часто сопровождалось вирусной инфекцией и разрешалось после эрадикации вирусов (спонтанно или в результате противовирусной терапии) у пациентов с хронической энтеровирусной или аденовирусной инфекцией [5, 76]. Это говорит о том, что клинические результаты лечения определяются течением вирусной инфекции, а не ассоциированным с вирусом воспалением.

Это первые данные, прямо указывающие на тот факт, что спонтанная или связанная с лечением эрадикация хронической вирусной инфекции не приводит к изменению течения; более того, дисфункция желудочков при хроническом течении заболевания вызвана не только необратимым повреждением миокарда, непосредственно связанным с вирусом. Необходим дальнейший подробный анализ механизмов возникновения обратимого нарушения функции миокарда. Что касается ведения пациентов, эти данные подчеркивают важность выявления инфекции на ранней, обратимой, стадии вирусных заболеваний сердца.

Эффективность ранней терапии особенно очевидна у пациентов с незначительными и умеренными изменениями сердечной мышцы. Кроме того, она может предотвратить возникновение сердечной недостаточности (рис. 18.2).



Рис. 18.2. Стадии миокардита и соответствующее лечение

## ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В КАРДИОЛОГИИ

### Вирусная серология и прямое выделение вируса

В 1974 г. Grist и Bell представили первое серологическое доказательство связи энтеровирусной инфекции с миокардитом [77]. Значение этих вирусов в генезе ДКМ изучено хуже и основано на выявлении высоких титров нейтрализующих антител в случаях внезапного возникновения заболевания. Исходя из этого было сделано предположение, что миокардит — инфекционное заболевание. Хотя серологические и клинические оценки часто подтверждали положительную связь между повышенными или возрастающими титрами и клинической картиной миокардита, проведенный позже одновременный анализ серологических и молекулярно-биологических данных показал, что серологическое тестирование не подтверждает инфекцию сердечной ткани у пациентов с миокардитом или ДКМ и поэтому не имеет диагностического значения [78, 79].

### Выделение вируса

Несмотря на клиническую и серологическую очевидность предшествующей инфекции, выделить реплицирующийся вирулентный вирус у взрослых пациентов с клиническими признаками миокардита или ДКМ удается редко. В соответствии с экспериментальными данными, полученными на животных, вирусы лишь иногда изолировались из тканей сердца в первые две-три недели после возникновения острого заболевания у детей [80, 81]. При хроническом заболевании не удается выделить вирус, а с учетом подострого характера начале заболевания у большинства пациентов с подозрением на наличия вирусной инфекции этот подход не имеет никакой диагностической значимости.

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ В МИОКАРДЕ

### Гибридизация *in situ*

Низкая диагностическая ценность стандартных вирусологических методов способствовала развитию молекулярно-биологических тест-систем для выявления вирусных геномов в тканях сердца.

Гибридизация *in situ* впервые была проведена Bowles [82, 83] и Kandolf [84]. Главное преимущество гибридизации *in situ* — точная локализация вирусного генома на клеточном уровне в различных компартментах тканей. Это быстрая процедура, которая дает информацию о локализации вирусов, но не годится для рутинной клинической диагностики, требующей быстрой расшифровки результатов.

## КАЧЕСТВЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА В КАСКАДНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Внедрение более быстрой каскадной полимеразной цепной реакции в рутинный молекулярно-биологический анализ вирусных инфекций значительно расширило наши знания о предполагаемых кардиотропных вирусах у пациентов с приобретенными заболеваниями сердца. Были выявлены геномы энтеровирусов, аденовирусов, эритровирусов, в том числе парвовируса B19, CMV, вируса гриппа А, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса простого герпеса (HSV), вируса Эпштейна—Барр (EBV), HGV-6, ВИЧ и HCV [16–39].



### Репликация вируса

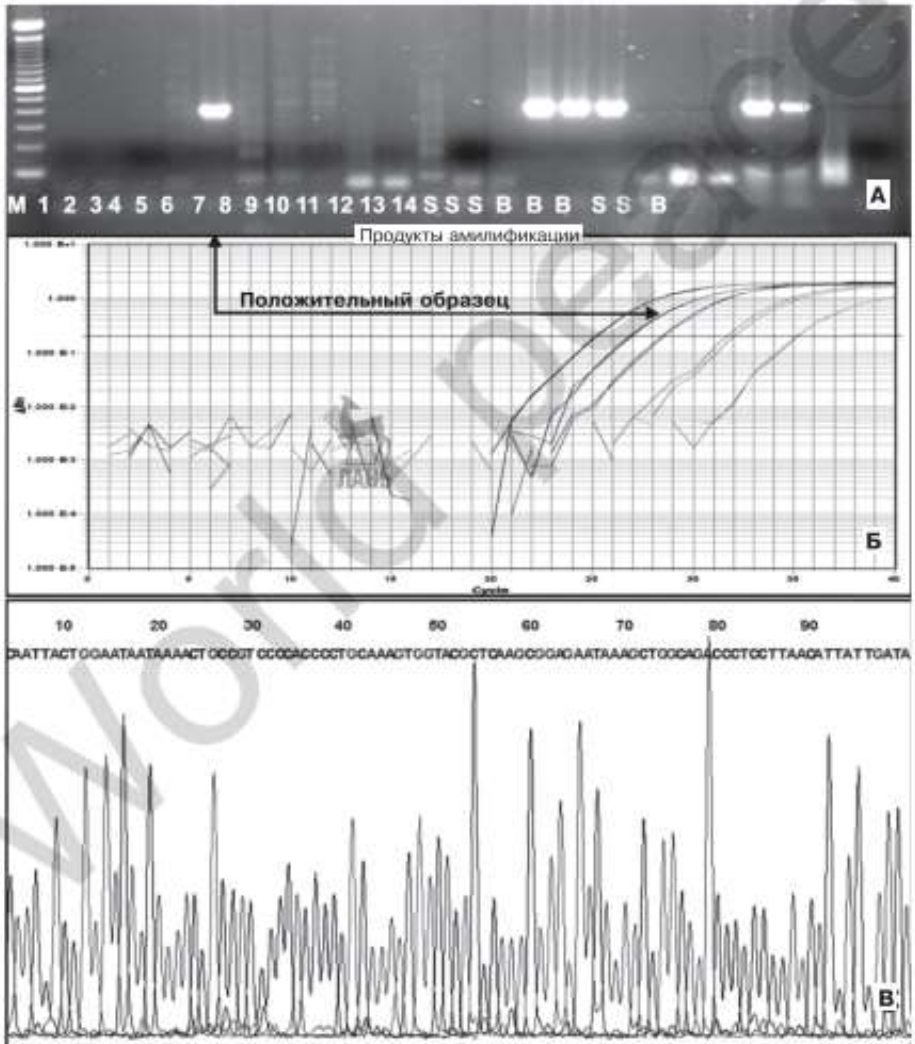
Анализ вирусной репликации в миокарде и предварительные данные позволяют считать, что положительный результат ПЦР-исследования на энтеровирус, аденовирус, эритровирус или вирус герпеса человека-6 может отражать течение вирусной инфекции, а персистенция этих вирусов может оказывать негативное влияние на прогноз тяжести у пациентов [5, 22, 24, 29, 54, 74, 75, 85, 86]. В настоящее время мы не знаем, каковы уровень репликации и метаболическая активность кардиотропных вирусов, не относящихся к коксакивирусам В.

### Количественное выявление вируса с помощью ПЦР в реальном времени

В специализированных лабораториях применяется количественный подход для оценки концентрации большинства кардиотропных вирусов. Сообщалось, что вирусные нагрузки у пациентов с хроническим заболеванием парвовирусом B19 оказались низкими при анализе методом ПЦР в реальном времени (рис. 18.3) [87, 88]. Количество выявленных вирусных копий варьирует между 50 и 500 000 копий/мкг ДНК миокарда, а для энтеровирусов, аденовирусов и HGV-6 количество вирусных копий обычно еще меньше. Количественный подход и его клиническая интерпретация осложняются тем, что фактическое количество вируса часто искажается из-за ошибки забора образца, особенно при очаговом заболевании. Если при вирус-индуцированном хроническом заболевании биопсию берут поздно, можно обнаружить лишь остатки неполной элиминации вируса. Эритровирусы могут персистировать в сердечной ткани годами, и низкие уровни парвовируса B19 в миокарде порядка  $10^2$ – $10^4$  эквивалентов генома/мкг изолированной нуклеиновой кислоты соответствуют персистирующему типу инфекции [34, 87–89].

Малое количество копий вируса не может ни исключить вирус-ассоциированного поражения миокарда, ни коррелировать с масштабом поражения при долгосрочном прогнозе, поскольку такое количество

копий может быть результатом предшествующих событий. Повреждение ткани вызывается также изначальным противовирусным иммунным ответом. В такой ситуации болезнь может никак не зависеть от фактического количества копий вируса на момент взятия биопсии. В настоящее время нет информации об ошибке забора образца и данных последующего наблюдения, сравнивающих количество вирусов и уровень реактивного воспаления миокарда с клиническим течением заболевания.



**Рис. 18.3.** (см. также цветную вклейку). Молекулярная диагностика в сердечной ткани

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОДТИПОВ ВИРУСА МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Секвенирование после ПЦР-анализа позволяет идентифицировать подтипы вируса и исключить загрязнение продуктов ПЦР, которые мешают точной диагностике. По соображениям технологичности и быстроты получения клинической информации пары праймеров размещают так, чтобы одновременно амплифицировать геномную последовательность аденовируса, кодирующую белок гексон, 5'-нетранслируемый участок энтеровирусов или постоянные участки различных вариантов эритровирусов и HGV-6 соответственно [20, 22, 23, 90]. При таком подходе в одном раунде ПЦР можно распознать большинство подтипов энтеровирусов, в том числе вирус Коксаки В и эховирусы, большинство подтипов аденовирусов, различные генотипы парвовируса В19 и HGV-6. Больше информации о различных подтипах вирусов можно получить из анализа последовательностей продуктов амплификации (см. рис. 18.3).

Миокардит могут вызывать все шесть коксакивирусов В, хотя штаммы коксакивирусов В 1–5, похожие на них по последовательности, такие как А9, и некоторые эховирусы выявляются чаще, чем остальные 63 энтеровируса человека (табл. 18.1) [13]. Недавно показано, что эритровирус генотипа 2, ранее не описанный в тканях сердца человека, широко распространен в сердце пациентов с ДКМ, а менее распространенный генотип 1 (парвовирус В19) ассоциирован с более тяжелым нарушением функции сердца [88]. При латентной инфекции парвовируса В19 без воспаления вирус выявляется в 40% случаев, но сердечная дисфункция встречается реже. Поэтому клиническое значение результатов любого вирусологического молекулярного анализа следует интерпретировать в связи с гистологическими и иммуногистологическими данными воспаления в сердце [26, 48, 91]. При оценке результатов биопсий в образцах ткани пациентов с подозрением на кардиомиопатию и персистирующими симптомами сердечной недостаточности были обнаружены варианты герпесвируса человека 6 (А и В) (Kuhl и соавт.). В результате ЭМ выявлены реплицирующиеся частицы HGV-6 в эндотелиальных клетках сосудов сердца и кардиомиоцитах, что указывает на поражение клеток сердца. Эти находки могут объяснить эндотелиальную и диастолическую дисфункцию, связанную с наличием эритровирусной и герпесвирусной инфекций и свидетельствуют о том, что различные очаги вирусной инфекции могут быть ассоциированы с такими клиническими формами, как эндотелиальная и клиническая дисфункция, или с явной систолической сердечной недостаточностью (рис. 18.4) [26, 92].

В настоящее время неизвестно, ни каким образом различные подтипы и варианты вызывают поражение сердца, ни что определяет кардиовирулентный фенотип. Различия в уровнях репликации вирусов, в антигенных эпитопах, вызывающих модификацию противовирусного иммунного ответа, индукцию апоптоза миоцитов и единичные замены нуклеотидов в пределах кодирующих областей, могут превра-



**Рис. 18.4.** Сердечные дисфункции, вызванные кардиовирусами, имеющими тропизм к различным клеткам

тить кардиовирулентный штамм в аттенуированный фенотип [93–96]. Наличием разных вариантов вируса с выраженным патогенным потенциалом можно объяснить часто наблюдаемое несоответствие между результатами ПЦР и клиническим течением.

Помимо вируса на течение инфекционных заболеваний сердца могут влиять особенности хозяина. Не менее 25% пациентов с ДЖМ в странах Запада болеют целыми семьями [97]. В этом контексте иммунные изменения могут определяться генетическим фоном и оказывать влияние на противовирусный иммунитет. Более того, клинические эффекты мутаций белков миокарда, таких как актин или дистрофин, могут усиливаться определенными инфекциями. Пример прямого вирусного эффекта — расщепление энтеровирусной протеазой А2 дистрофина (основного компонента цитоскелета, участвующего в сокращении мышц) [70, 98].

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАХОДОК

Благодаря успехам количественных (количественная ПЦР) и качественных (каскадная ПЦР) молекулярных методик стало возможным выявлять различные вирусные патогены в миокарде в числе менее 10 генных копий. Столь высокая чувствительность диагностических технологий дает большие возможности. Их клиническая значимость для прогноза и тактики лечения во многом зависит от стандартизированного набора диагностических методов и тщательной интерпретации полученных данных. И для пациента, и для терапевта важно, чтобы такие инвазивные процедуры, как биопсия, давали адекватную диагностическую и прогностическую информацию. Образцы биопсий должны обязательно прорабатываться по полному стандарту (гистоло-

гическими, иммуногистологическими и молекулярно-биологическими методами). Неполная диагностическая проработка даст неполный диагноз с недостаточной клинической информацией и поэтому не может служить основой для терапевтического решения.

Благодаря чувствительности ПЦР-анализа необходимо принимать меры предосторожности для обеспечения сохранности образцов и исключения их контаминации. Эти меры включают быструю и правильную обработку образцов, использование свободных от патогенов инструментов для взятия биопсии, и условий хранения, исключающих разложение и загрязнение образцов. Хотя образцы ПЦР можно брать из тканей, фиксированных формалином или заключенных в парафин, чувствительность повышается при использовании образцов тканей, замороженных в жидком азоте. Однако не было проведено широкомасштабных исследований по сравнению различных процедур. Пространственное разделение различных этапов исследований РНК и ДНК и диагностических процедур снижает вероятность контаминации и повышает точность диагностики. Загрязнение можно исключить только путем секвенирования ампликонов образцов.

Главным ограничением интерпретации данных биопсии остается недостаточная чувствительность из-за ошибки забора образца, особенно при ранней очаговой стадии заболевания [99]. Поэтому для ПЦР-анализа обязателен забор достаточного количества образцов, каждый размером 2–3 мм<sup>2</sup> из разных участков межжелудочковой перегородки или миокарда левого желудочка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: A review. *Heart* 2001; 85(5):499–504.
2. Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, et al. Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: Comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26(1):80–84.
3. Kodama M, Oda H, Okabe M, et al. Early and long-term mortality of the clinical subtypes of myocarditis. *Jpn Circ J* 2001; 65(11):961–964.
4. Mangnani JW, Suk-Danik HJ, Dec GW, et al. Survival in biopsy-proven myocarditis: A long-term retrospective analysis of the histopathological, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J* 2006; 151:463–470.
5. Kühl U, Pauschinger M, Seeborg B, et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112(13):1965–1970.
6. Kereiakes DJ, Parmley WW. Myocarditis and cardiomyopathy. *Am Heart J* 1984; 108(5):1318–1326.
7. Guillen-Ortega F, Soto ME, Reyes PA. Primary acute myocarditis. A 10-years institutional experience. *Arch Cardiol Mex* 2005; 75 (suppl 3):81–88.
8. Karjalainen J, Heikkilä J. Incidence of three presentations of acute myocarditis in young men in military service. A 20-year experience. *Eur Heart J* 1999; 20(15):1120–1125.

9. Dechkum N, Pangsawan Y, Jayayasu C, et al. Coxsackie B virus infection and myopericarditis in Thailand, 1987–1989. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29(2):273–276.
10. Friman G, Wesslen L, Fohlman J, et al. The epidemiology of infectious myocarditis, lymphocytic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1995; 16 (suppl O):36–41.
11. Martin AB, Webber S, Fricker FJ, et al. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 1994; 90(1):330–339.
12. Gravanis MB, Sternby NH. Incidence of myocarditis. A 10-year autopsy study from Malmo, Sweden. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115(4):390–392.
13. Rieicansky I, Schreinerova Z, Egnerova A, et al. Incidence of Coxsackie virus infection in patients with dilated cardiomyopathy. *Cor Vasa* 1989; 31(3):225–230.
14. Wakafuji S, Okada R. Twenty year autopsy statistics of myocarditis incidence in Japan. *Jpn Circ J* 1986; 50(12):1288–1293.
15. Karjalainen J, Nieminen MS, Heikkila J. Influenza A1 myocarditis in conscripts. *Acta Med Scand* 1980; 207(1–2):27–30.
16. Jin O, Sole MJ, Butany JW, et al. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction [see comments]. *Circulation* 1990; 82(1):8–16.
17. Grasso M, Arbustini E, Silini E, et al. Search for Coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am J Cardiol* 1992; 69(6):658–664.
18. Weiss LM, Liu XF, Chang KL, et al. Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissue. *J Clin Invest* 1992; 90:156–159.
19. Muir P, Nicholson F, Jhetam M, et al. Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31(1):31–38.
20. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(3):466–472.
21. Bowles NE, Bayston TA, Zhang HY, et al. Persistence of enterovirus RNA in muscle biopsy samples suggests that some cases of chronic fatigue syndrome result from a previous, inflammatory viral myopathy. *J Med* 1993; 24(2–3):145–160.
22. Pauschinger M, Doerner A, Kuehl U, et al. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99(7):889–895.
23. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, et al. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99(10):1348–1354.
24. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, et al. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108(8):945–950.
25. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with «idiopathic» left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111(7):887–893.



26. Tschope C, Bock CT, Kasner M, et al. High Prevalence of Cardiac Parvovirus B19 Infection in Patients with Isolated Left Ventricular Diastolic Dysfunction. *Circulation* 2005; 111:879-886.
27. Papadogiannakis N, Tolfvenstam T, Fischler B, et al. Active, fulminant, lethal myocarditis associated with parvovirus B19 infection in an infant. *Clin Infect Dis* 2002; 35(9):1027-1031.
28. Rohayem J, Dinger J, Fischer R, et al. Fatal myocarditis associated with acute parvovirus B19 and human herpesvirus 6 coinfection. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12):4585-4587.
29. Dec GW Jr., Palacios IF, Fallon JT, et al. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312(14):885-890.
30. Dec GW Jr., Waldman H, Southern J, et al. Viral myocarditis mimicking acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20(1):85-89.
31. Ambinder RF, Lambe BC, Mann RB, et al. Oligonucleotides for polymerase chain reaction amplification and hybridization detection of Epstein-Barr virus DNA in clinical specimens. *Mol Cell Probes* 1990; (4):397-407.
32. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991; 337:189-192.
33. Muir SW, Murray J, Farquharson MA, et al. Detection of cytomegalovirus in upper gastrointestinal biopsies from heart transplant recipients: Comparison of light microscopy, immunocytochemistry, in situ hybridisation, and nested PCR. *J Clin Pathol* 1998; 51(11):807-811.
34. Nigro G, Bastianon V, Colloridi V, et al. Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: Report of 3 cases and review. *Clin Infect Dis* 2000; 31(1):65-69.
35. Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, et al. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: An endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol* 2003; 34(1): 92-95.
36. Pankuweit S, Lamparter S, Schoppet M, et al. Parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimen. *Circulation* 2004; 109(14):e179.
37. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, et al. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: Virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107(6):857-863.
38. Matsumori A, Ohashi N, Hasegawa K, et al. Hepatitis C virus infection and heart diseases: A multicenter study in Japan. *Jpn Circ J* 1998; 62(5):389-391.
39. Matsumori A. Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res* 2005; 96(2):144-147.
40. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, et al. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991; 68(13):1388-1392.
41. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006; 92(3):316-320.
42. Lotze U, Egerer R, Tresselt C, et al. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004; 193(2-3):75-82.
43. Liu PP, Schultheiss HP. Myocarditis. In: Baunwald E, ed. *Heart Disease*, 8 edn. Philadelphia, PA: W B Saunders Co, 2008:1775-1792.

44. Modlin FJ. Picornaviridae. In: Mandell GL, Douglas RG Jr., Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York, NY: Churchill Livingstone, 1990:721–732.
45. Martino TA, Petric M, Brown M, et al. Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor. *Virology* 1998; 244(2):302–314.
46. Liu PP, Opavsky MA. Viral myocarditis: Receptors that bridge the cardiovascular with the immune system? *Circ Res* 2000; 86(3):253–254.
47. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997; 275(5304):1320–1323.
48. Klingel K, Sauter M, Bock CT, et al. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004; 193(2–3):101–107.
49. Bergelson JM. Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharmacol* 1999; 57(9):975–979.
50. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha (v) beta (3) and alpha (v) beta (5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: Implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001; 104(3):275–280.
51. Bock CT, Klingel K, Aberle S, et al. Human Parvovirus B19: A new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52:340–343.
52. Krueger GRF, Rojo J-, Buja LM, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) is a possible cardiac pathogen: An immunohistological and ultrastructural study. *Hospital General* 2008; 71:187–191.
53. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: An inflammatory link. *Cardiovasc Res* 2003; 60(1):5–10.
54. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, et al. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(6):1920–1926.
55. Triantafilou K, Orthopoulos G, Vakakis E, et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol* 2005; 7(8): 1117–1126.
56. Stewart MJ, Smoak K, Blum MA, et al. Basal and reovirus-induced beta interferon (IFN-beta) and IFN-beta-stimulated gene expression are cell type specific in the cardiac protective response. *J Virol* 2005; 79(5):2979–2987.
57. Fuse K, Chan G, Liu Y, et al. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 2005; 112(15):2276–2285.
58. Liu CC, Young HY, Young JDE. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *N Engl J Med* 1996; 335:1651–1659.
59. Liu CC, Persechini PM, Young JD. Perforin and lymphocyte-mediated cytolysis. *Immunol Rev* 1995; 146:145–175.
60. Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, et al. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: Perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol* 1998; 153(2):417–428.
61. Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, et al. Protective Role for Interferon- (beta) in Coxsackievirus B3 Infection. *Circulation* 2004; 110:3540–3543.
62. El-Menyar AA. Cytokines and myocardial dysfunction: State of the art. *J Card Fail* 2008; 14(1):61–74.

63. Opavsky MA, Penninger J, Aitken K, et al. Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circ Res* 1999; 85(6):551-558.
64. Liu F, Whitton JL, Slifka MK. The rapidity with which virus-specific CD8+ T cells initiate IFN-gamma synthesis increases markedly over the course of infection and correlates with immunodominance. *J Immunol* 2004; 173(1):456-462.
65. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Rose NR. Autoimmune myocarditis: Cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmun Rev* 2004; 3(7-8):476-486.
66. Tam PE. Coxsackievirus Myocarditis: Interplay between Virus and Host in the Pathogenesis of Heart Disease. *Viral Immunol* 2006; 19(2):133-146.
67. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusing SA, et al. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *J Immunol* 2005; 174(1):261-269.
68. Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, et al. NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS one* 2008; 3(6):e2361.
69. Klingel K, Hohenadl C, Camu A, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: Quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(1):314-318.
70. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, et al. Enteroviral protease 2 A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999; 5(3):320-326.
71. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, et al. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001; 16(3):175-186.
72. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. Myocardial remodeling in viral heart disease: Possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev* 2004; 9(1):21-31.
73. Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, et al. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114(6):565-573.
74. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: Prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28(11):1326-1333.
75. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, et al. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89(6):2582-2589.
76. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107(22):2793-2798.
77. Grist NR, Bell EJ. A six-year study of coxsackievirus B infections in heart disease. *J Hyg (Lond)* 1974; 73(2):165-172.
78. Tracy S, Chapman NM, McManus BM, et al. A molecular and serologic evaluation of enteroviral involvement in human myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22(4):403-414.

79. Keeling PJ, Tracy S. Link between enteroviruses and dilated cardiomyopathy: Serological and molecular data. *Br Heart J* 1994; 72 (suppl 6):S25—S29.
80. El-Hagrassy MM, Banatvala JE, Coltart DJ. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in patients with cardiac and other diseases. *Lancet* 1980; 2(8205):1160–1162.
81. Muir P, Nicholson F, Tilzey AJ, et al. Chronic relapsing pericarditis and dilated cardiomyopathy: Serological evidence of persistent enterovirus infection. *Lancet* 1989; 1(8642):804–807.
82. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, et al. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 1(8490):1120–1123.
83. Bowles NE, Rose ML, Taylor P, et al. End-stage dilated cardiomyopathy. Persistence of enterovirus RNA in myocardium at cardiac transplantation and lack of immune response. *Circulation* 1989; 80(5):1128–1136.
84. Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, et al. In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: An approach to the diagnosis of viral heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(17):6272–6276.
85. Baboonian C, Treasure T. Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart* 1997; 78(6):539–543.
86. Frustaci A, Chimenti C, Pieroni M, et al. Cell death, proliferation and repair in human myocarditis responding to immunosuppressive therapy. *Mod Pathol* 2006; 19(6):755–765.
87. Klein RM, Jiang H, Niederacher D, et al. Frequency and quantity of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsies from patients with suspected myocarditis or idiopathic left ventricular dysfunction. *Z Kardiol* 2004; 93(4):300–309.
88. Kühl U, Lassner D, Pauschinger M, et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J Med Virol* 2008; 80(7):1243–1251.
89. Schowengerdt KO, Ni J, Denfield SW, et al. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: Diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation* 1997; 96(10):3549–3554.
90. Kandolf R, Hofschneider PH. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: Full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(14):4818–4822.
91. Pankuweit S, Ruppert V, Eckhardt H, et al. Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory myocardial diseases with a special focus on parvovirus b19. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52(7–8):344–347.
92. Vallbracht KB, Schwimbeck PL, Kuhl U, et al. Differential aspects of endothelial function of the coronary microcirculation considering myocardial virus persistence, endothelial activation, and myocardial leukocyte infiltrates. *Circulation* 2005; 111(14):1784–1791.
93. Gauntt CJ, Trousdale MD, LaBadie DR, et al. Properties of coxsackievirus B3 variants which are amyocarditic or myocarditic for mice. *J Med Virol* 1979; 3(3):207–220.

94. Mikami S, Kawashima S, Kanazawa K, et al. Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220(3):983-989.
95. Reetoo KN, Osman SA, Illavia SJ, et al. Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: Biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J Gen Virol* 2000; 81 (Pt 11):2755-2762.
96. Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3):579-587.
97. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29(2):270-276.
98. Badorff C, Knowlton KU. Dystrophin disruption in enterovirus-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy: From bench to bedside. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004; 193(2-3):121-126.
99. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, et al. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: A comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 2004; 109(10):1250-1258.



## **Дж. Скотт**

John Scott, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

## **А. Заман**

Atif Zaman, Department of Medicine, Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon, U.S.A.

## **М. Чанг**

Michael Chang, Department of Medicine, Portland VA Medical Center, Portland, Oregon, U.S.A.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Гепатитом называется воспаление печени, возникающее из-за множества причин — инфекционных (вирусы) и неинфекционных (алкоголь, лекарства или ожирение). Эта глава посвящена вирусному гепатиту с первичным поражением печени; заболевания вызывают вирус гепатита А (HAV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус гепатита D, или дельтавирус (HDV), и вирус гепатита Е (HEV). Исторически различали «инфекционный» гепатит и «сывороточный» по путям передачи: фекально-оральному и контактному (с кровью или при половом акте). В дальнейшем этиология была идентифицирована как HAV и HBV.

Благодаря тестированию донорской крови, информированности пациентов и вакцинации против HAV и HBV новые случаи инфекций, вызванных HAV, HBV и HCV, стали встречаться существенно реже за последние 10 лет. По экспертным оценкам, в 2007 г. в США было 13 000 случаев острого гепатита А, 13 000 острого гепатита В и 2800 случаев острого гепатита С [1]. Четыре миллиона американцев считаются хронически инфицированными HCV [2] и 1,25 млн — гепатитом В [3].

## **КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ**

Острый инфекционный гепатит обычно не имеет каких-либо характерных симптомов, они зависят от возраста и особенностей организма. Самые распространенные — лихорадка, боль в правом верхнем квадранте живота, недомогание, тошнота, рвота и анорексия. Затем эта продрома может завершиться развитием желтухи с темной мочой и обесцвеченным калом. Самый распространенный симптом хронического гепатита — недомогание. В запущенных случаях хронический гепатит может привести к циррозу и декомпенсации функции печени. Осложнения цирроза включают желтуху, асциты, отеки нижних конечностей, нарушение сознания и желудочно-кишечное кровотечение.

## ВОЗБУДИТЕЛИ

Вирус гепатита А — мелкий безоболочный одноцепочечный «+»-РНК вирус, относится к роду *Hepatovirus* семейства *Picornaviridae* [4]. Существует только один серотип, хотя есть несколько генетически различных форм НАV (генотипов). При инфицировании одним из генотипов возникает иммунный ответ ко всем генотипам [5].

Вирус гепатита В — двуцепочечный ДНК-вирус с оболочкой. Он использует обратную транскриптазу низкой точности, что приводит к многочисленным мутациям в каждом цикле репликации.

Вирус гепатита С — вирус семейства *Flaviviridae* с одноцепочечной «+»-цепью РНК [6]. Он имеет высококонсервативный 5'-некодирующий участок, необходимый для репликации вируса и служащий мишенью для ПЦР-анализа. Отсутствие проверки во время репликации РНК наряду с ее высокой скоростью ( $10^{10}$ – $10^{12}$  вирионов/сут.) приводит к значительной вариации генома [7].

Вирус гепатита D — мелкий одноцепочечный РНК-вирус, относится к роду *Deltavirus*. Он уникален тем, что наблюдается только в сочетании с инфекцией, вызванной HBV: от HBV зависит сборка его нуклеокапсида, от поверхностного антигена — упаковка [8].

Вирус гепатита Е — тоже мелкий вирус с одной «+»-цепью РНК, похожий на вирус гепатита А. В настоящее время вирус гепатита Е не классифицирован, поскольку он имеет общие черты с несколькими разными классами вирусов. Как и у НАV, существует один серотип с несколькими известными генотипами. Инфекция любым из генотипов дает иммунитет ко всем генотипам [9].

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

В табл. 19.1 обобщены схожие черты и различия в эпидемиологии вирусных гепатитов. НАV долгое время ассоциировали с перенаселенностью и бедностью, в настоящее время он распространен в регионах с недостаточно развитыми системами очистки воды. НАV распространяется фекально-оральным способом передачи. До того как стала широко применяться вакцина, НАV поражал население из групп риска (коренные жители Америки и дети испанского происхождения) в ходе периодически возникавших эпидемий. После начала иммунизации детей групп риска в 1996 г. и всех детей в 2006 г. новые случаи гепатита А отмечались значительно реже [10, 11]. Обычно НАV-инфекция протекает доброкачественно, и большинство заболевших полностью восстанавливаются за два месяца. В группу риска неблагоприятного течения входят лица старше 40 и пациенты с сопутствующей инфекцией другими вирусными гепатитами [12].

Около 350 млн людей во всем мире имеют хроническую инфекцию HBV. Почти каждый третий контактировал с HBV — возбудителем одной из самых распространенных хронических инфекций [13]. В США 1,25 млн человек — носители хронической инфекции, большинство из них родились за рубежом [3]. Восточная и Южная

Таблица 19.1

## Эпидемиология, профилактика и терапия вирусного гепатита

Вирус	Острый или хронический	Путь передачи	Разработана вакцина	Доступно лечение
HAV	Острый	Фекально-оральный	Да	Нет
HBV	Оба	Черескожный, переливание крови, перинатальный, половой	Да	Да
HCV	Оба	Черескожный, переливание крови, нечасто половой, редко перинатальный	Нет	Да
HDV	Оба	Черескожный, переливание крови, половой, бытовой	Нет, но HBV-вакцинация предотвращает HDV	Да
HEV	Острый	Фекально-оральный	Нет	Нет

Азия, а также регионы Африки южнее Сахары — эндемичные области, где серопозитивность населения может превышать 8% [14]. В развитых странах HBV передается при внутривенных инъекциях наркотиков, половым путем или при профессиональном черескожном контакте. В Азии HBV передается перинатально — от инфицированной матери к ее ребенку. В Африке и приполярных областях передача горизонтальная, происходит в первые пять лет жизни. Вероятность возникновения хронической инфекции HBV зависит от возраста. Например, дети при перинатальном контакте имеют 95%-ю вероятность возникновения хронического заболевания, а у взрослых она составляет 3–5% [14]. HBV — главная причина гепатоклеточной карциномы (ГКК) во всем мире; ~1 млн смертей ежегодно напрямую связывают с HBV-инфекцией [14].

HCV — одна из наиболее распространенных хронических инфекций в США. Обычно она передается при контакте с зараженной кровью. Факторы риска — использование наркоманами одной иглы, назальное применение кокаина, переливание препаратов крови до 1992 г. и факторов свертывания до 1987 г., татуировки, реже — половые контакты высокого риска и перинатальная передача. По оценкам, в мире насчитывается 170 млн инфицированных, в США — почти 4 млн [2]. У 75–80% людей, имевших контакт с HCV, развивается хроническая инфекция. Временной интервал от момента заражения до возникновения цирроза варьирует от 20 до 40 лет [15]. Хотя новые случаи инфекции встречаются реже, с учетом длительного периода заболевания до развития цирроза, пик тяжести и летальности инфекции ожидается к 2030 г. [16]. В настоящее время HCV — самое распространенное показание к трансплантации печени в США и Европе. Ожидается, что количество погибающих от HCV в США вырастет с 13 000 случаев в 2000 г. до 39 000 случаев к 2030 г. [16, 17].



HDV распространен в областях, эндемичных по HBV, в особенности на Ближнем Востоке, в Средиземноморье, Африке, областях Южной Америки и Центральной Азии. У 5% пациентов с хроническим гепатитом В сопутствующая инфекция вируса гепатита D [8]. В США HDV наблюдается преимущественно у получавших инъекционные препараты или частые переливания крови, он реже передается при половых или бытовых контактах. С HDV связаны более быстрое развитие инфекции и более высокий уровень цирроза (60–70% через 5–10 лет) [18]. Уровень смертности в 10 раз выше, чем при моноинфекции HBV [19].

Гепатит E — самая распространенная в мире причина эпидемического гепатита. HEV передается фекально-оральным путем аналогично инфекции HAV. HEV эндемичен в большинстве экваториальных стран, что приводит к sporadическим вспышкам [20]. Самая мощная из известных вспышек произошла в Синьцзяне (Китай) между 1986 и 1988 гг., поразив почти 120 000 человек. Популяционные исследования в этой вспышке показали, что самые тяжелые симптомы были у лиц в возрасте 15–40 лет, а высокий уровень смертности был у беременных на поздних сроках и при сопутствующей инфекции HEV (до 20%) [21].

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Гепатит могут вызывать также другие вирусы (цитомегаловирус, вирус простого герпеса, аденовирус, вирус Эпштейна—Барр), бактерии (пиогенные абсцессы), грибки (*Candida*) и паразиты (эхинококк, шистосома). К неинфекционным причинам относятся злоупотребление алкоголем, применение некоторых медицинских препаратов, жировой гепатоз, токсины, аутоиммунное повреждение, наследственные болезни (Вильсона—Коновалова, гемохроматоз, недостаточность альфа1-антитрипсина) и недостаточность правых отделов сердца.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Хронический вирусный гепатит часто диагностируется на основании изменения показателей рутинных «функциональных печеночных проб» (общий билирубин, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза и гаммаглутамилтрансфераза). Аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ) — внутриклеточные ферменты, высвобождающиеся при гибели гепатоцитов. Поскольку АЛТ синтезируется преимущественно гепатоцитами, ее повышенный уровень характерен для воспаления печени. Высокие уровни АСТ и АЛТ отражают деструкцию гепатоцитов. Нормальный уровень АЛТ составляет <19 ед./л у женщин и <30 ед./л у мужчин [22], однако нормативные показатели разных лабораторий могут значительно варьировать.

## ВИДЫ ОБРАЗЦОВ И ИХ ОБРАБОТКА

Серологическое исследование проводят на образцах сыворотки или плазмы, выделенных из пельной крови в течение 24 ч. Образцы следует хранить до 5 сут. при температуре 2—8 °С или замороженными при -70 °С. В пробирках для забора не должно быть гепарина, поскольку это вещество может мешать постановке проб. Следует избегать повторных циклов замораживания/оттаивания. Образцы крови для проб нуклеиновых кислот (уровень вирусной нагрузки, генотип, резистентность) следует собирать в пробирки с ЭДТА (сиреневая крышка) или цитрат декстрозы (желтая крышка). Обработку крови проводят в течение 6 ч, тестирование — 24 ч или же образцы нужно заморозить при -70 °С.

## ПРЯМОЕ ИЗУЧЕНИЕ (МИКРОСКОПИЯ, ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ)

Вирусы HAV и HEV выявляются с помощью коммерческих тест-наборов, позволяющих обнаружить антитела к специфическим вирусным антигенам. Поскольку оба вируса имеют только один серотип, золотым стандартом диагностики этих инфекций является выявление вирусспецифичных IgM и IgG. Обнаружение IgM указывает на острую инфекцию, наличие IgG — на перенесенное заболевание. В некоторых регионах доступна ПЦР для HEV, но не везде. В США тестирование на HEV проводится только в исследовательских лабораториях в системе учреждений контроля и профилактики заболеваний. Доступны такие методы, как культуральный, иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноэлектронная микроскопия и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), но они больше подходят для исследовательских, а не клинических целей.

HBV можно выявить только с помощью электронной микроскопии, хотя этот метод дорогостоящий, трудоемкий и применяется только в исследовательских целях. Можно увидеть три морфологические особенности: сферические поверхностные антигены, нитевидную форму поверхностных антигенов и сферическую частицу с двойной оболочкой, содержащую вирион HBV, называемую частицей Дейна. Поверхностный антиген (HBsAg) образуется как при острой, так и при хронической инфекции. Антиген е (HBeAg) указывает на активную репликацию и ассоциируется с высоким риском гепатоклеточной карциномы. [23]. Более подробную информацию о выявлении антигена и интерпретации результатов можно найти в разделе по серологическому тестированию.

Как и при других хронических вирусных инфекциях, определение уровня ДНК HBV очень важный критерий необходимости применения специфического лечения. Например, в ходе масштабного исследования на Тайване было установлено, что уровни ДНК HBV предсказывали риск возникновения гепатоклеточной карциномы: у пациентов с исходным уровнем > 1 млн копий/мл риск гепатоклеточной кар-

циномы в ближайшие 10 лет был в 10 раз выше, чем у пациентов, имевших < 300 копий/мл [24]. Похожее исследование, проведенное той же научной группой, показало, что у пациентов с более высокими вирусными нагрузками чаще возникал цирроз [25]. По уровню вируса также судят о необходимости начала лечения и проводят мониторинг реакции на терапию [26].

Обычно используют три метода выявления ДНК HBV: полимеразная цепная реакция (ПЦР), амплификация разветвленной цепи (bDNA) и гибридизация с захватом зонда. Среди тестов ПЦР более ранние методики имеют меньший диапазон и менее чувствительны по сравнению с ПЦР-РВ [27]. Разработанный в Национальном институте генетики и поставляемый Lab-Corp набор SuperQuant имеет диапазон чувствительности от 100 до  $10^9$  копий/мл [19]. Самая популярная проба, ПЦР в реальном времени, имеет повышенную чувствительность, и ее проще ставить по сравнению с bDNA (Versant v3.0, Bayer) [28, 29]. Набор TaqMan обеспечивает количественное определение с высокой чувствительностью, линейное в диапазоне  $10^{1,7}$ – $10^8$  МЕ/мл, оно одинаково эффективно для генотипов А–Н [30]. С использованием РНК-зондов, которые связываются с ДНК-мишенью и затем амплифицируют сигнал, методика ДНК-гибридизации с захватом позволяет выявить ДНК до  $10^8$  копий/мл, но диапазон ограничен  $10^4$  (Ultrasensitive HBV Hybrid Capture II) [31]. Единственным одобренным Управлением по контролю за лекарствами и продуктами (FDA) тестом определения ДНК HBV является качественный ПЦР тест-скрининг HBV для донорской крови (HBV AmpliScreen, Roche Molecular Systems, Плезантон, Калифорния). Как и количественное определение HCV, количественное определение ДНК HBV входит в Международный стандарт ВОЗ для внутреннего стандарта; воспроизводимость и сравнимость результатов, полученных в разных лабораториях, выше, если они выражены в МЕ/мл.

Вирус гепатита С обычно выявляют в две стадии: скрининговая иммуноферментная проба (ИФА) выявляет антитела к белкам HCV, подтверждение проводят либо более специфичным рекомбинантным иммуноблотом, либо прямым выявлением РНК HCV (рекомендуется в большинстве случаев).

Скрининг-тест второго поколения (ИФА-2) выявляет антитела к трем белкам HCV: С22 (коровый белок), С33 неструктурный белок участка 3 (NS3), С100 неструктурный белок участка 4 (NS4). Чувствительность этого теста 92–95%. Иммуноферментный тест третьего поколения (ИФА-3) способен выявить четвертый белок HCV (NS5), что повышает чувствительность до 97–99% при специфичности >99% [32, 33]. Ложноположительный результат может наблюдаться у пациентов с нарушениями иммунной системы (ВИЧ-положительные) и находящихся на гемодиализе. Для этих групп населения следует использовать чувствительный метод ПРЦ на HCV, если нет иного объяснения аномалиям печеночных функциональных проб. Ложноположительные результаты могут достигать 35% у населения с низ-

ким риском, что подчеркивает необходимость прицельного скрининга и подтверждающего тестирования [34].

Если первоначальный скрининг-тест оказался положительным, можно поставить подтверждающую пробу, чтобы исключить ложноположительный результат. В настоящее время доступны два подтверждающих теста: RIBA-2 и молекулярное тестирование на РНК HCV. Тест RIBA-2 более дорогой и технически сложный, но выявляет также белки С22, С33 и С100; результат считается положительным, когда выявляются антитела к двум и более белкам, сомнительным, когда — к одному, и отрицательным, когда антител не выявлено.

Самый чувствительный и специфичный метод выявления HCV — обнаружение РНК HCV в сыворотке с помощью ПЦР. Молекулярное тестирование обнаруживает вирус и неиммунные признаки инфекции т. е. позволяет рано идентифицировать острый гепатит С, когда антитела не выявляются, но активный вирус присутствует в крови. Доступны два вида тестов на нуклеиновые кислоты: количественный и качественный [35].

К количественным тестам относятся AMPLICOR 2.0 и Ampliscreen 2.0 от Roche Diagnostics, Индианаполис, Индиана и UltraQua, выполняемые в Национальном институте генетики в Лос-Анджелесе, Калифорния, США. Эти три теста ПЦР-РВ для амплификации РНК HCV, выявляющие активную инфекцию с нижним порогом чувствительности 50 МЕ/мл [36]. Другая качественная методика, известная как транскрипционная амплификация (ТМА), используется в количественных пробах Versant HCV (Bayer Diagnostics, Эмеривилль, Калифорния) и Procleix (GenProbe, Сан Диего, Калифорния) с нижним порогом чувствительности до 5 МЕ/мл и более высокой чувствительностью (98%) [37].

Количественное измерение РНК HCV проводится методом ОТ-ПЦР, ПЦР-ВР или методом разветвленной цепи ДНК (bDNA). В SuperQuant (Национальный институт генетики) и MONITOR 2.0 (Roche Diagnostics) используется методика ОТ-ПЦР, а в VERSANT bDNA 3.0 — методика разветвленной цепи (Bayer Corp., Тарритаун, Нью-Йорк) [38, 39]. ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan (Roche) по пределам выявления похожа на количественные пробы (от 10 МЕ/мл до 100 млн МЕ/мл) в полностью автоматизированной системе [31]. Благодаря скорости, автоматизации и характеристикам ПЦР в реальном времени стало самым популярным тестом для выявления HCV.

Антиген HDV можно увидеть в микроскоп в образцах биопсии печени. Этот процесс, однако, требует специального окрашивания — небыстрого и непростого. Аналогично выявление HDV Ag с помощью ИФА и вестерн-блота технически сложный, хотя и более чувствительный метод. Серологическое тестирование на HDV могут выполнить специализированные лаборатории (такие как Focus Diagnostics). Выявление РНК HDV методом ПЦР — более надежный диагностический тест по сравнению с серологией, поскольку избегает захвата антигенов

в иммунных комплексах [40]. Количественное определение РНК HDV методом ПЦР в реальном времени, хотя и проводится только в специализированных лабораториях, имеет большое значение, поскольку более высокие уровни вирусной нагрузки могут коррелировать с более тяжелым течением заболевания [41], а вирусная кинетика HDV предсказывает успех лечения [42]. Чувствительность этой пробы составляет от 10 до 100 копий/мл [40]. Примечательно, что уровни РНК HDV и ДНК HBV могут быть взаимосвязаны. Качественное определение на РНК HDV проводится в специализированных лабораториях. В этой пробе используются праймеры, нацеленные на область, кодирующую наиболее консервативный С-конец антигена HDV; однако, учитывая качественный характер этого теста, было трудно разработать праймеры, приспособленные к большому многообразию штаммов вируса.

### Изоляция вируса

В целом вирусы гепатита очень трудно выращивать в культуре. Хотя HBV может расти на гепатоцитах здоровых взрослых людей или эмбрионов, инфицирующие вирионы в такой системе не размножаются [43] и поэтому для диагностики не используется. За последние несколько лет была выведена культура вируса гепатита С, но пока ее применяют исключительно в исследовательских целях [44]. Для HAV и HEV есть модели клеточных культур, однако все они плохо приспособлены и медленно растут — это инструмент только для исследований [45, 46].

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ

HAV и HEV идентифицируют с помощью стандартного ИФА для выявления IgM и IgG. Идентификация HBV и HDV основывается на результатах серологии и амплификации нуклеиновых кислот. Как было описано ранее, HCV можно диагностировать с помощью как ИФА, так и тестов на нуклеиновые кислоты.

### СИСТЕМЫ ТИПИРОВАНИЯ

Хотя у HAV не менее четырех генетически различных генотипов, клинический серотип один [47]. Иммуитет к одному из них распространяется на все; между разными генотипами нет клинически значимых различий. Повсеместно распространенные генотипы имеют 20% различий в последовательностях между генотипами [9]. Вероятно, есть один доминантный эпитоп, определяющий один серотип и иммуитет ко всем генотипам после инфекции.

HBV классифицируется на восемь главных генотипов (А—Н), различающихся по последовательности более чем на 8% [48]. Генотипы имеют уникальные географические ниши. Например, генотипы В и С чаще всего встречаются в Азии. В США самые распространенные генотипы — А2, В, С и D. Важно знать генотип HBV, поскольку

по нему можно судить о реакции на интерферон (А реагирует лучше, чем D) [49], а некоторые генотипы (С и F) с большей вероятностью вызывают гепатоклеточную карциному [50, 51]. Генотип выявляют по нуклеотидной последовательности наиболее консервативного участка генома, обычно pre-S или S. Генотипирование можно проводить анализом линейных зондов (Inno-Lipa HBV DRv2, Innogenetics, Гент, Бельгия или Quest Diagnostics) или ДНК-секвенированием «на дому», хотя ни одна из этих проб не одобрена Управлением по контролю за лекарствами и продуктами.

Поскольку у HCV высокий уровень репликации ( $10^{12}$  вирионов/сут.) и отсутствует проверка при репликации РНК, последовательности РНК HCV существенно различаются. Существует шесть генетически различных групп HCV, называемых генотипами с более чем 30%-й вариабельностью геномной последовательности. В США чаще всего встречается генотип 1 HCV (71,5%), за ним следуют генотипы 2 и 3 (~19%) [52, 53]. Квазивиды — дивергентные последовательности HCV у одного пациента, их возникновение связывают с мутациями вируса. Хотя квазивиды не имеют явного прогностического значения для лечения или естественного течения заболевания, их наличием можно объяснить резистентность при лечении интерфероном и рибавирином [52].

Для инфицированных HCV важно определить его генотип, поскольку это влияет на продолжительность лечения и его успешность. Согласно оценкам, инфекция, вызванная генотипом 1, требует годового лечения интерфероном, связанным с ПЭГ, и рибавирином, а эффективность составляет всего 40–50%, в то время как для генотипов 2 и 3 течение успешно на 80–90% при 24-недельном курсе [54, 55].

Существует три основных генотипа HDV. Генотип 1 распространен в западных странах и ассоциирован с фульминантным (скоротечным) гепатитом [8]. Генотип 2 чаще встречается в Азии и дает менее агрессивное течение. Генотип 3 выявляется в бассейне Амазонки и также ассоциируется с фульминантным гепатитом. Генотипирование проводится только в исследовательских целях определением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, секвенированием или иммуногистохимическим окрашиванием с помощью генотипоспецифических антител к HD [8].

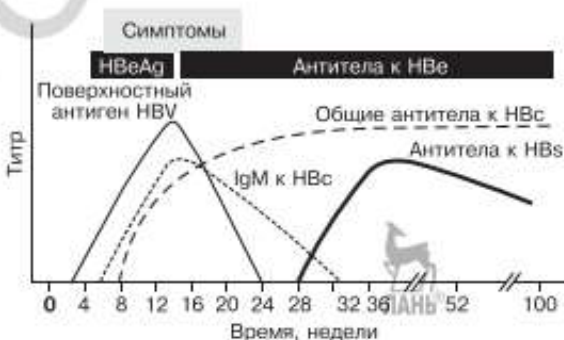
## СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Серологическое исследование при остром инфекционном гепатите всегда должно включать панель тестов. Это необходимо для того, чтобы исключить тех потенциальных возбудителей, которых невозможно исключить на основании анамнеза или физикального осмотра. Учитывая существенную схожесть симптомов и длительный продромальный период инфекционных гепатитов, стандартная панель должна включать оценку IgG и IgM к HAV, Sag, Sab, IgG и IgM к коровому белку HBV, а также антител и РНК HCV. Если была поездка в район,

эндемичный по HEV, надо оценить IgG и IgM к HEV. Аналогично, если есть подозрение на предшествовавшую инфекцию HBV или пациент проживает в эндемичном регионе, стоит поставить ПЦР и тестирование на HDV.

Вирусом гепатита А обычно заражаются фекально-оральным путем. Вирус абсорбируется в кишечнике и попадает в печень. Инкубационный период составляет от 15 до 49 дней. При появлении симптомов в течение 1–2 недель развивается желтуха. Почти у 90% детей младше 5 лет и 20–30% взрослых инфекция протекает бессимптомно. В желтушный период, длящийся обычно около двух недель, симптомы ослабевают. За 2 мес. полностью выздоравливают 60% пациентов, за 6 мес. — почти все 100% [56]. Серологическое тестирование на HAV состоит из серологической оценки IgM и IgG к HAV с помощью наборов для ИФА или РИА. Хотя возможно тестирование фекалий и постановка ПЦР HAV, у большинства пациентов в начале заболевания вирус не выделяется, и в клинических условиях при выявлении IgM к HAV нет необходимости в ПЦР. IgM к HAV обычно проявляются в конце второй недели продромального периода, их уровень остается повышенным до 6 мес. IgG к HAV начинают вырабатываться в то же время, но их уровень остается повышенным спустя годы после инфекции [57].

Поверхностный антиген HBV (HBsAg) — белок на поверхности HBV, образующийся как при остром, так и при хроническом гепатите. Общие антитела к коровому белку (HBcAb) указывают на инфекцию в прошлом или настоящем. IgM к коровому белку образуются при острой инфекции и являются маркером острого HBV. IgG к коровому белку указывают на контакт с HBV в прошлом. На рис. 19.1 показана типичная последовательность серологических маркеров для пациента с острым HBV и в стадии разрешения. HBsAg — первый серологический маркер инфекции, появляющийся уже через неделю после контакта (но обычно через 6–10 недель). Вскоре в крови обнаруживается HBeAg. Через несколько недель после появления HBeAg



**Рис. 19.1.** Типичная последовательность появления серологических маркеров у пациентов с острым и перенесенным гепатитом В. *Источник:* [71] с изм.

и HBsAg наблюдается пик концентрации аминотрансфераз (обычно АЛТ выше, чем АСТ). Приблизительно через 10 нед. после контакта начинают выявляться IgM к коровому белку.

После острого контакта возможны три варианта исходов [26].

1. Выздоровление после перенесенного гепатита В. Проявляется нормализацией АЛТ, клиренсом HBeAg и выработкой антител к HBe, очень низкими или не выявляемыми уровнями ДНК HBV, клиренсом HBsAg и выработкой антител к HBsAg (или поверхностных антител).

2. Состояние неактивного носительства. Поверхностный антиген остается положительным, но АЛТ нормализуется, HBeAg отрицательный, а уровни ДНК HBV очень низкие (<2000 МЕ/мл). Общие коровые антитела положительные, но IgM отрицательные. Важно, что у 4–20% пациентов на этой стадии бывают периодическая реактивация гепатита, когда HBeAg вновь становится положительным [26].

3. Хронический гепатит В. Характеризуется высокими уровнями вирусной нагрузки >2000 МЕ/мл. HBeAg может оставаться положительным, а АЛТ может варьировать между нормальными и аномально высокими уровнями. Когда уровни ДНК HBV очень высоки (>20 000 МЕ/мл), пациенты имеют высокий риск осложнений со стороны печени и передачи инфекции другим лицам. У части пациентов eAg отрицательный из-за мутаций в коровом и прекоровом промотерном участках. Уровень ДНК HBV обычно на 1–2 порядка ниже, чем у HBV eAg+ пациентов. Ключевой признак, позволяющий отличить хронических неактивных носителей от больных с HBV eAg–, — уровень ДНК HBV. Пациенты с показателями ДНК HBV >2000 МЕ/мл считаются HBV eAg– с хронической инфекцией. У 8–12% пациентов с повышенной АЛТ и статусом HBeAg+ в течение года может произойти сероконверсия [26].

Иногда наблюдаются изолированные общие коровые антитела. Существует четыре возможных объяснения этой ситуации: 1) пациент находится в «периоде окна» острой инфекции, когда уже произошел клиренс поверхностного антигена, но поверхностные антитела еще не выработались; 2) имеется хроническая инфекция, но HBsAg не выявляется; 3) инфекция разрешилась, но титры HBsAb слишком низкие; 4) тест на коровые антитела ложноположительный. В большинстве случаев причиной является ложноположительный результат теста или перенесенная ранее инфекция, однако у 20% пациентов выявляется ДНК HBV [58]. В продаже есть много наборов для выявления этих серологических маркеров с высокими чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью. В основе большинства из них — иммунологические или хемилюминесцентные технологии.

Острая инфекция HCV ассоциирована с ранним повышением уровня РНК HCV — через две недели после инфицирования. У 25% пациентов с острым HCV возникает желтуха, ассоциированная с тяжелым гепатитом, повышением уровня АЛТ более 1000 МЕ/мл в первый месяц инфекции. К сожалению, в большинстве случаев инфекция



HCV не имеет характерных симптомов, и пациенты редко попадают к инфекционисту в острой фазе заболевания. У 85% лиц, имевших контакт с HCV, развивается хроническая инфекция [15]. Тестирование на HCV в острых случаях следует проводить методом ПЦР или обнаружения антител к HCV, чтобы выявить активную репликацию вируса и установить, есть ли антитела к HCV ко времени возникновения клинических проявлений. Обычно HCV-антитела выявляются на 12 неделе, и важно проконтролировать их появление как можно раньше, чтобы установить время возникновения инфекции. ПЦР на HCV следует повторить на 4 и 12 неделе, чтобы посмотреть, не произошел ли спонтанный клиренс вируса. Если на 12 неделе после заражения HCV присутствует, необходимо решать вопрос о лечении на этой ранней стадии [59, 60].

Референтные лаборатории могут выявить как IgG, так и IgM к HDV. Интерпретация острой и хронической инфекции не так однозначна, как при HBV — отчасти из-за того, что она может быть результатом коинфекции или суперинфекции HBV. При коинфекции обнаруживаются HBsAg, IgG и IgM-коровые антитела HBV, а также общие и анти-HDV IgM. Если произошел клиренс HDV, общие анти-HDV будут снижаться со временем (рис. 19.2). При острой коинфекции HDV IgM появляются раньше IgG, поэтому наличие только IgM указывает на острую инфекцию HDV. При суперинфекции HDV ключевое различие состоит в том, что IgM отсутствует (HbsAg, общие коровые антитела герпесвирусов), а общие анти-HDV определяются. При хронической инфекции HDV вырабатываются как IgM, так и IgG. Однако при хроническом HDV IgM имеют мономерную форму, а при остром HDV — преимущественно пентамерную [61].

Инфекция HEV имеет такой же инкубационный период, как и HAV (15–60 сут.), и такую же продромальную фазу, за которой следует желтушная фаза. Как и при HAV, симптомы угасают к 6 нед. [62]. Уровни IgM повышаются одновременно с пиком уровня АЛТ и совпадают с исчезновением вируса из крови. IgM к HEV могут



**Рис. 19.2.** Серологическое течение острой инфекции HDV, приобретенной вместе с HBV. Источник: [71] с изм.

оставаться повышенными до 6 мес. после инфекции, а IgG — годами. HEV вызывает фульминантный гепатит в группах риска, особенно у беременных женщин (риск смерти плода при инфекции в последнем триместре) [20].

## РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Резистентность — главная проблема лечения хронического гепатита С. В настоящее время имеется пять препаратов для приема внутрь (ламивудин, адефовир, телбивудин, тенофовир и энтекавир) и два для инъекций (обычный интерферон и связанный с ПЭГ), одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами. Нуклеозидный аналог ламивудин был единственным эффективным препаратом с середины 1990-х гг. (одобрен для лечения HBV в 1998 г.). Ламивудин безопасен, относительно недорог и хорошо переносится даже при длительной терапии. Однако при долговременном приеме этого лекарства часто возникает резистентность: 17–32% при годичной и 67% после четырехлетней терапии [63, 64]. Более того, долговременные исследования показали, что резистентность к ламивудину способствует прогрессированию заболевания печени [65]. При применении других препаратов уровень резистентности ниже, но все равно остается проблемой с учетом большой продолжительности HBV-терапии. Считается, что к развитию резистентности приводят определенные мутации в полимеразе; они хорошо описаны. Для выявления мутаций использовали прямое секвенирование ДНК, линейные зонды и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), но у всех этих методов имеются недостатки. Секвенирование позволяет обнаружить новые мутации, но уже выявляет небольшие изменения по сравнению с линейными зондами [66]. Линейные зонды иногда дают неопределенные результаты, по сравнению с секвенированием у них более низкая специфичность и выявляются только известные мутации. RFLP требует больших трудозатрат и знания правильных эндонуклеаз.

Резистентность вируса гепатита С к интерферону и рибавирину — явление многофакторное (факторы хозяина и вируса). Со стороны хозяина имеют значение раса, возраст, пол, вес, сопутствующая инфекция ВИЧ или другого вирусного гепатита, нарушения иммунной системы, потребление алкоголя, наличие диабета и степень заболевания печени. Вирусные факторы включают в основном генотип и вирусную нагрузку [67]. Хотя в одном исследовании было высказано предположение, что большое количество мутаций в участке NS5A (определяет чувствительность к интерферону) коррелирует с более слабой реакцией на лечение у пациентов, инфицированных генотипом-1 [68], это не нашло подтверждения ни в клинических, ни в молекулярных исследованиях, проводившихся в западных странах [69]. HAV и HEV — самоограничивающиеся инфекции без хронического инфицирования.

## ОЦЕНКА И ОТЧЕТ О РЕЗУЛЬТАТАХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Положительный тест на IgM HAV свидетельствует о недавней инфекции (< 6 месяцев), в то время как отдельный положительный тест на IgG HAV следует интерпретировать как контакт в прошлом или вакцинация с текущим иммунитетом к HAV. Благодаря широкому применению вакцины вспышки острого HAV стали более редкими. Положительные IgM при отсутствии контакта, клинических симптомов или повышения АЛТ следует интерпретировать с осторожностью, поскольку подтверждающего теста на HAV нет и сообщалось о ложноположительных результатах в подобных ситуациях [70]. В США и многих развитых странах острый HAV — заболевание, подлежащее отчетности.

Интерпретация серологических результатов для HBV показана в табл. 19.2. Уровни антител HBs  $\geq 10$  МЕ/мл считаются защитными. На большинстве территорий под юрисдикцией США необходимо сообщать о случаях острого гепатита В, положительного HBsAg у беременных женщин и первичном диагнозе хронического гепатита В у любого пациента.

На рис. 19.3 показан алгоритм тестирования и отчета о результатах. Первый скрининговый тест на HCV — ИФА. Результаты ИФА интерпретируются по сравнению оптической плотности образца со стандартом. Образец считается положительным, если соотношение сигнал/граница пропускания, s/co  $\geq 1$  и отрицательным, если  $< 1$ . Образцы с соотношением чуть больше 1, скорее всего, ложноположительные. Проведенное в центре по контролю и профилактике заболеваний исследование показало, что образцы с соотношением  $> 3,8$  окажутся положительными при подтверждающем тестировании с вероятностью 95% или больше [34]. Положительный результат на антитела в HCV у пациентов из группы риска свидетельствует о контакте с HCV в прошлом. Поскольку у 15–25% лиц бывает клиренс HCV, рекомендуется подтверждающий чувствительный тест на РНК HCV (Ampligor или ПЦР-РВ). При положительном результате считают, что у пациента хроническая инфекция HCV — состояние, подлежащее отчетности. Может возникнуть слабая или транзиторная вирусемия, поэтому рекомендуется провести тест на нуклеиновые кислоты через 6–12 мес. Рекомбинантный иммуноблот используется нечасто, но может сыграть роль в диагностике пациентов из группы высокого риска с положительным ИФА, но отрицательным тестом на нуклеиновые кислоты. В таких случаях положительный результат рекомбинантного иммуноבלота может указывать на перемежающуюся вирусемию, и через 6–12 мес. надо провести новое тестирование на нуклеиновые кислоты.

Выявление общих анти-HDV указывает на инфекцию HDV. У пациентов с разрешившейся инфекцией могут быть низкие или невыявляемые уровни общих анти-HDV. IgM к HDV можно обнаружить как при острой, так и при хронической инфекции, хотя в разных формах (см. выше). Исчезновение HDV IgM коррелирует с разреше-

нием хронической инфекции HDV. Тесты ПЦР используются преимущественно для отслеживания реакции на противовирусную терапию. Для HDV не существует специфического лечения; лечение нацелено на контроль репликации HBV и ингибирование выработки sAg HBV, необходимого для репликации HDV.

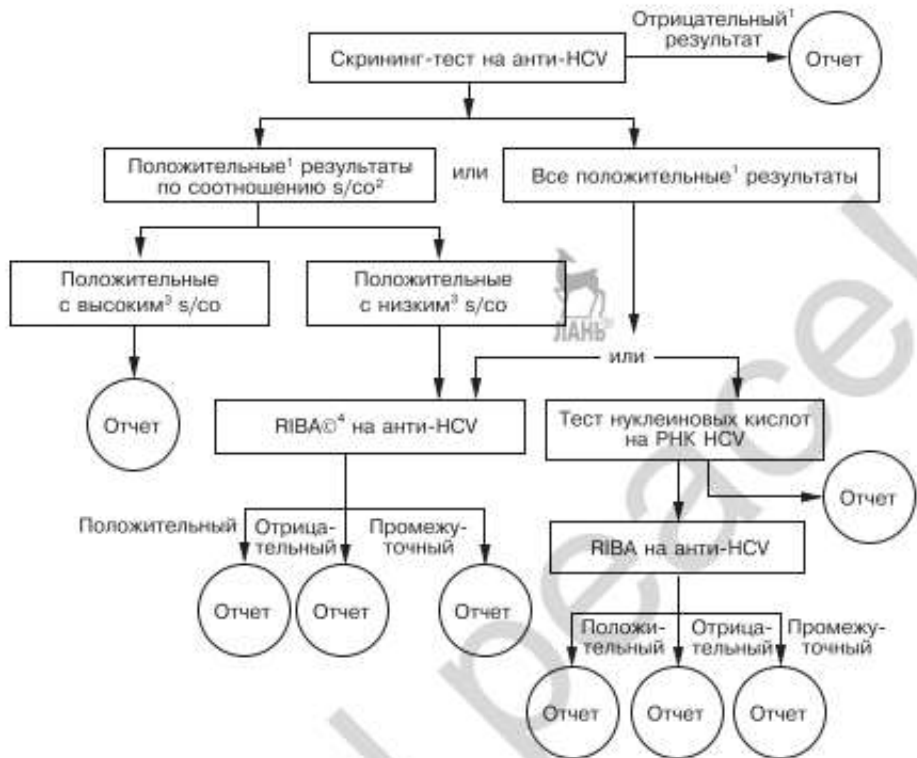
Положительный результат теста на IgM к HEV свидетельствует об острой инфекции HEV. Эта высокочувствительная и специфичная проба — метод выбора при диагностике в странах с низкой распространенностью, таких как США, и в эндемичных странах. Для стран с ограниченными ресурсами сейчас доступен быстрый тест для небольших медицинских пунктов.

Таблица. 19.2

## Интерпретация серологических тестов на HBV

Тесты	Результаты	Интерпретация	
HBsAg	Отрицательный	Подозрительный	
Анти-HBc	Отрицательный		
Анти-HBс	Отрицательный		
HBsAg	Отрицательный	Иммунный после перенесенной инфекции	
Анти-HBc	Положительный		
Анти-HBс	Положительный		
HBsAg	Отрицательный	Иммунный после вакцинации против гепатита В	
Анти-HBc	Отрицательный		
Анти-HBс	Положительный		
HBsAg	Положительный	Острая инфекция	
Анти-HBc	Положительный		
IgM анти-HBc	Положительный		
Анти-HBс	Отрицательный		
Анти-HBс	Отрицательный		
HBsAg	Положительный	Хроническая инфекция	
Анти-HBc	Положительный		
IgM анти-HBc	Отрицательный		
Анти-HBс	Отрицательный		
Анти-HBс	Отрицательный		
HBsAg	Отрицательный	Интерпретация затруднена; возможны четыре варианта.	
Анти-HBc	Положительный		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Инфекция разрешилась, но титры анти-HBс низкие (чаще всего).</li> <li>2. Ложноположительный анти-HBc (подозрительный).</li> <li>3. «Слабая» хроническая инфекция, HBsAg не выявляется.</li> <li>4. Разрешающаяся острая инфекция, «период окна» (когда HBsAg выведен)</li> </ol>
Анти-HBс	Отрицательный		

Источник: [72]



**Рис. 19.3.** Алгоритм лабораторного тестирования на антитела к вирусу гепатита С (анти-НСV) и отчета о результате

<sup>1</sup> Интерпретация результатов скрининг-иммунотеста по критериям производителя.

<sup>2</sup> Сигнал  $s/co$ .

<sup>3</sup> Положительные результаты скрининг-теста считаются с высоким отношением  $s/co$ , если оно равно или больше установленного значения, которое предсказывает у всех тестируемых групп; положительные результаты скрининг-теста считаются с низким отношением  $s/co$ , если меньше этого значения.

<sup>4</sup> Рекомбинантный иммуноблоттинг. Источник: [34]

## ЛИТЕРАТУРА

- Centers for Disease Control. Disease burden from hepatitis A, B and C in the United States. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/index.htm>.
- Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006; 144:705–714.
- Margolis HS, Coleman PJ, Brown RE, et al. Prevention of hepatitis B virus transmission by immunization: An economic analysis of current recommendations. *JAMA* 1995; 274:1201–1208.
- Lemon SM, Jansen RW, Brown EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine* 1992; 10:S40–S44.

5. Ping LH, Jansen RW, Stapleton JT, et al. Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8281–8285.
6. He LF, Alling D, Popkin T, et al. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156:636–640.
7. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, et al. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996; 23:366–371.
8. Farci P. Delta hepatitis: An update. *J Hepatol* 2003; 39:S212 — S219.
9. Bradley DW, Purdy MA, Reyes GR. Hepatitis E genome. Molecular features, expression of immunoreactive proteins and sequence divergence. *J Hepatol* 1991; 13:S152 — S154.
10. Bialek SR, Thoroughman DA, Hu D, et al. Hepatitis A incidence and Hepatitis A vaccination among American Indians and Alaska Natives, 1990–2001. *Am J Public Health* 2004; 94:996–1001.
11. Vogt TM, Wise ME, Bell BP, et al. Declining hepatitis A mortality in the United States during the era of hepatitis A vaccination. *J Infect Dis* 2008; 197:1282–1288.
12. Vento S, Garofano T, Renzini C, et al. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 338:286–290.
13. Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterol* 1993; 104:955–963.
14. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337:1733–1744.
15. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41–52.
16. Davis GL, Albright JE, Cook SF, et al. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl* 2003; 9:331–338.
17. Wise M, Bialek S, Finelli L, et al. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995–2004. *Hepatology* 2008; 47:1128–1135.
18. Saracco G, Rosina F, Brunetto MR, et al. Rapidly progressive HBVAg-positive hepatitis in Italy: The role of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol* 1987; 5:274–281.
19. Horvat RT, Tegtmeier GE. Hepatitis B and D viruses. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, Vol. 2. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007:1641–1659.
20. Khuroo MS, Rustgi VK, Dawson GJ, et al. Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *J Med Viro* 1994; 43:281–286.
21. Zhuang H, Cao XY, Liu CB, et al. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26 (suppl 3):135–138.
22. Prati D, Taioli E, Zanella A, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002; 137:1–10.
23. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347:168–174.
24. Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295:65–73.
25. Pooje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *JAMA* 2006; 130:678–686.
26. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45:507–537.

27. Sum SS, Wong DK, Yuen JC, et al. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. *J Med Virol* 2005; 77: 486-490.
28. Garbuglia AR, Angeletti C, Lauria FN, et al. Comparison of Versant HBV DNA 3.0 and COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan assays for hepatitis B DNA quantification; Possible clinical implications. *J Virol Methods* 2007; 146:274-280.
29. Ronsin C, Pillet A, Bali C, et al. Evaluation of the COBAS AmpliPrep-total nucleic acid isolation COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) quantitative test and comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1390-1399.
30. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Laperche S, et al. Performance of the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1716-1723.
31. Konnick EQ, Erali M, Ashwood ER, et al. Evaluation of the COBAS AmpliCor HBV Monitor assay and comparison with the ultrasensitive HBV Hybrid Capture 2 assay for quantification of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2005; 43:596-603.
32. Colin C, Lanoir D, Touzet S, et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: An analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001; 8:87-95.
33. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:43S - 47S.
34. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52:1-15.
35. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: A systematic review. *JAMA* 2007; 297:724-732.
36. Nolte FS, Fried MW, Shiffman ML, et al. Prospective multicenter clinical evaluation of AMPLICOR and COBAS AMPLICOR hepatitis C virus tests. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4005-4012.
37. Ross RS, Viazov S, Hoffmann S, et al. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal* 2001; 15:308-313.
38. Elbeik T, Surtihadi J, Destree M, et al. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA). *J Clin Microbiol* 2004; 42:563-569.
39. Morishima C, Chung M, Ng KW, et al. Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2004; 42:421-425.
40. Smedile A, Ciancio A, Rizzetto M. Hepatitis D virus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical virology*. Washington, DC: ASM Press, 2002:1227-1240.
41. Yamashiro T, Nagayama K, Enomoto N, et al. Quantification of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis* 2004; 189:1151-1157.
42. Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: Relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 2006; 44:728-735.
43. Gripon P, Rumin S, Urban S, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15655-15660.

44. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623–626.
45. Binn LN, Lemon SM, Marchwicki RH, et al. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. *J Clin Microbiol* 1984; 20:28–33.
46. Divizia M, Gabrieli R, Degener AM, et al. Evidence of hepatitis E virus replication on cell cultures. *New Microbiol* 1999; 22:77–83.
47. Robertson BH, Averhoff F, Cromaris TL, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 2000; 62:144–150.
48. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47:289–309.
49. Janssen HLA, van Zonneveld M, Senturk H, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudien for HBsAg-positive chronic hepatitis B: A randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123–129.
50. Chan HL, Hui AY, Wong ML, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53:1494–1498.
51. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, et al. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: Preponderance of genotype F. *J Infect Dis* 2007; 195:5–11.
52. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20:103–126.
53. Lau JY, Davis GL, Prescott LE, et al; Hepatitis Interventional Therapy Group. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. *Ann Intern Med* 1996; 124:868–876.
54. Fried MW, Shiffman ML, Reddy R, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975–982.
55. Hadziyannis SJ, Sette HJ, Morgan TR, et al. Peginterferon-a2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 2004; 140:346–355.
56. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, et al. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 1985; 122:226–233.
57. Zuckerman AJ. The clinical and laboratory features of acute hepatitis in the Royal Air Force. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 1965; 24:340–346.
58. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis* 2004; 8:267–281.
59. Licata A, Di Bona D, Schepis F, et al. When and how to treat acute hepatitis C? *J Hepatol* 2003; 39:1056–1062.
60. National Institutes of Health. National Institutes of Health consensus development conference statement: Management of hepatitis C; 2002. *Hepatology* 2002; 5:S1–S20.
61. Macagno S, Smedile A, Caredda F, et al. Monomeric (7S) immunoglobulin M antibodies to hepatitis delta virus in hepatitis type D. *Gastroenterol* 1990; 98:1582–1586.
62. Mast EE, Krawczynski K, Purdy MA. Hepatitis E: An overview. *Annu Rev Med* 1996; 47:257–266.



63. Chang TT, Lai CL, Chien RN, et al. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:1276–1282.
64. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341:1256–1263.
65. Liaw Y-F, Sung JY, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351:1521–1531.
66. Olivero A, Ciancio A, Abate ML, et al. Performance of sequence analysis, INNO-LiPA line probe assays and AFFIGENE assays in the detection of hepatitis B virus polymerase and precore/core promoter mutations. *J Viral Hepat* 2006; 13:355–362.
67. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 349:825–832.
68. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutation in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77–81.
69. He Y, Katze MG. To interfere or to anti-interfere: The interplay between hepatitis C and interferon. *Viral Immunol* 2002; 15:95–119.
70. Centers for Disease Control. Positive test results for acute hepatitis A virus infection among persons with no recent history of acute hepatitis — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54:453–456.
71. CDC. <http://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/Professionals/Training/Serology/training.htm#one>. Accessed December 7, 2009.
72. <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/HBVfaq.htm#general>. Accessed December 7, 2009.



**Й.Х. Кун**

Jens H. Kuhn, NIAID Integrated Research Facility at Fort Detrick (IRF-Frederick), Fort Detrick, Frederick, Maryland, and Tunnell Consulting, Inc., King of Prussia, Pennsylvania, U.S.A.

**П.Б. Ярлинг**

Peter B. Jahrling, NIAID Integrated Research Facility at Fort Detrick (IRF-Frederick), Fort Detrick, Frederick, Maryland, U.S.A.

**Ш.Р. Радошицки**

Sheli R. Radoshitzky, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, U.S.A.

**ВВЕДЕНИЕ**

Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) — это острые клинические синдромы, вызванные разнообразными вирусами, которые обладают особой вазотропностью. Капилляропатии, нарушения свертываемости, лихорадка, геморрагии и высокая смертность являются характерными клиническими проявлениями ВГЛ [1, 2]. Геморрагии обычно возникают в результате повышения проницаемости сосудистого эндотелия или, возможно, разрушения его при репликации вируса. В противоположность широко распространенному представлению, геморрагии почти никогда не бывают достаточно тяжелыми, чтобы вызвать гиповолемию, угрожающую жизни [3]. Летальный исход болезни обычно оказывается прямым следствием нарушенных реакций врожденного иммунного ответа [4]. Дендритные клетки, которые, возможно, представляют собой первичные мишени большинства возбудителей ВГЛ, быстро теряют активность. Лимфоциты подвергаются массовому апоптозу, инфицированные макрофаги и другие клетки высвобождают избыток разнообразных цитокинов [5]. В результате все эти процессы совместно приводят к снижению иммунного ответа на инфицированные клетки, нарушению функции сосудов. В результате коагулопатии, вызванной закупоркой микрососудов, в органах развиваются очаговые некрозы и смерть наступает из-за полиорганной недостаточности [6].

Возбудители ВГЛ человека относятся к оболочечным одноцепочечным РНК-вирусам четырех семейств: *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* и *Filoviridae* [7]. За исключением вируса денге, вирусы, вызывающие ВГЛ, имеют ярко выраженную эндемичность, что создается условиями поддержания популяции членистоногих, грызу-

нов, насекомоядных и рукокрылых, которые служат их хозяевами [2]. Инфицирование человека обычно происходит при прямом контакте с инфицированным хозяином (укусы, царапины, употребление зараженного мяса) или при контакте с продуктами экскреции и секрети (вдыхание воздуха или контакт с поверхностями, зараженными свежими или высохшими мочой и фекалиями) [6]. Передача вирусов между людьми обычно происходит при прямом контакте или при использовании общих вещей и принадлежностей, в то время как аэрозольная передача возбудителей ВГЛ при естественных вспышках редка. ВГЛ может быть и зоокомиальной инфекцией, особенно в развивающихся странах, где сложно наладить режим дезинфекции, изоляцию, правильное и своевременное лечение больных и распространение одноразовых предметов медицинского назначения [6].

Этиология ВГЛ изучена во многих странах, однако развитие воздушного транспорта и рост популяции людей в зонах распространения ВГЛ повышает риск непредсказуемого переноса возбудителей и их распространение в эндемичных зонах. Особенно важно то, что большинство возбудителей ВГЛ потенциально могут быть использованы для создания биологического оружия, поскольку они легко наращиваются в культуре тканей до относительно высоких титров, достаточно стабильны и высоко инфекционны в виде аэрозолей, вызывают высокую заболеваемость и смертность в популяциях-мишенях [8].

Общий прогресс в исследованиях возбудителей ВГЛ затруднен, поскольку многие из них классифицированы как возбудители III—IV групп патогенности (по классификации ВОЗ), что требует высокой степени защиты при работе с ними в лабораторных условиях (в США: BSL-3 и BSL-4) [9]. Для большинства возбудителей ВГЛ отсутствуют лицензированные FDA вакцины, а лечение симптоматическое. Хотя в настоящее время существуют и становятся все более доступными специфичные и чувствительные диагностические тесты, диагностика ВГЛ в повседневной практике осложняется тем, что в начале клинических проявлений эти заболевания во многом схожи с другими инфекционными болезнями, такими как шигеллез и малярия [6].

В этой главе будет представлен обзор основных характеристик возбудителей ВГЛ человека и специфичных диагностических тестов, которые соответствуют требованиям BSL-4 в США [9].

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

### Ареновирусная геморрагическая лихорадка

Семейство *Arenaviridae* состоит из одного рода *Arenavirus*, который включает по крайней мере 30 видов [10–12]. Серологически и генетически ареновирусы группируются в две филогенетических линии, которые обычно связывали с ареновирусами Старого Света и Нового Света [10, 11, 13, 14]. Последняя группа затем подразделилась

на четыре клады А, В, А/Rec и С. Аренавирусные геморрагические лихорадки вызываются двумя аренавирусами Старого Света (Ласса, и Луйо) и пятью аренавирусами клады В патогенов Нового Света (Чапаре, Хунин, Мачупо, Гуанарито и Сабия) [10–14]. Вирусы хронически инфицируют определенных грызунов надсемейства *Muroidea* (хозяева аренавирусов Старого Света — семейство мышинные (*Muridae*), аренавирусов Нового Света — хомякообразные (*Cricetidae*) без развития выраженных клинических симптомов, географическое распространение аренавирусов определяется районом обитания этих грызунов. Вспышка аренавирусной геморрагической лихорадки обычно бывает связана с какими-то пертурбациями в экосистеме, при которых человек входит в контакт с грызунами или продуктами их секрета и экскреции. Этот путь передачи объясняет, почему рабочие ферм входят в группу риска заболевания аренавирусными инфекциями.

### Аренавирусные геморрагические лихорадки Старого Света

Лихорадка Ласса, вызванная вирусом Ласса (LASV), была первоначально описана в 1969 г., когда в Лассе (Нигерия) заболела американская медсестра-миссионер, а затем началась цепь нозокомиального инфицирования, которая распространилась от работников учреждения здравоохранения в Африке к сотрудникам лаборатории в США [15]. Последующие вспышки лихорадки Ласса происходили повсюду в Западной Африке (Либерия, Республика Гвинея, Сьерра-Леоне), и можно было проследить развитие этих вспышек от первоначального хозяина вируса, африканской многососковой крысы *Mastomys natalensis* (другое название *Praomys natalensis*). Примерно 100–500 тыс. человек инфицируются LASV каждый год. Из них от 5 до 10 тыс. умирают и примерно 30 тыс. страдают от длительных осложнений, например глухоты [16, 17]. Лихорадка Ласса случайно была перенесена путешественниками из Западной Африки в Канаду, Европу, Японию и США [18–22], но в большинстве случаев это были единичные заболевания, хотя и фатальные, но без передачи от человека к человеку.

Вирус Луйо — недавно выявленный аренавирус, который относится к ветви предшествующего колена аренавирусов Старого Света. Он был открыт в 2008 г. у больного из Замбии, который заразил еще четверых медиков в больнице в Южной Африке. Четверо из пяти инфицированных погибли [12, 23].

### Аренавирусные геморрагические лихорадки Нового Света

Случаи аргентинской (Хунин) геморрагической лихорадки (АНФ) были описаны впервые в Аргентине в 1955 г. [24]. Вирус Хунин (JUNV), возбудитель заболевания [25], паразитирует в перуанском вечернем хомячке *Calomys musculus* [26]. АНФ — сезонное заболевание, пик приходится на время сбора урожая кукурузы в Аргентине. Возбудитель обычно попадает в организм человека при вдыхании аэрозоля

крови грызунов, попавших в машины при механизированной уборке кукурузы, случаи прямой передачи от человека к человеку редки [27]. Описано примерно 30 тыс. случаев АНФ, но после распространения живой аттенуированной вакцины (не утвержденной FDA) частота заболеваний упала до менее чем 100 случаев за год. В отсутствие ухода и лечения летальность достигает 20% [28].

Боливийская геморрагическая лихорадка (Мачупо), ВНФ, обнаружена у людей в 1959 г. в Боливии. Возбудитель, вирус Мачупо (MACV), был выделен от пациента и от большого изъясного вечернего хомячка *Calomys callosus* без признаков болезни [29]. Между 1962 и 1964 гг. были инфицированы более 1000 человек, из них 180 умерли. Ограничение численности и распространения *Calomys callosus* привело к прекращению вспышек [30]. Передача MACV происходит главным образом через пищу и воду, зараженные продуктами экскреции грызунов во время сезона сбора урожая. Передача от человека к человеку нетипична.

Вирус Гуанарито (GTOV) был обнаружен в 1989 г. во время вспышки «Венесуэльской геморрагической лихорадки», сильно распространенной среди переселенцев, которые передвигались в очищенные от леса области Венесуэлы. К 1991 г. было получено 104 сообщения о заболевании, 25% из которых закончились гибелью людей [31, 32]. Основным хозяин GTOV — хлопчатниковая крыса (*Sigmodon alstoni*). Как в случае JUNV, инфекция наблюдалась преимущественно у сельскохозяйственных работников во время сезона сбора урожая. Последняя вспышка произошла в 2002 г., а начиная с 1989 г. общее количество жертв GTOV составило около 200 человек [26, 33].

Вирус Сабиа (SABV) вызвал один смертельный случай «бразильской геморрагической лихорадки» в Бразилии в 1990 г., за которым последовали два случая лабораторного заражения без смертельного исхода в Бразилии в 1992 и в США в 1994 гг. [35]. Носитель SABV неизвестен.

Вирус Чапаре был причиной небольшой вспышки ВГЛ в Боливии в 2003 г. Первые данные позволяют предположить, что этот вирус, хозяин которого неизвестен, наиболее близок к SABV [14].

## Буньявирусные геморрагические лихорадки

Семейство Bunyaviridae содержит пять родов — *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* и *Tospovirus* и более 100 видов [36]. Причиной вспышек ВГЛ могут быть вирусы всех видов, за исключением *Tospovirus*. Тем не менее только один найровирус, Конго-Крымской геморрагической лихорадки, относится к IV группе патогенности по классификации ВОЗ.

### Конго-Крымская геморрагическая лихорадка

Первое описание Конго-Крымской геморрагической лихорадки датируется 1945 г., когда советские исследователи описали необычное

количество смертельных случаев у военнослужащих и сельского населения в степной области западного Крыма [37]. Похожая болезнь была отмечена у детей в Бельгийском Конго в 1956 г., и позже было установлено, что она была вызвана тем же вирусом, который получил название вирус Конго-Крымской лихорадки (СCHFV) [38]. СCHFV эндемичен для Азии, Восточной Европы, Среднего Востока и Центральной и Южной Африки [39], где преимущественно передается при укусах клещей (*Hyalomma* sp.), путем контакта с инфицированными животными или продуктами животноводства, а также через кровь или секреты инфицированных людей [39]. СCHFV часто становится возбудителем вспышек нозокомиальной инфекции в больницах.

### Флавивирусные геморрагические лихорадки

По крайней мере восемь флавивирусов (семейство *Flaviviridae*, род *Flavivirus*) могут вызывать заболевания человека, среди них вирусы денге 1–4 и вирус желтой лихорадки. Три вируса — вирус геморрагической лихорадки Алхурма (АНФV), болезнь кьясанурского леса (KFDV) и омская геморрагическая лихорадка (ОНФV) относятся к IV группе патогенности по классификации ВОЗ [40].

КНФV — заболевание, эндемичное для индийского штата Карнатака, где оно было обнаружено в 1957 г., после эпизоотической ВГЛ среди длиннохвостых лангуров (*Semnopithecus entellus*) и макак боннет (*Macaca radiata*) [41], и, возможно, для Китая [42]. KFDV передается преимущественно клещами вида *Haemaphysalis spingera* грызунам, насекомоядным, птицам и человеку [43]. В период между 1999 и 2004 гг. KFDV было инфицировано примерно 2500 человек, летальность составила от 2 до 10% [43].

Вирус АНФV был выделен в 1995 г. в Саудовской Аравии от больных ВГЛ [44] и оказался близок к KFDV [45]. Вероятно, вирус постоянно поддерживается в популяции аргасовых клещей (*Ornithodoros savignyi*) [46]. Инфицирование человека происходит после контаминации повреждений на коже кровью инфицированных овец или верблюдов и путем употребления в пищу непастеризованного зараженного молока. К настоящему времени описано примерно 20 случаев инфицирования человека с летальностью более 30% [46].

Заболевание ОНФV эндемично для небольшой области вокруг Омска, оно передается клещами *Derma-centor reticulatus*, паразитирующими на водяных крысах (*Arvicola terrestris*) и ондатрах (*Ondatra zibethica*) [47, 48]. Люди инфицируются при укусах клещей, контакте с продуктами экскреции инфицированных животных, употреблении молока от инфицированных животных [47, 48]. Омская геморрагическая лихорадка имеет летальность менее 3%.

### Филовирусные геморрагические лихорадки

Семейство *Filoviridae* состоит из двух родов: *Marburgvirus* и *Ebolavirus*; пять из шести филовирусов — марбургвирус Виктория (MARV),

Бундибугио эболавирус (BEBOV), эболавирус Кот-д'Ивуара (CIEBOV), суданский эболавирус (SEBOV) и заирский эболавирус (ZEBOV) — вызывают ВГЛ человека, которые летальны в 72% случаев [49, 50]. MARV был выделен в 1967 г. у сотрудников лаборатории и ветеринаров, работавших с ВГЛ в Германии и Югославии [51–53]. Изучение путей распространения инфекции привело к больным, употреблявшим мясо инфицированных зеленых марышек (*Chlorocebus sabaeus*) в Уганде. SEBOV и ZEBOV были открыты в 1976 г. в течение практически одновременных вспышек заболевания среди людей в Судане и Заире (сейчас Демократическая Республика Конго) [54]. SEBOV был причиной развития двух эпизоотий со смертельными исходами у шимпанзе западной Африки (*Pan troglodytes*) и одного случая инфицирования человека (нелетального) в Кот-д'Ивуаре в 1994 г. [55]. Наконец, BEBOV был описан в 2007 г. в Уганде [50], но детальное эпидемиологическое описание до настоящего времени не опубликовано. Таким образом, можно видеть, что филовирусы вызвали примерно 3000 случаев заболевания человека [49] и, вероятно, погубили десятки тысяч высших приматов [56]. Естественные хозяева флавивирусов остаются неизвестными, хотя недавно были получены данные, подтверждающие гипотезу о том, что основными естественными хозяевами могут быть плоядядные летучие мыши [57].

## КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

### Лихорадка Ласса

LASV вызывает широкий спектр заболеваний — от субклинических до летальных. Средняя продолжительность инкубационного периода лихорадки Ласса составляет 2–16 сут. Первые симптомы неспецифичны и напоминают симптомы гриппа. У больных часто возникает лихорадка (иногда двухфазная) с болью в суставах, головной и мышечной болью, дискомфортом и общей слабостью. Затем появляется конъюнктивит, боль в горле, кашель, боль за грудиной, пневмония, боль в эпигастрии, тошнота, рвота и понос. Примерно в 30% случаев появляется эритема на щебе, задней стенке горла и миндалинах. У некоторых пациентов на поздних стадиях остро текущего заболевания появляется покраснение лица и тела, петехии, сыпь, подкожные кровоизлияния, желудочно-кишечные и урогенитальные кровотечения. Со стороны центральной нервной системы симптомы обнаруживаются редко, они включают неясное зрение, дезориентацию, головокружение, судороги, припадки и коматозное состояние и указывают на неблагоприятный прогноз. Алопеция, утомление, шум в ушах и частичная или общая глухота — типичные для лихорадки Ласса осложнения у переболевших. Глухота часто сохраняется после выздоровления. Смерть наступает от шока, брадикардии и гипотензии, дыхательной недостаточности или остановки сердца. Лихорадка Ласса часто протекает острее у беременных женщин, часто приводя к смерти матери

и плода. К биохимическим признакам относится повышение уровней креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы [15, 58, 59].



### **Ареновирусные геморрагические лихорадки Нового Света**

Клинические проявления ареновирусных геморрагических лихорадок Нового Света возникают остро и схожи между собой [60, 61]. Субклиническое течение инфекции наблюдается редко. Инкубационный период составляет от 1 до 2 нед., с последующим постепенным нарастанием лихорадки, дискомфорта, слабости, головной боли, мышечной боли, боли в эпигастральной области и анорексии, которые продолжаются несколько дней. Затем развивается боль в пояснице, ретроорбитальные боли, сопровождающиеся светобоязнью, головокружением, кашлем, запорами или умеренным поносом. В течение второй недели болезни у 15–30% пациентов развиваются геморрагические и неврологические симптомы, включая кровоточивость слизистых оболочек, петехии и сыпь, а также кровотечения из мест уколов, кровавый понос, кровавую рвоту, повышенную раздражительность, сонливость, тремор рук и языка, судороги, делирий и кому. Смерть наступает от шока через 7–12 сут. после начала болезни. Выздоровление может продолжаться в течение недель и осложниться тошнотой, слабостью, головокружением, глухотой и алопецией. Гематологические нарушения у больных острой формой характеризуются лейкопенией, тромбоцитопенией и иногда признаками диссеминированного внутрисосудистого свертывания [33, 34, 62, 63].

### **Конго-Крымская геморрагическая лихорадка**

Конго-Крымская геморрагическая лихорадка развивается в четыре фазы (инкубационный период, прегеморрагическая фаза, геморрагическая фаза, выздоровление). Инкубационный период составляет от 1 до 9 сут. в случае укуса клеща и от до 5 до 9 сут. при попадании инфицированной крови на поврежденную кожу. Начало прегеморрагической фазы острое, проявляется неспецифическими симптомами в виде лихорадки, головной боли, головокружения, боли в мышцах, светобоязни, тошноты, боли в горле, конъюнктивита, диареи с острыми абдоминальными болями. Большинство больных затем выздоравливают, и, таким образом, эти случаи остаются недиагностированными. У других заболевших лихорадка переходит в геморрагическую фазу, которая начинается на 5–7 день после начала болезни. Конго-Крымская геморрагическая лихорадка — ВГЛ с наиболее острым проявлением геморрагического синдрома. Помимо петехий типичны обширные гематомы, а также желудочно-кишечные и мозговые кровоизлияния, кровавая рвота, кровохарканье, маточные кровотечения, кровавый понос и гематурия. Гепатомегалия в отсутствие желтухи и спленомегалия относятся к наиболее типичным проявлениям, на которые следует обязательно обратить внимание при обследова-



нии больного. Смерть наступает на 5–14 сут. после начала болезни, а в случае выздоровления иногда остается лабильность пульса, тахикардия и слабость [64, 65].

### **Геморрагическая лихорадка Алхурма, болезнь кьясанурского леса и омская геморрагическая лихорадка**

Болезнь кьясанурского леса начинается с резкого приступа лихорадки с мышечными и головной болями, лимфаденопатией, ретроорбитальной болью, конъюнктивитом и везикулярными высыпаниями на верхнем небе после инкубационного периода, который продолжается от 3 до 8 дней. Геморрагические проявления возникают уже на 3 сут. после начала болезни и включают желудочно-кишечные кровотечения, меноррагии, петехии, розовую сыпь, подкожные кровоизлияния и носовые кровотечения. Поражение ЦНС проявляется тремором, изменением рефлексов, спутанным сознанием, геми- и парапарезом, часто наступает кома. Геморрагическая лихорадка Алхурма и омская геморрагическая лихорадка в целом имеют ту же клиническую картину, хотя у больных, инфицированных вирусом геморрагической лихорадки Алхурма, наблюдается более выраженная артралгия и тромбоцитопения. У больных омской геморрагической лихорадкой часто возникают симптомы бронхопневмонии и лихорадки, но отсутствуют симптомы поражения ЦНС.

### **Филовирусные геморрагические лихорадки**

Клинические признаки марбургвирусной и эболавирусной лихорадки очень похожи и развиваются в две фазы [49]. После инкубационного периода продолжительностью от 3 до 7 дней больные сначала ощущают гриппоподобные симптомы, включая анорексию, артралгию и астению, боли в животе и пояснице, лихорадку, диарею, головную боль, увеличение лимфатических узлов, миалгию, тошноту, жар и рвоту. Макулопапулезная кожная сыпь на лице, ягодицах, туловище или руках обычно возникает примерно через семь дней и позже генерализуется и покрывает практически все тело. Затем больные выздоравливают, часто с осложнениями, такими как алопеция, продолжительная потеря веса, артралгия, конъюнктивит, снижение зрения и слуха, нарушение чувствительности, паротит, психозы, орхит, перикардит. Другой путь развития заболевания — переход во вторую фазу, которая характеризуется анурией, икотой, выраженной одышкой, геморрагическим симптомом (кровотечение из десен, кровохарканье, кровавая рвота, кровавый понос и гематурия). Неврологические симптомы возникают редко и проявляются спутанностью сознания, судорогами, менингизмом, шумом в ушах, снижением и потерей слуха, внезапно возникающей билатеральной слепотой или нарушением чувствительности. Распространены вторичные бактериальные или микотические инфекции. Смерть наступает на 8–16 сут. в результате инфекционного шока и полиорганной недостаточности [68–70]. Клинические биохимические

мические показатели характеризуются повышением уровня аспаратаминотрансферазы, глутаминпируваттрансаминазы, глутаминдегидрогеназы, сорбитдегидрогеназы и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, что свидетельствует о повреждении печени. Уровень креатинина и мочевины повышается при нарушении функции почек, в результате диареи и рвоты развивается гипокалиемия. Лейкопения со сдвигом формулы влево в сторону гранулоцитов в сочетании с резкой тромбоцитопенией характерна для первых дней заболевания. Вторая клиническая стадия характеризуется лейкоцитозом и снижением уровня факторов свертывания, удлинением тромбинового и кефалинового времени, что указывает на развитие ДВС-синдрома [49, 68–71].

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Ареновирусы

Ареновирусы — круглые или полиморфные частицы от 50 до 300 нм в диаметре. Их неинфекционный двусмысловой одноцепочечный РНК-геном содержит два сегмента. Каждый сегмент кодирует два белка. Малый, или S-сегмент, (~3,5 т. п. н.) кодирует нуклеопротеин NP и белок-предшественник гликопротеина шипов вирусной оболочки GPC. Большой L-сегмент (~7,2 т. п. н.) кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу L и матриксный белок Z [72]. GPC принимает участие в процессинге трех белков, ассоциированных с поверхностью вириона SSP, GP1, GP2 [73, 74], и содержит наиболее важные эпитопы антител. Репликация ареновируса происходит исключительно в цитоплазме [72], где вирусные РНК могут быть легко определены методом ПЦР (см. ниже).

### Вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки

Частицы вируса CCHFV сферичные или полиморфные, их диаметр ~80–120 нм. Они содержат трехсегментный геном с «+»-цепями (~18 т. п. н.), которые неинфекционны. Малая РНК (S) кодирует нуклеопротеин NP, средняя (M) РНК кодирует два белка шипов G<sub>n</sub> и G<sub>c</sub> и неструктурированный белок (NS<sub>m</sub>), а большая (L) РНК кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу L [75]. В диагностических целях обычно используются NP и белки шипов.

### Флавивирусы

Флавивирусы представляют собой сферические частицы 50 нм в диаметре. Они содержат инфекционную моночастицу и «+»-цепь РНК (~11 т. п. н.), кодирующую один полипротеин, который во время или после трансляции расщепляется на три структурных белка С, р<sub>g</sub>M и E, а также семь неструктурных белков [40, 45, 76]. Белок E представляет собой поверхностный белок шипов флавивирусов и преимущественно находится на поверхности. Репликация флавивирусов

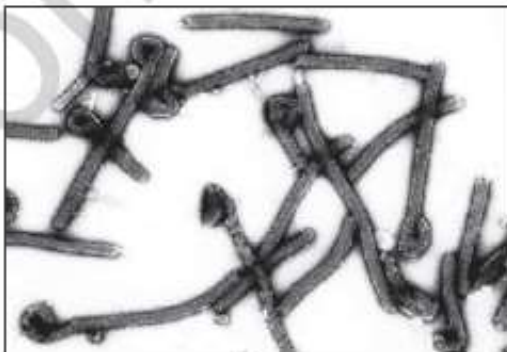
осуществляется в цитоплазме. Вирионы собираются в эндоплазматическом ретикулуме и затем высвобождаются из клетки путем экзоцитоза [40, 77].

### Филовирусы

Филовирионы — единственные филаментарные вирусы человека, что позволяет идентифицировать их при помощи электронного микроскопа (рис. 20.1). Частицы часто имеют вид тора, подковы или шестерки длиной 795–1086 нм и примерно 80 нм в диаметре [78]. Геном филовирусов (~19 т. п. н.) представляет собой одноцепочечную «-»-цепь РНК, которая неинфекционна и содержит семь генов [49]. Филовирусный геном кодирует семь структурных белков: нуклеопротеин (NP), кофактор полимеразы (VP35), матриксный белок VP40, предшественник белка шипов (preGP), фактор транскрипции (VP30), вторичный матриксный белок (VP24) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) [80]. В отличие от вируса Марбург вирусы Эбола синтезируют два дополнительных неструктурных белка GP — sGP и ssGP. Предшественник preGP проходит посттрансляционное расщепление на субъединицы GP<sub>1</sub> и GP<sub>2</sub>, они остаются ассоциированными в виде гетеродимера, который затем тримеризуется и экспонируется на поверхности вириона [82].

### КЛИНИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК

ВГЛ следует принимать во внимание при обследовании пациентов с острым лихорадочным состоянием и сосудистыми нарушениями (кровяное давление ниже нормального, постуральная гипотензия,



**Рис. 20.1.** Частицы вируса Эбола из Заира, выделенные из супернатанта инфицированных клеток MA-104. Вирионы имеют размеры в среднем 1280–1300 нм, они существенно длиннее, чем частицы вируса Марбург озера Виктория, культивированных аналогичным образом. Препарат негативно контрастирован при помощи 1%-й фосфорновольфрамовой кислоты (рН 6,6). Увеличение 49 400×

петехии, геморрагические диатезы, покраснение лица и грудной клетки, независимые от ортостаза отеки), которые недавно были в сельской местности, особенно в Африке, Южной Америке или Азии, либо когда существует возможность биологической атаки [8, 83]. Получение детального описания путешествия особенно важно для установления предварительного диагноза с учетом эндемичности возбудителей ВГЛ. Необходимо выявить, был ли у пациента контакт с животными. Описание эпизода укуса клещами или комарами либо контакт с грызунами могут повысить настороженность врача в отношении ВГЛ [84]. Клиническая диагностика отдельного вида ВГЛ почти невозможна, поскольку патогномичные симптомы отсутствуют. Большое количество вирусных (грипп, оспа, вирусные гепатиты), бактериальных (грамотрицательная септицемия, чума, риккетсиоз, брюшной тиф), паразитарных (малярия) и даже микотических (гистоплазмоз) инфекций имеют те же симптомы, что и некоторые типы интоксикации (например, укусы змей) и заболевания неинфекционной природы (лейкемия, гемолитическо-уремический синдром, болезнь Кавасаки) [84, 85]. Таким образом, для подтверждения диагноза ВГЛ необходимо проведение лабораторной диагностики [86].

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕМОМРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК

### Опасности

Все вирусы, которые обсуждались выше, отнесены к IV классу патогенности по классификации ВОЗ. Следовательно, все манипуляции с ними должны проводиться в условиях максимальной биологической защиты, в США это уровень безопасности 4 (BSL4) [9]. Однако эти вирусы наиболее часто встречаются в природных условиях, где это оборудование недоступно. Поэтому, необходимо жестко требовать выполнения минимума мер контактной защиты (шапочки, специальные костюмы, одноразовые перчатки, маски на лицо с респираторами), призванных обезопасить работу сотрудников в очаге эпидемии или врачей в таких регионах [84]. Манипуляции с клиническими образцами (сыворотка, ткани и т. д.) в полевых условиях должны быть минимизированы и перенесены до того момента, когда появится возможность работы с ними в условиях максимальной защиты. Образцы должны быть упакованы в соответствии с требованиями Международной ассоциации воздушного транспорта (International Air Transport Association, IATA) и доставлены в лабораторию Международной сети лабораторий повышенной безопасности (IHSLN). Использование острых предметов (особенно игл) следует избегать как в лаборатории, так и в полевых условиях, поскольку инфекционная доза большинства возбудителей ВГЛ минимальна и укол зараженной

иглой, вероятно, будет фатальным. Кроме того, все процедуры, потенциально способные привести к появлению аэрозоля (центрифугирование, взятие аутопсии), должны быть сведены до минимума [9, 87, 88]. Где это возможно, вирус должен быть инактивирован. Добавление Triton-X100, хлороформа, диэтилового эфира, дезоксихолата натрия, SDS, уксусной кислоты или  $\beta$ -пропионлактона эффективно для снижения или уничтожения вирусной активности, поскольку все вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки, оболочечные. Такую инактивацию рекомендуется производить до серологических исследований, а температурная инактивация ( $60^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч) позволяет обеспечить безопасность определения электролитов в сыворотке, азота мочевины крови и креатинина в клинических образцах в полевых условиях. Идеальные условия инактивации достигаются при  $\gamma$ -облучении на сухом льду ( $^{60}\text{Co}$ ), который можно обеспечить в полевых условиях [89–91].

### Сбор клинических образцов

Для выделения вируса сыворотка, плазма или, менее желательно, цельная кровь должны быть собраны от больного ВГЛ в острой лихорадочной стадии и заморожены на сухом льду или в парах жидкого азота, поскольку низкая температура приводит к быстрой инактивации вируса. Важен выбор антикоагулянта, поскольку цитрат натрия влияет на точность непрямого флуоресцентного анализа, ЭДТА вносит помехи в ИФА, а цитрат и оксалат оказывают неспецифический эффект на клетки для выделения вируса. При иммунологических исследованиях (определении антигенов и антител) в качестве антикоагулянта можно использовать гепарин, для ПЦР — ЭДТА. Вирус LASV (но не MASV) также можно относительно легко выделить из смыва из ротоглотки больного через несколько недель после начала заболевания, реже удается выделить из мочи примерно через 30 дней после начала болезни. Филовирусы выделяют из смыва глотки, слюны, мочи, сыворотки, семенной и слезной жидкостей даже в стадии выздоровления [49]. Смывы из глотки и образцы мочи до замораживания должны быть перемешаны с забуференным раствором, содержащим 10% FBS или сыворотки кролика.

Ткани могут быть фиксированы в формалине или в парафине для выявления вируса методом иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) [92, 93]. Отпечатки и мазки тканей, инфицированных ВГЛ, можно фиксировать погружением в холодный ацетон и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$  до исследования на антигены методами непрямого флуоресцентного анализа или ИФА. Экстракция РНК в среде, содержащей тиоцианат гуанидина, обычно инактивирует вирусы ВГЛ, но экстракция по правилам безопасности должна проводиться в ламинарном боксе. Важно также помнить, что флавивирусная геномная РНК сама по себе инфекционна, поэтому при ее выделении и манипуляциях с ней требуется соблюдать меры предосторожности.

## Лабораторная диагностика

### Выделение вируса

#### Клеточная культура

Большинство больных ВГЛ при поступлении имеют вирусемию. Выделение вируса следует всегда рассматривать как цель любого диагностического исследования. Для всех описанных вирусов ВГЛ этого можно достичь путем инокуляции с серийным разведением в среду клеток африканской зеленой мартышки (CV-1, клоны Vero, MA104) свежей или замороженной сыворотки/плазмы/цельной крови или очищенного гомогената тканей (биопсии или аутопсии). Культура клеток должна находиться под наблюдением для исследования цитопатического действия и обнаружения вирусного антигена методами непрямого флуоресцентного анализа или ИФА. Клетки Vero инокулируют образцами с высоким титром, экспрессирующие обнаруживаемый антиген в течение 1–2 сут. после инокуляции, в то время как клетки, в которые введен низкий титр антигена, могут накапливать его в течение одной недели. Слепой пассаж супернатанта культуры тканей применяется для подтверждения отсутствия антигена и, следовательно, вируса через неделю после первичного анализа. Кокультивирование разделенных на гипак-фиколле периферических мононуклеарных клеток крови с клетками Vero может повысить экспрессию антигена [94].

#### Заражение животных

Если выделение вирусов на культуре клеток невозможно, проводится заражение животных. Этот метод иногда позволяет провести предварительную идентификацию возбудителя на основе чувствительности животного [95]. Например, MACV и JUNV могут быть идентифицированы путем заражения новорожденных хомяков и мышей. Инъекция аренавирусов геморрагической лихорадки Старого и Нового Света влияет на молодых взрослых морских свинок (смерть наступает через 7–18 сут.) [96–98]. Морских свинок можно также использовать при выделении филовирусов, однако в этом случае наблюдается летальная лихорадка. При проведении нескольких пассажей возникает острое заболевание с летальным исходом. Из всех известных филовирусов ZEBOV является патогенным для новорожденных мышей при интракраниальном введении [99–101]. Мыши-сосунки Balb — традиционные животные для выделения CCHFV и KFDV. Вирус OHFV может быть выделен на мышах Balb/C [47, 102, 103].

#### Электронная микроскопия (ЭМ)

Электронная микроскопия гепаринизированной крови, мочи или супернатанта культуры тканей наиболее полезна для идентификации филовирусов, поскольку этот возбудитель — единственный из человеческих вирусов — обладает филаментами [104] (см. рис. 20.1).

Филовирусы и аренавирусы также образуют морфологически уникальные вирусные включения в цитоплазме, которые могут быть идентифицированы при помощи ЭМ. Иммуноэлектронная микроскопия (ИЭМ), использующая специфические мышинные моноклональные антитела или поликлональную сыворотку морской свинки, могут быть полезны для диагностики определенных филовирусов [104], которые визуальнo более или менее похожи друг на друга. ИЭМ также используется для идентификации аренавирусных инфекций, но сферическая морфология аренавирусов, буньявирусов и флавивирусов не позволяет достаточно уверенно поставить диагноз на основании только ЭМ.



### Выявление антигена

Определение антигена методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Чувствительные и специфические системы ИФА на основе захвата антигена успешно применяются для идентификации аренавирусов [105–107], ССНФV [108] и филовирусных антигенов [109, 110] в сыворотках с фиксацией вирусов  $\gamma$ -облучением или в инактивированном  $\beta$ -пропионолактоном супернатанте культуры клеток, моче и смыве из глотки. Реакция протекает на поверхности лунок планшета, покрытой смесью антител и четырехкратно разведенного образца. В лунки добавляется вирусспецифичная поликлональная кроличья антисыворотка, поскольку она более чувствительна и демонстрирует более высокую avidность, чем моноклональные антитела. После инкубирования лунки обрабатывают антикроличьими IgG и проводят выявление антигена с помощью пероксидазы хрена. Образцы считаются позитивными, если  $OD_{410}$  превышает среднее значение для нормального контроля плюс 3 стандартных отклонения. Пороговый уровень чувствительности  $\sim 1,3\text{--}3,2 \cdot 10^2$  БОЕ/мл достаточен для детекции вирусного антигена в большинстве клинических образцов, где БОЕ — бляшкообразующие единицы [105, 111–113].

### Иммуногистохимия (ИГХ)

Иммуногистохимический метод для детекции аренавирусного и филовирусного антигена становится все более важным [92, 93]. Инфицированные ткани заливают парафином. Микросрезы парафинового блока помещаются на предметные стекла, покрытые силаном. Затем срезы депарафинируют, гидратируют, обрабатывают протеазой и окрашивают иммуносывороткой или смесью моноклональных антител с последующей обработкой биотинилированной антисывороткой. Детекцию биотинового зонда проводят с использованием стрептавидин-фосфатазного конъюгата [92, 114]. ИГХ особенно полезна для выявления филовирусной инфекции в архивных образцах ткани [115]. Чувствительность метода ИГХ позволяет также обнаружить ССНФV [116], но пока в этих целях она применяется редко.

### Детекция вирусспецифических антител

#### Непрямой флуоресцентный анализ (НФЛА)

Несмотря на то что этот метод постепенно вытесняется иммуноферментным анализом и другими диагностическими тестами, разработанными для возбудителей ВГЛ, непрямой флуоресцентный анализ остается популярным благодаря своей простоте. Мазок на стекле для непрямого флуоресцентного анализа может быть сделан из неинфицированного образца для контроля и из инфицированных клеток или клеток, экспрессирующих рекомбинантный антиген. Сыворотку больных людей (или животных) разводят (от 1:4 до 1:8 и более) и инкубируют с мазком, а затем добавляют конъюгированные антитела. Большинство экспертов считают, что конечной точкой должно быть наивысшее разведение, дающее «типичную» флуоресценцию, которая отчетливо положительна по сравнению с контролем — неинфицированными клетками, но эта интерпретация субъективна. Разработан метод, обладающий высокой специфичностью и чувствительностью для обнаружения IgG и IgM против аренавирусов [107, 117, 118], ССНФV [119–121], ОНФV [122] и филовирусов [123]. В случае выявления филовирусов их концентрация в пробе может быть очень высокой, поэтому в качестве рабочего разведения используют 1:64 или 1:80.

#### Имуноферментный анализ на основе связывания антител (ИФА)

Метод ИФА почти вытеснил метод непрямого флуоресцентного анализа. Для детекции IgG в этих системах используются лизаты инфицированных клеток, инактивированных  $\gamma$ -облучением, или клеток, экспрессирующих рекомбинантный антиген. Стенки лунок микропланшетов покрыты лизатом. В лунки помещают исследуемую сыворотку или плазму в серийных четырехкратных разведениях, обычно начиная с разведения 1:100, инкубируют с видоспецифичными вторичными антителами, связанными, например, с пероксидазой хрена. Образцы считаются положительными, если среднее  $OD_{410}$  превышает значение контроля плюс три стандартных отклонения. Затем в лунки добавляется инактивированная суспензия инфицированных клеток, антиген определяется с использованием поликлональной сыворотки. ИФА представляет собой оптимальный диагностический метод для выявления LASV [105], может применяться у человека и животных для подтверждения диагноза инфекции, вызванной JUNV и MACV [124–126]. Фактически у всех больных лихорадкой Ласса может быть получено лабораторное подтверждение в течение нескольких часов после поступления в больницу при комбинации определения антигена и антител IgB и IgG к антигену Ласса методом ИФА [105, 127]. В случае ССНФV и LASV наиболее многообещающим является метод ИФА на основе рекомбинантного NP [107, 120, 128, 129]. ИФА также можно применять для обнаружения антител к KFDV.



## Метод редукции бляшек (МРБ)

Метод редукции бляшек наиболее специфичен из серологических тестов для диагностики аренавирусных инфекций. Принцип МРБ заключается в определении нейтрализующих вирус антител в сыворотке больного путем добавления ее в культуру, содержащую вирус, с последующим проведением стандартного метода образования бляшек для количественного определения вируса. Чем выше титр нейтрализующих антител, тем меньше бляшек образует вирус. Образование нейтрализующих антител в сыворотке человека часто происходит в течение многих недель, но они персистируют в крови несколько лет, что позволяет проводить исследование сыворотки реконвалесцентов. В случае LASV исследуемые сыворотки разводят 1:10 в среде, содержащей комплемент (10%-я сыворотка морской свинки), и смешивают с серийными разведениями вируса, поскольку активность LASV-нейтрализующих антител быстро теряется при разведении. Титр нейтрализующих антител выражается в виде логарифмического нейтрализующего индекса (LNI), который определяется как ( $\lg$  БОЕ в контроле минус  $\lg$  БОЕ в исследуемой сыворотке). В случае аренавирусной лихорадки Нового Света используют серийные разведения, а концентрация вируса остается постоянной. Разведения сыворотки подбирают так, чтобы снизить количество контрольных плашек с 50 до 80% (МРБ<sub>80</sub> или МРБ<sub>80</sub>), которые обычно используют как конечную точку. МРБ<sub>80</sub> обычно применяют для различия JUNV и MAVS. Клетки Vero используют для исследования МРБ для всех антивирусов. Успешность применения МРБ для филовирuсов еще не показана.

## Определение нуклеиновых кислот

### Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Обнаружение вирусной геномной РНК с использованием обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) становится золотым стандартом для диагностики возбудителей ВГЛ. ОТ-ПЦР — технологичный, высокочувствительный и специфичный метод и допускает использование инактивированных проб. Это особенно полезно в случаях, когда выделение инфицирующего вируса затруднительно. Классически ОТ-ПЦР начинается с экстракции вирусной РНК из тканей при помощи стандартных наборов. Этапы действия обратной транскриптазы (ОТ) и амплификации в идеале осуществляются в одной пробирке с использованием коммерческих наборов. Праймеры для реакций разработаны *in silico* как для отдельных штаммов вирусов (направленных на известные участки высокоизменчивых генов, таких, которые кодируют гликопротеины вирусной оболочки), так и для групп вирусов (их мишень — консервативные регионы генома вирусов, общие для всей группы, такие как VP40 у филовирuсов). После получения положительных результатов ОТ-ПЦР для исключения ложноположительной реакции и часто встречающейся перекрестной

контаминации необходимо провести тесты для подтверждения результата, например выделение вируса, серологические исследования или повторную ОТ-ПЦР на различные участки генома.

Стандартный порог чувствительности для определения ОТ-ПЦР —  $10^5$  копий РНК/мл [131–133]. ОТ-ПЦР в реальном времени, которая более чувствительна, чем обычная ОТ-ПЦР, принята для выявления и количественной оценки LASV, SCHFV и филловирусов в клинических образцах [112, 134, 135]. Реакция выполняется смесью полимераз SuperScript RT/Platinum Taq с включением в амплифицированный продукт зондов, специфичных для вирусных последовательностей генов. Детекцию проводят с помощью 5'-нуклеазы или Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) с использованием прибора Light-Cycler. В качестве альтернативы можно применять флуоресцентные красители, такие как SYBR Green I, которые неспецифически встраиваются в продукт амплификации [112, 134, 135]. 95%-й предел детекции этого метода находится в диапазоне от 1545 до 2835 вирусных геномных эквивалентов в миллилитре сыворотки. Мультиплексные ПЦР-анализаторы могут быть использованы для дифференциальной диагностики 10 различных возбудителей ВГЛ [136]. ОТ-ПЦР успешно применяется для детекции SCHFV в клинических образцах, таких как слюна и моча [137], или сыворотке острой фазы [138–140]. В разработке находится метод TaqMan исследования минорного белка, связывающегося с РНК [141]. Простая ОТ-ПЦР позволяет обнаружить аренавирусы в образцах цельной крови [142], существуют наборы для ОТ-ПЦР в реальном времени для детекции и дифференцировки аренавирусов геморрагической лихорадки Нового Света [143].

### Гибридизация *in situ*

Метод гибридизации *in situ* был успешно использован для идентификации ZEBOV и SCHFV в образцах тканей [116, 144]. В отношении аренавирусных или флавивирусных инфекций об использовании этого метода не сообщалось.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрота диагностики ВГЛ и отдельных этиологических агентов критична в полевых условиях, для того чтобы установить адекватный эпидемиологический режим, включая карантинные меры, образовательные и медицинские мероприятия для медицинских работников и населения, уход за больными и контактировавшими с ними людьми и режим лечения. Методы непрямого флуоресцентного анализа с инактивированными вирусными антигенами и ИФА обычно используются в полевых госпиталях для обнаружения сероконверсии у людей, но образование новых антител — продолжительный процесс, а иногда и не происходит в результате индуцированной вирусом иммуносупрессии. Таким образом, появление специфических антител, IgG или IgM, указывает

на определенную инфекцию, в то время как их отсутствие не исключает наличие вируса. Не следует забывать, что анализ могут осложнить перекрестно-реагирующие антитела, особенно если это филовирусы, антитела против которых были найдены даже не в эндемичных регионах [49]. Следовательно, полевая диагностика сегодня основывается на определении вирусного антигена, предпочтителен ИФА с захватом антигена. ПЦР-анализ все чаще используется для обнаружения нуклеиновых кислот вирусов даже в полевых условиях, подтверждая результаты ИФА. Окончательный диагноз может также быть подтвержден всеми возможными методами — ПЦР, МРБ, ИГХ, ЭМ, гибридизацией *in situ* и, наконец, выделением вируса. В настоящее время диагностика аренавирусной и филовирусной геморрагических лихорадок наиболее разработана, в то время как для ССНФV и флавивирусной геморрагической лихорадки нуждается в усовершенствовании.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gaidusek DC. Virus hemorrhagic fever. Special reference to hemorrhagic fever with renal syndrome (epidemic hemorrhagic fever). *O Pediatr* 1962; 60(6):841–857.
2. Smorodintsev AA, Kazbintsev LI, Chudakov VG, Virus Hemorrhagic Fevers [Russian]. Leningrad, Leningrad region, USSR; Gosudarstvennoe Izdatelstvo Meditsinskoj Literatury'1963.
3. Aleksandrowicz p, Wolf K, Falzarano B et al. Viral hemorrhagic fever and vascular alterations. *Hämostaseologie* 2008; 28(1–2):77–84.
4. Zampieri CA, Sullivan То6 Nabel GJ. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. *Nat Immunol* 2006; 19(4):602–612.
5. Mohamadzadeh M, Chen L, Olinger GG, et al. Filoviruses and the balance of innate, adaptive, and inflammatory responses. *Viral Immunol* 2006; 19(4):602–612.
6. Marty AM, Jahrling PB, Geisbert TW. Viral hemorrhagic fevers. *Clin Lab Med* 2006; 26(2):345–386
7. Howard CR. Viral Haemorrhagic Fevers, Vol 11. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2005.
8. Borio L, Ingelsby T, Peters CJ, et al. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons — medical and public health management. *J Am Med Assoc* 2002; 287(18):2391–2405.
9. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, 2007. HHS Publication No. (CDC) 93–8395.
10. Charrel RN, de Lamballerie X, Emonet S. Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11(4):362–368.
11. Salvato MS, Clegg JCS, Buchmeier MJ, et al. Family Arenaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., eds. *Virus Taxonomy — Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press, 2005:725–733.
12. Briese T, Paweska JT, McMullan LK, et al. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog* 2009; 5(5): e1000455.

13. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 1996; 219(1):285–290.
14. Delgado S, Erickson BR, Agudo R, et al. Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog* 2008; 4(4):e1000047.
15. Frame JD, Baldwin JM Jr., Gocke DJ, et al. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19(4):670–676.
16. Ogbu O, Ajuluchukwu E, Uneke CJ. Lassa fever in West African sub-region: an overview. *J Vector Borne Dis* 2007; 44(1):1–11.
17. McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, et al. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J Infect Dis* 1987; 155(3):437–444.
18. Holmes GP, McCormick JB, Trock SC, et al. Lassa fever in the United States. Investigation of a case and new guidelines for management. *N Engl J Med* 1990; 323(16):1120–1123.
19. Mahdy MS, Chiang W, McLaughlin B, et al. Lassa fever: the first confirmed case imported into Canada. *Can Dis Wkly Rep* 1989; 15(39):193–198.
20. Haas WH, Breuer T, Pfaff G, et al. Imported Lassa fever in Germany: surveillance and management of contact persons. *Clin Infect Dis* 2003; 36(10):1254–1258.
21. Hirabayashi Y, Oka S, Goto H, et al. An imported case of Lassa fever with late appearance of polyserositis. *J Infect Dis* 1988; 158(4):872–875.
22. Schmitz H, Kohler B, Laue T, et al. Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes Infect* 2002; 4(1):43–50.
23. Paweska JT, Sewlall NH, Ksiazek TG, et al. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(10):1598–1602.
24. Arribalzaga RA. New epidemic disease due to unidentified germ: nephrotoxic, leukopenic and enanthematous hyperthermia. *Dia Med* 1955; 27(40):1204–1210 [Spanish].
25. Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, et al. Concerning the epidemic outbreak in Junin. *Dia Med* 1958; 30(62):2300–2301 [Spanish].
26. Charrel RN, de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res* 2003; 57(1-2):89–100.
27. Maiztegui JI. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull World Health Organ* 1975; 52(4–6):567–575.
28. Enria DA, Feuillade MR. Argentine haemorrhagic fever (Junin virus, Arenaviridae): a review on clinical, epidemiological, ecological, treatment and preventive aspects of the disease. In: Travassos de Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos de Rosa JFS, eds. *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighboring Countries*. Belem, Brazil: Instituto Evandro Chaggas, 1998:219–232.
29. Johnson KM, Wiebenga NH, Mackenzie RB, et al. Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 118:113–118.
30. Peters CJ, Kuehne RW, Mercado RR, et al. Hemorrhagic fever in Cochabamba, Bolivia, 1971. *Am J Epidemiol* 1974; 99(6):425–433.
31. Salas R, de Manzione N, Tesh RB, et al. Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 1991; 338(8774):1033–1036.

32. Tesh RB, Jahrling PB, Salas R, et al. Description of Guanarito virus (Arenaviridae: Arenavirus), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(4):452-459.
33. de Manzione N, Salas RA, Paredes H, et al. Venezuelan hemorrhagic fever: clinical and epidemiological studies of 165 cases. *Clin Infect Dis* 1998; 26(2):308-313.
34. Lisieux T, Coimbra M, Nassar ES, et al. New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 1994; 343(8894): 391-392.
35. Barry M, Russi M, Armstrong L, et al. Brief report: treatment of a laboratory-acquired Sabia virus infection. *N Engl J Med* 1995; 333(5): 294-296.
36. Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, et al. Family Bunyaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., eds. *Virus Taxonomy-Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press, 2005:695-716.
37. Chumakov MP. A new tick-borne disease-Crimean hemorrhagic fever. In: Sokolov AE, Chumakov MP, Kolachev AA, eds. *Crimean Hemorrhagic Fever (Acute Infectious Capillary Toxicosis)* [Russian]. Simferopol, U.S.S.R.: Izdanie Otdel'noj Primorskoj Armii, 1945:13-43.
38. Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 131(1):233-236.
39. Ergonul O, Whitehouse CA. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever — A Global Perspective*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2007.
40. Thiel H-J, Collett MS, Gould EA, et al. Family Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., eds. *Virus Taxonomy — Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press, 2005:981-998.
41. Work TH, Trapido H. Kyasanur forest disease — a new virus disease in India. Summary of preliminary report of investigations of the Virus Research Centre on an epidemic disease affecting forest villagers and wild monkeys of Shimoga District, Mysore. *Indian J Med Sci* 1957; 11:341-342.
42. Wang J, Zhang H, Fu S, et al. Isolation of Kyasanur Forest disease virus from febrile patient, Yunnan, China. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(2):326-328.
43. Pattnaik P. Kyasanur forest disease: an epidemiological view in India. *Rev Med Virol* 2006; 16(3):151-165.
44. Qattan I, Akbar N, Afif H, et al. A novel flavivirus: Makkah Region 1994-1996. *Saudi Epidemiol Bull* 1996; 3(1):1-3.
45. Charrel RN, Zaki AM, Attoui H, et al. Complete coding sequence of the Alkhurma virus, a tick-borne flavivirus causing severe hemorrhagic fever in humans in Saudi Arabia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(2):455-461.
46. Charrel RN, Fagbo S, Moureau G, et al. Alkhurma hemorrhagic fever virus in *Ornithodoros savignyi* Ticks. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(1):153-155.
47. Kharitonova NN, Leonov YA. *Omsk Hemorrhagic Fever* [Russian], Novosibirsk, USSR: Nauka, 1978.
48. Busygin FF. *Omsk hemorrhagic fever — current status of the problem* [Russian]. *Vopr Virusol* 2000; 45:4-9.
49. Kuhn JH. *Filoviruses — A Compendium of 40 Years of Epidemiological, Clinical, and Laboratory Studies*. Archives of Virology Supplement. Vol 20. Vienna, Austria: Springer, 2008.
50. Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* 2008; 4(11):e1000212.

51. Siegert R, Shu H-L, Slenczka W, et al. The etiology of an unknown human infection transmitted by monkeys. *Dtsch Med Wochenschr* 1967; 92(51):2341-2343.
52. Stille W, Bohle E, Helm E, et al. An infectious disease transmitted from green monkeys. *Dtsch Med Wochenschr* 1968; 93(12a):572-582.
53. Todorovic K, Mocic M, Klasnja R, et al. An unknown virus disease transmitted from infected green-monkeys to men [Serbo-Croatian]. *Glas Srp Akad Nauka Umjetn Odelj Med Nauka* 1969; CCLXXV (22):91-101.
54. Bowen ETW, Lloyd G, Harris WJ, et al. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet* 1977; i (8011 Pt1):571-573.
55. Formenty P, Boesch C, Wyers M, et al. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S120-S126.
56. Walsh PD, Abernethy KA, Bermejo M, et al. Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature* 2003; 422(6932):611-614.
57. Towner JS, Amman BR, Sealy TK, et al. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* 2009; 5(7):e1000536.
58. Monath TP, Maher M, Casals J, et al. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23(6):1140-1149.
59. Knobloch J, McCormick JB, Webb PA, et al. Clinical observations in 42 patients with Lassa fever. *Tropenmed Parasitol* 1980; 31(4):389-398.
60. Peters CJ. Human infection with arenaviruses in the Americas. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 262:65-74.
61. Vainrub B, Salas R. Latin American hemorrhagic fever. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8(1):47-59.
62. Harrison LH, Halsey NA, McKee KT Jr., et al. Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 1999; 28(5):1091-1094.
63. Stinebaugh BJ, Schroeder FX, Johnson KM, et al. Bolivian hemorrhagic fever. A report of four cases. *Am J Med* 1966; 40(2):217-230.
64. Ergonul O. Clinical and pathologic features of Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever — A Global Perspective*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2007:207-220.
65. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, et al. The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (suppl 4):S794-S800.
66. Pavri K. Clinical, clinicopathologic, and hematologic features of Kyasanur Forest disease. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (suppl 4):S854-S859.
67. Belov GF, Tofaniuk YV, Kurzhukov GP, et al. Clinical-epidemiological characterization of Omsk hemorrhagic fever during 1988 through 1992 [Russian]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1995; (4):88-91.
68. Bausch DG, Nichol ST, Muyembe-Tamfum JJ, et al. Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. *N Engl J Med* 2006; 355(9):909-919.
69. Bwaka MA, Bonnet M-J, Calain P, et al. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S1-S7.
70. Formenty P, Hatz C, le Guenno B, et al. Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S48-S53.

71. Sureau PH. Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestations in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (suppl 4):S790-S793.
72. Buchmeier MJ, de la Torre J-C, Peters CJ. Arenaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Vol 2. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1791-1827.
73. Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* 2001; 1(1):article 1.
74. York J, Romanowski V, Lu M, et al. The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 2004; 78(19):10783-10792.
75. Schmaljohn CS, Nichol ST. Bunyaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Vol 2. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1741-1789.
76. Lin D, Li L, Dick D, et al. Analysis of the complete genome of the tick-borne flavivirus Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology* 2003; 313 (1):81-90.
77. Gubler D, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, Vol 1. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1153-1252.
78. Geisbert TW, Jahrling PB. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 1995; 39(2-3): 129-150.
79. Regnery RL, Johnson KM, Kiley MP. Virion nucleic acid of Ebola virus. *J Virol* 1980; 36(2):465-469.
80. Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, et al. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* 1993; 29(3): 215-240.
81. Sanchez A, Trappier SG, MahyBWJ, et al. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(8):3602-3607.
82. Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VE, et al. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proproteinconvertase furin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(10):5762-5767.
83. Jahrling PB, Marty AM, Geisbert TW. Viral hemorrhagic fevers. In: Dembek ZF, ed. *Medical Aspects of Biological Warfare*. Washington, DC: Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, 2007: 271-310.
84. Gear JHS. The diagnosis of hemorrhagic fever. In: Gear JHS, ed. *CRC Handbook of Viral and Rickettsial Hemorrhagic Fevers*. Boca Raton, FL: CRC. Press, 1988:231-239.
85. Gear JHS. Clinical aspects of African viral hemorrhagic fevers *Rev. Infect Dis* 1989; 11 (suppl 4):S777-S782.
86. Shepherd AJ Viral hemorrhagic fever laboratory diagnosis. In: Gear JHS, ed. *CRC Handbook of Viral and Rickettsial Hemorrhagic Fevers*. Boca Raton, FL: CRC. Press, 1988:241-250.
87. Centers for Disease Control. Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1988; 37 (suppl 3):1S-16S.
88. Centers for Disease Control and Prevention. Update: management of patients with suspected viral hemorrhagic fever — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995; 44(25):475-479.

89. Mitchell SW, McCormick JB. Physicochemical Inactivation of Lassa, Ebola and Marburg Viruses and Effect on Clinical Laboratory Analysis. *J Clin Microbiol* 1984; 20(3):486-489.
90. van der Groen G, Elliott LH. Use of betapropionolactone inactivated Ebola, Marburg and Lassa intracellular antigens in immunofluorescent antibody assay. *Ann Soc Belg Med Trop* 1982; 62(1): 49-54.
91. Bhagat CI, Lewer M, Prins A, et al. Effects of heating plasma at 56 °C for 30 min and at 60 °C for 60 min on routine biochemistry analytes. *Ann Clin Biochem* 2000; 37(6):802-804.
92. Zaki SR, Shieh W-J, Greer PW, et al. A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S36-S47.
93. Centers for Disease Control and Prevention. Imported Lassa fever — New Jersey, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53(38):894-897.
94. Ambrosio AM, Enria DA, Maiztegui JI. Junin virus isolation from lymphomononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology* 1986; 25:97-102.
95. Gowen BB, Holbrook MR. Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res* 2008; 78(1):79-90.
96. Jahrling PB, Smith S, Hesse RA, et al. Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infect Immun* 1982; 37(2):771-778.
97. Oubina JR, Carballal G, Videla CM, et al. The guinea pig model for Argentine hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33(6):1251-1257.
98. Hall WC, Geisbert TW, Huggins JW, et al. Experimental infection of guinea pigs with Venezuelan hemorrhagic fever virus (Guanarito): a model of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(1): 81-88.
99. Lupton HW, Lambert RD, Bumgardner DL, et al. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapigmodel. *Lancet* 1980; ii (8207):1294-1295.
100. Connolly BM, Steele KE, Davis KJ, et al. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S203-S217.
101. Hevey M, Negley D, Pushko P, et al. Marburg virus vaccines based upon alpha virus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* 1998; 251(1):28-37.
102. Tignor GH, Hanham CA. Ribavirin efficacy in an in vivo model of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) infection. *Antiviral Res* 1993; 22(4):309-325.
103. Holbrook MR, Aronson JF, Campbell GA, et al. An animal model for the tickborne flavivirus — Omsk hemorrhagic fever virus. *J Infect Dis* 2005; 191(1):100-108.
104. Geisbert TW, Jahrling PB. Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. *J Clin Pathol* 1990; 43(10):813-816.
105. Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, et al. Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7):2670-2677.
106. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, et al. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis



- of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(8):1132-1138.
107. Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, et al. Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(9):1182-1189.
  108. Larichev VF, Manzenjuk IN, Naidenova EV, et al. ELISA and PCR test systems used to detect Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Vopr Virusol* 2007; 52(4):43-46.
  109. Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, et al. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein: detection of authentic Marburgvirus. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59(5):323-325.
  110. Sherwood LJ, Osborn LE, Carrion R Jr., et al. Rapid assembly of sensitive antigen-capture assays for Marburg virus, using in vitro selection of llama single-domain antibodies, at biosafety level 4. *J Infect Dis* 2007; 196 (suppl 2):S213-S219.
  111. Kisazek TG, Rollin PE, Williams AJ, et al. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 1999; 179 (suppl 1):S177-S187.
  112. Grolla A, Lucht A, Dick D, et al. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Bull Soc Pathol Exot* 2005; 98(3):205-209.
  113. Shepherd AJ, Swanepoel R, Gill DE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and reversed passive hemagglutination for detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antigen. *J Clin Microbiol* 1988; 26(2):347-353.
  114. Jaax NK, Davis KJ, Geisbert TW, et al. Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120(2):140-155.
  115. Geisbert TW, Jaax NK. Marburg hemorrhagic fever: report of a case studied by immunohistochemistry and electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 1998; 22(1):3-17.
  116. Burt FJ, Swanepoel R, Shieh WJ, et al. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121(8):839-846.
  117. Wulff H, Lange JV. Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. *Bull World Health Organ* 1975; 52(4-6):429-436.
  118. Peters CJ, Webb PA, Johnson KM. Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect fluorescent technique. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142(2):526-531.
  119. Papa A, Bozovi B, Pavlidou V, et al. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(8):852-854.
  120. Qing T, Saijo M, Lei H, et al. Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *J Virol Methods* 2003; 108(1):111-116.
  121. Saijo M, Qing T, Niikura M, et al. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immuno-

- globulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2):372–375.
122. Nikolaev VP. Comparative assessment of methods for detecting the Omsk hemorrhagic fever virus. *Vopr Virusol* 1989; 34(3):366–368.
123. Elliott LH, Bauer SP, Perez-Oronoz G, et al. Improved specificity of testing methods for filovirus antibodies. *J Virol Methods* 1993; 43(1):85–100.
124. Ivanov AP, Rezapkin GV, Dzagurova TK, et al. Indirect solid-phase immunosorbent assay for detection of arenavirus antigens and antibodies. *Acta Virol* 1984; 28(3):240–245.
125. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, et al. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine hemorrhagic fever. *Acta Virol* 1997; 41(6):305–310.
126. Morales MA, Calderon GE, Riera LM, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Junin virus in rodents. *J Virol Methods* 2002; 103 (1):57–66.
127. Niklasson BS, Jahrling PB, Peters CJ. Detection of Lassa virus antigens and Lassa-specific IgG and IgM by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 1984; 20:239–244.
128. Saijo M, Tang Q, Shimayi B, et al. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol* 2005; 75(2):295–299.
129. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, et al. Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol* 2008; 80(12):2127–2133.
130. Geetha PB, Ghosh SN, Gupta NP, et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using B-lactamase for the detection of antibodies to KFD virus. *Indian J Med Res* 1980; 71:329–332.
131. Trappier SG, Conaty AL, Farrar BB, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of Lassa virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49(2):214–221.
132. Lozano ME, Enria D, Maiztegui JI, et al. Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5):1327–1332.
133. Zhai J, Palacios G, Towner JS, et al. Rapid molecular strategy for filovirus detection and characterization. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (1):224–226.
134. Drosten C, Gottig S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RN A of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 40(7):2323–2330.
135. Duh D, Saksida A, Petrovec M, et al. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. *J Virol Methods* 2006; 133:175–179.
136. Palacios G, Briese T, Kapoor V, et al. MassTag polymerase chain reaction for differential diagnosis of viral hemorrhagic fevers. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(4):692–695.
137. Bodur H, Akinci E, Onguru P, et al. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome in saliva and urine. *Int J Infect Dis* 2009.
138. Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, et al. Low-density microarray for rapid detection and identification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4):1025–1030.

139. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58(6):358-362.
140. Burt FJ, Leman PA, Smith JF, et al. The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *J Virol Methods* 1998; 70(2):129-137.
141. Garrison AR, Alakbarova S, Kulesh DA, et al. Development of a TaqMan minor groove binding protein assay for the detection and quantification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(3):514-520.
142. Lozano ME, Ghiringhelli PD, Romanowski V, et al. A simple nucleic acid amplification assay for the rapid detection of Junin virus in whole blood samples. *Virus Res* 1993; 27(1):37-53.
143. Vieth S, Drosten C, Charrel R, et al. Establishment of conventional and fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assays for detection of pathogenic New World arenaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32(3):229-235.
144. Steele K, Crise B, Kuehne A, et al. Ebola virus glycoprotein demonstrates differential cellular localization in infected cell types of nonhuman primates and guinea pigs. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125(5):625-630.



# 21 ИНФЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

**Дж.Л. Резнисек**

Julie E. Reznicek, Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.

**К.С. Блох**

Karen C. Bloch, Departments of Medicine and Preventive Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.

**Ю-Вей Танг**

Yi-Wei Tang, Departments of Pathology and Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, U.S.A.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусные инфекции центральной нервной системы (ЦНС) часто представляют собой диагностическую дилемму. Многочисленный список возможных причин заболевания начал пополняться намного ранее, чем когда век назад была установлена этиология инфекций ЦНС, главным образом, ограниченная вирусом бешенства и полиомиелита. Соматические проявления инфекций ЦНС часто неспецифичны, и первоначальные результаты лабораторных исследований не могли значительно прояснить этиологию заболевания. Молекулярно-диагностические тесты резко улучшили возможность обнаружения вирусов ЦНС, но требуется опыт в распознавании характерных признаков и понимании ограничений этих методов. Даже разделение на инфекционные и неинфекционные причины может быть затруднительно, поскольку метаболические, аутоиммунные неопластические, токсические и эндокринные заболевания могут иметь те же признаки, что менингит и энцефалит. Инфекции ЦНС вызывают развитие синдромов, при которых решающим условием для принятия точного диагностического решения и правильной интерпретации результатов является тесное взаимодействие врачей и сотрудников клиничко-диагностических лабораторий.

В этой главе рассмотрены вирусные инфекции ЦНС у больных без нарушений иммунной системы, с акцентом на установление диагноза и интерпретацию результатов лабораторных исследований. Близкое анатомическое расположение оболочек и паренхимы головного мозга часто приводит к нечеткости в различии между менингитом и энцефалитом, вызывая развитие синдрома, получившего название менингоэнцефалит. В терминах данной главы менингоэнцефалит будет рассматриваться как проявление и осложнение энцефалита, в то время

как термин «менингит» будет обозначать заболевание только оболочек мозга. Существует значительная географическая вариабельность в отношении инфекций ЦНС, дальнейшее обсуждение будет фокусироваться на наиболее значимых возбудителях в США. Вначале представлен беглый обзор лабораторных диагностических методов, за которым следует более детальное их обсуждение, связанное с различными вирусными возбудителями.

## КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

У больных с инфекциями ЦНС могут проявляться разнообразные неспецифические симптомы, что приводит к сложности определения этиологии вирусных менингитов и энцефалитов по клиническим признакам. Как энцефалит, так и менингит обычно проявляется лихорадкой и головной болью. Измененное состояние сознания почти всегда наблюдается при энцефалите и обычно присутствует в анамнезе. При вирусных менингитах сознание, напротив, часто не нарушено, эта группа больных имеет объективные признаки менингеального воспаления, такие как ригидность шеи и затылочных мышц [1].

### Острый вирусный менингит

Менингит в основном классифицируется по остроте начала, параметрам спинномозговой жидкости (СМЖ) и этиологии заболевания. Вирусные менингиты почти без исключения являются острыми заболеваниями, с вариабельностью клинических симптомов раздражения мозговых оболочек, развивающихся в течение периода от нескольких часов до нескольких дней, но без проявления неврологических дисфункций [1]. Часто больные могут рассказать о недавнем вирусном синдроме, который развился после резкого кратковременного подъема температуры с головной болью [2]. На коже могут присутствовать различные виды сыпи, что дает возможность предположить определенного возбудителя, например ветряной оспы или энтеровирус. Лабораторные проявления вирусного менингита заключаются в повышении количества лейкоцитов в СМЖ. В отличие от бактериального менингита у больных вирусным менингитом обычно развивается мононуклеарный, а не нейтрофильный плеоцитоз, абсолютное количество лейкоцитов, как правило, менее  $300 \text{ кл./мм}^3$  ( $<100\text{--}1000 \text{ клеток/мм}^3$ ) [3].

### Вирусный энцефалит

Энцефалит — это заболевание, связанное с воспалительным процессом в паренхиме головного мозга, с измененным уровнем сознания и проявлением клинических симптомов мозговой дисфункции [4]. Тяжелые поражения, такие как кома, могут развиваться вторично при диффузном вовлечении коры мозга. Некоторые микроорганизмы обладают нейротропизмом к определенным анатомическим участкам моз-

га: например, вирус герпеса HSV-1 почти всегда поражает височные доли, с характерными изменениями на ЭЭГ, которые представляют собой периодические латерализованные эпилептиформные разряды, развивающиеся из этой зоны [5]. Иногда у больных с воспалением, локализованным в периферических отделах ЦНС, сознание может сохраняться. Например, первоначально ветряная оспа сопровождается поражением мозжечка и проявляется атаксией и нистагмом, но без нарушения сознания [6, 7]. Другие неврологические проявления могут включать эпилептические припадки, поведенческие изменения (например, психоз), очаговые парезы и параличи, паралич черепно-мозговых нервов или двигательные нарушения в виде хореи.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

В отношении частоты и распространенности вирусных инфекций ЦНС данные ограничены. В то время как ряд специфических возбудителей в США подлежат государственной регистрации (например, лихорадка Западного Нила, бешенство), это не относится к синдромам энцефалита, менингита и миелита. В одном большом популяционном исследовании, проводимом в течение 32 лет, случаи асептических менингитов и энцефалитов были обнаружены с частотой 10,9 на 100 тыс. человек в год и 7,4 на 100 тыс. человек в год соответственно [9]. В недавно проведенном в США исследовании с использованием государственных данных по энцефалиту выявлена частота случаев 7,3 на 100 тыс. человек, 230 000 койко-дней и 1400 смертей ежегодно [10]. Эта оценка примерно совпадает с исследованиями, проведенными для финских детей, где частота заболевания составила 8,8 на 100 тыс. человек [11].

## Вирусный менингит

Энтеровирусы — наиболее частая причина вирусных менингитов. Данные Государственной системы контроля за энтеровирусами (National Enterovirus Surveillance System, NESS) позволяют предположить, что в США энтеровирусы вызывают примерно 10–15 млн случаев клинически манифестной инфекции ежегодно, включая 30–75 тыс. случаев менингита [12]. Энтеровирусные инфекции, как предполагают, ответственны за 80–92% случаев асептических менингитов, когда их этиология не была установлена [13]. Остальные случаи относят на счет арбовирусов и различных герпесвирусных инфекций, преимущественно HSV-2. Другие вирусы-возбудители синдрома асептического менингита специфичны для определенной популяции, например вирус эпидемического паротита у неиммунизированных лиц или вирус лимфоцитарного хориоменингита у лиц, контактировавших с грызунами. Даже более сложные и точные диагностические тесты, такие как амплификационный метод исследования нуклеиновых кислот, во многих случаях асептического менингита (32–75%) оказываются неэффективны [14].

## Вирусный энцефалит

Микробиология вирусных энцефалитов в последние десятилетия успешно развивается. Снижается частота случаев заболеваний, против которых применяется вакцинация, — корь, эпидемический паротит, краснуха и ветряная оспа [15, 16], — но появились новые возбудители, которые замещают эти вирусы. Вирус лихорадки Западного Нила (WNV), который впервые был идентифицирован как причина энцефалита в США в 1999 г., в настоящее время рассматривается как причина >1000 случаев инфекций в год [17]. Повышение числа больных со сниженным иммунитетом привело к увеличению числа чувствительных к оппортунистическим инфекциям (CMV, вирус EBV, полиома вирус JC, герпес вирус HHV-6), они составляют группу риска.

HSV-1, WNV и энтеровирусы — наиболее распространенная из идентифицированных причина энцефалитов в США, хотя в ряде публикаций приводится большое количество дополнительных возбудителей, вызывающих энцефалит [14, 18]. По существу, этих возбудителей можно разделить на категории по частоте поражения ЦНС. Нейротропные вирусы, которые относительно часто вызывают энцефалит и обладают нейротропным потенциалом, приведены в табл. 21.1. Вирусы, которые обладают выраженным нейротропным эффектом, но относительно редко становятся причиной энцефалитов, представлены в табл. 21.2. Наконец, в табл. 21.3 приведен список наиболее проблематичной группы: это вирусы, которые случайно оказались связанными с энцефалитом, но имеют слабую нейротропность, и прямые доказательства их этиологической роли ограничены.

Таблица 21.1

Наиболее распространенные вирусные инфекции, вызывающие менингоэнцефалит в США

Этиология	Эпидемиология	Клинические признаки	Диагностика
Энтеровирусы	Пик заболеваний поздним летом и ранней осенью. Наиболее распространено среди детей	Асептический менингит (наиболее часто), с переходом в энцефалит	ПЦР СМЖ или культуры вирусов. Мазок из зева или стула, ПЦР или культура позволяют предположить, но не диагностировать вовлеченность ЦНС
Вирус Эпштейна-Барр	Как при острой инфекции, так и при реактивации	Атаксия мозжечка, сенсорная деформация, первичная лимфома ЦНС	ПЦР СМЖ (обнаружение инфекции или реактивации), часто выглядит как двойственная инфекция,

Окончание табл. 21.1

Этиология	Эпидемиология	Клинические признаки	Диагностика
			серология (IgM положительны при острой инфекции)
Вирус простого герпеса (HSV 1-2)	HSV 1 считается ответственным за 5-10% всех случаев энцефалита, HSV-2 первично вызывает септический менингит, хотя у новорожденных может вызывать энцефалит	Эпилептический припадок височной доли (апраксия, причмокивание губами), нарушения поведения. Монолатеральные или билатеральные расширения в височных долях на МРТ	ПЦР СМЖ, серология СМЖ, если симптомы длятся более 1 недели
Вирус Ла-Кросс	Передается комарами, эндемичен для Среднего Запада и восточных штатов США, наибольшее число случаев отмечено у детей школьного возраста	Варьируют от субклинических эпилептических припадков до комы, обычно полное выздоровление	Серология
Вирус энцефалита Сент-Луис (SLE)	Передается комарами, эндемичен для западных штатов США, с периодическими вспышками в центральных и восточных штатах, наибольшее число случаев отмечено у взрослых старше 50 лет	Тремор, эпилептические приступы, парез, мочевые симптомы, иногда присутствует синдром неадекватной секреции АДГ (SIADH)	Серология (перекрестная реакция с флавивирусами)
Вирус ветряной оспы варицелла зостер (VZV)	Острая инфекция (ветряная оспа) или реактивация (опоясывающий лишай)	Везикулярная сыпь (диссеминированная или сливная), мозжечковая атаксия, васкулиты крупных сосудов	ПФЛА или ПЦР участков пораженной кожи, ПЦР СМЖ, сывороточный IgM, (острая инфекция)
Лихорадка Западного Нила (WNL)	Передается комарами, случаи вспышек отмечены на территории США и Европы, наибольшее число случаев отмечено у взрослых старше 50 лет	Слабость, острый вялый паралич, тремор, миоклония, признаки болезни Паркинсона. ЯМР-томография обнаруживает повреждения базальных ганглиев и таламуса	IgM в СМЖ, серология (перекрестная реакция с SLE)
Сокращения: СМЖ — спинномозговая жидкость; ПЦР — полимеразная цепная реакция			



Таблица 21.2

**Менее распространенные вирусные инфекции,  
вызывающие менингоэнцефалит в США**

Этиология	Эпидемиология	Клинические признаки	Диагностика
Вирус восточного лошадиного энцефаломиелита (EEE)	Штаты побережья (Атлантический океан и Гольфстрим); поражаются в основном дети и пожилые люди	В диапазоне от субклинических до молниеносного энцефалита. Смертность 50–70%	Серология
Вирус герпеса В	Передается укусами макак Старого Света, инфекции лабораторов и ветеринаров	Везикулярные высыпания, на стороне укуса с последующим развитием неврологических симптомов, включая трансверсивный миелит	Культивирование и ПЦР везикул и СМЖ
Вирус кори	Вакцинопрофилактика; энцефалит с коревыми включениями (коревые тельца), через 1–6 месяцев после инфицирования; SSPE	Коревой энцефалит неспецифичен, SSPE имеет подострое начало, с прогрессирующей деменцией, миоклонией, припадками и в итоге смертью	Антитела в СМЖ, ПЦР ткани мозга, часто диагностируются изменения на ЭЭГ
Вирус эпидемического паротита	Вакцинопрофилактика	Паротит, орхит, часто потеря слуха	Серология, мазок из зева, ПЦР, культура СМЖ с ПЦР
Вирус Повассан (POW)	Передается клещами, эндемичен для Новой Англии, региона Великих озер и Канады	Неспецифичные	Серология
Вирус бешенства	Вакцинопрофилактика; наиболее частый переносчик — летучие мыши, укусы часто не распознаются. В развивающихся странах важный переносчик — собаки	Оцепенение или невропатические боли в месте укуса. Развитие водобоязни (со слюноотечением), возбуждение, делирий, вегетативная нестабильность, кома. Паралитическая форма с восходящим параличом развивается менее чем в 30% случаев	Антитела (сыворотка, СМЖ), ПЦР слюны или СМЖ, ИФА биопсии затылочной части шеи или тканей ЦНС. Координированные исследования вместе с местными органами здравоохранения

Окончание табл. 21.2

Этиология	Эпидемиология	Клинические признаки	Диагностика
Коревая краснуха	Вакцинопрофилактика	Неврологические симптомы обычно развиваются в то же время, что и сыпь и лихорадка	Серология, анти-тела в ЦСЖ
Вирус западного лошадиного энцефалита (WEE)	Вспышки летом и ранней осенью. Западные штаты США, Канада, Центральная и Южная Америка	Неспецифичные	Серология

Сокращения: СМЖ — спинномозговая жидкость; ПЦР — полимеразная цепная реакция; SSPE — подострый склерозирующий панэнцефалит (subacute sclerosing panencephalitis)



Таблица 21.3

**Вирусные возбудители с неизвестным нейротропным потенциалом, которые в некоторых случаях были связаны с менингоэнцефалитами**

Этиология	Эпидемиологические и клинические признаки	Диагностика
Аденовирус	Спорадические случаи, дети и лица с нарушением иммунитета находятся в группе наибольшего риска, иногда ассоциирован с респираторными инфекциями	Вирусная культура или ПЦР из респираторного участка, СМЖ или ткани мозга
Герпес-вирус человека HHV-6	Обычно лица с нарушением иммунитета, в частности после пересадки костного мозга, латентная инфекция нервной системы затрудняет оценку необходимости детекции вируса в ткани мозга	ПЦР СМЖ
Вирус гепатита С (HCV)	HCV — сероположительные больные	ПЦР СМЖ
Метапневмовирус человека	Недавно описанный возбудитель, почти исключительно у детей	Респираторный тракт, ПЦР
Парэховирусы человека HPeV-1, HPeV-2	Ранее — экзавирусы 22 и 23, вызывают сепсис и менингит новорожденных	ПЦР ЦСЖ
Вирусы гриппа А и В	Спорадические инфекции у детей, чаще всего сообщения в Японии и Юго-Восточной Азии, симптомы поражения верхних дыхательных путей, бесклеточная СМЖ, 10% больных с билатеральным некрозом таламуса; высокая смертность	Культуры респираторного тракта, ПЦР или быстрый иммуноанализ, ПЦР СМЖ и мозга редко положительна

Окончание табл. 21.3

Этиология	Эпидемиологические и клинические признаки	Диагностика
Парвовирус В-19	Спорадические случаи, вариабельно ассоциированные с кожной сыпью	Детекция антител IgM, ПЦР СМЖ
Ротавирус	Обычно у детей в зимние месяцы, обычно сопровождается диареей	Антиген в стуле, ПЦР СМЖ (CDC)
Сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция; СМЖ — спинномозговая жидкость; CDC — Centers for Disease Control and Prevention (Центр контроля и профилактики инфекционных болезней, США)		

Несмотря на масштабные исследования, возбудители были идентифицированы менее чем в 50% случаев [14, 19, 20]. Например, в течение последних двух лет в ходе реализации Калифорнийского проекта по энцефалиту было проведено проспективное исследование с использованием комбинации серологических и молекулярно-диагностических методов для улучшения выделения возбудителя, однако у 208 из 334 больных (62%) в случаях энцефалита возбудитель не был идентифицирован [20]. Аналогичные результаты были получены в намного более крупном исследовании: из 1570 случаев заболевания возбудитель был подтвержден или, по крайней мере, предположен только в 29% случаев энцефалита [8].

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ДИАГНОЗ

Неинфекционные заболевания могут проявляться почти в том же виде, что и вирусный менингит или энцефалит. Значимые причины неинфекционного асептического менингита включают злокачественные новообразования (например, лимфоцитарный менингит), ревматологические заболевания (например, васкулиты), гранулематозные заболевания (например, саркоидоз). Асептические менингиты, вызванные приемом препаратов, представляют определенную проблему, поскольку в данном случае диагноз ставится методом исключения. Хотя причиной асептического менингита бывают разные препараты, наиболее часто упоминаются нестероидные противовоспалительные препараты и сульфаниламиды [21]. Диагноз асептического лекарственного менингита должен предполагаться, если при повторной люмбальной пункции больного после отмены приема препарата показатели СМЖ нормализуются.

Энцефалит необходимо дифференцировать от двух клинически похожих неинфекционных заболеваний, а именно энцефалопатии и постинфекционного или параинфекционного энцефаломиелита. Энцефалопатия, синдром нарушенного сознания без прямого вовлечения паренхимы ЦНС, может быть установлена в ряде случаев, включая нарушения метаболизма, гипоксию, ишемию, эндокринологические расстройства, внесозговые инфекционные заболевания, токсические поражения. Энцефалопатии часто отличаются от вирусных энцефали-

тов отсутствием лихорадки, более постепенным началом, отсутствием или низким плеоцитозом и нормальной картиной мозга при инструментальном исследовании [22]. Лечение энцефалопатии имеет целью устранение вызвавших ее причин или условий развития.

Поствоспалительный энцефаломиелит представляет собой заболевание ЦНС связанное с демиелинизацией, которая обычно наступает вследствие инфекции средней тяжести или иммунизации. Могут отмечаться лихорадка, головная боль, очаговые неврологические признаки, что делает этот синдром клинически неотличимым от вирусного энцефалита [23]. Наиболее частым вариантом развития поствоспалительного энцефаломиелита является острый диссеминированный энцефаломиелит (ОДЭМ). Это заболевание наблюдается исключительно у детей и подростков и характеризуется плохо определяемыми на ЯМР-томографии повреждениями белого вещества мозга, которые выявляются при введении гадолиния [24]. Подразумевается, что поствоспалительный энцефаломиелит опосредован иммунным ответом на возрастающую антигенную стимуляцию и составляет 5–15% всех случаев энцефалита [10, 25]. Лечение обычно включает иммунотерапию (применение высоких доз кортикостероидов и иммуноглобулина).

## КЛИНИЧЕСКОЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ

Вирусные инфекции ЦНС представляют собой диагностическую проблему из-за большого числа потенциально опасных вирусов и множества существующих разнообразных молекулярных и диагностических тестов. Недавно были опубликованы пособия по диагностике и руководство по энцефалиту, на которые опираются многие из авторов публикаций [14]. Хотя против большинства вирусов-возбудителей инфекционных энцефалитов нет специфических препаратов (за редким исключением энцефалита, вызванного вирусом простого герпеса), тщательное диагностическое исследование очень важно. Идентификация возбудителя позволяет прекратить потенциально токсичную эмпирическую антибиотическую терапию, может повлиять на прогноз, а также быть полезной для ведения мероприятий системных мер, например мер по контролю за комарами. Ниже описаны общие принципы диагностики вирусных инфекций ЦНС. Более детальное обсуждение специфических методов приводится в главах, посвященных культивированию вирусов, серологии и молекулярной диагностике.

### Сбор анамнеза и осмотр больного

Сбор анамнеза и осмотр больного играют важнейшую роль в назначении диагностического обследования. Эпидемиологические или клинические данные, которые могут повысить настороженность в отношении конкретных возбудителей, приведены в табл. 21.1–21.3. Если по ходу опроса больной упоминает укусы животного или членистоно-

гого, путешествия, поражения других органов вне ЦНС, врач может сузить дифференциальную диагностику, особенно в случае зарубежной поездки или необычного происшествия на рабочем месте (например, если пациент — ветеринар).

Важное значение при диагностике имеет также внешний осмотр пациента. Например, следует тщательно осмотреть кожу больного на предмет укусов животных или прикрепления членистоногих. Наличие локальной или генерализованной лимфаденопатии позволяет предположить специфического возбудителя, такого как вирус лихорадки Эбола, цитомегаловирус или ВИЧ. Предположение о нарушении состояния иммунной системы больного может быть сделано, если при осмотре обнаруживаются признаки оппортунистических инфекций, например кандидоза полости рта.

### Общая диагностическая оценка

Больные с предполагаемой инфекцией ЦНС должны пройти стандартное лабораторное обследование. Должны быть получены данные подсчета эритроцитов периферической крови, тесты функции печени и почек, исследование системы свертывания, гемокультуры [14]. Первичное рентгенологическое обследование должно быть проведено для оценки дыхательной системы, если предполагается респираторная инфекция (например, грипп или аденовирусная инфекция) или медиастинальная лимфаденопатия. Другие лабораторные исследования (например, на ВИЧ-инфекцию) необходимо проводить при подозрении на наличие сопутствующей инфекции.

### Томография

Получение изображения головного мозга различными способами проводится у всех больных с подозрением на инфекцию ЦНС. Исключением могут быть молодые, до этого времени здоровые люди с высокой температурой и головной болью, но без очаговой неврологической симптоматики и нарушения сознания [26]. Обычно сначала проводится неконтрастная компьютерная томография головы (КТ). Несмотря на то что этот метод менее чувствителен, чем магнитно-резонансная томография (МРТ) [27, 28], КТ обеспечивает быструю оценку состояния ЦНС и обширных повреждений, которые служат противопоказанием к люмбальной пункции. В настоящее время разработаны более современные МРТ-методы, использующие, помимо обычных T1- и T2-режимов, другие, которые могут быть полезны для определенных ситуаций. Например, позиционно-эмиссионная томография (ПЭТ) позволяет дифференцировать цитотоксическую форму от вазогенного отека, а также отличить свежий инсульт от старого [4]. ПЭТ может быть более чувствительна, чем традиционная МРТ, в обнаружении ранних признаков нарушений при вирусных энцефалитах, вызванных HSV-1, энтеровирусом 71 и вирусом лихорадки Западного Нила [29].

Патологические изменения, обнаруженные на томограмме головного мозга, часто относительно неспецифичны, тем не менее в некоторых случаях радиологические изменения могут позволить предположить определенный возбудитель. Например, более чем у 90% больных с подтвержденным диагнозом энцефалита, вызванного HSV-1, будет присутствовать патология одной или обеих височных долей, которая визуализируется на МРТ [30]. В табл. 21.4 приведены радиологические изменения, характерные для вирусных возбудителей. Другие неврологические диагностические исследования, такие как электроэнцефалография (ЭЭГ) и фосфор-18 фосфодиоксирибонуклеиновая позитронно-эмиссионная томография (ФДГ/ПЭТ), также применялись при вирусных энцефалитах, но их данные неспецифичны и таким образом эти исследования не рекомендуются в повседневной практике [14].

Таблица 21.4

**Рентгенологические признаки энцефалита  
и ассоциированная с ними вирусная этиология**

Признаки на томограмме	Возможный вирус-возбудитель
Артериты и инфаркты	Вирус ветряной оспы (варицелла зостер), вирус Нипах
Повреждения мозжечка	Вирус ветряной оспы (варицелла зостер), вирус Эпштейна—Барр
Очаговые повреждения базальных ганглиев, таламуса и/или ствола мозга	Вирус Эпштейна—Барр, восточного лошадиного энцефалита, энцефалита Сент-Луис, лихорадки Западного Нила, энтеровирус 71, вирус гриппа (острая некротизирующая энцефалопатия), вирус герпеса HHV-6
Поражение височных долей	Вирус простого герпеса
Нарушения белого вещества	Вирус ветряной оспы (варицелла зостер), вирус Эпштейна—Барр, вирус герпеса HHV-6, JC-полиомавируса, острый диссеминированный энцефаломиелит, вторичный в отношении инфекции или иммунизации

### Анализ спинномозговой жидкости

Больным с предполагаемой вирусной инфекцией ЦНС необходимо провести люмбальную пункцию для анализа СМЖ. Противопоказания к люмбальной пункции включают повышенное внутричерепное давление, развившееся в результате отека, обширных повреждений или острой коагулопатии. Для получения точного открытого давления люмбальную пункцию следует осуществлять, когда больной лежит на боку. Для анализа следует получить, по крайней мере, 10–15 мл спинномозговой жидкости. Этот относительно небольшой объем замещается образованием дополнительной СМЖ в течение примерно 30 мин [31].

Анализ СМЖ стандартно включает в себя подсчет клеток, оценку уровня глюкозы, измерение белка. При вирусных инфекциях ЦНС редко обнаруживается уровень белка  $>200$  мг/дл, и обычно высокий уровень белка свидетельствует о бактериальных процессах [32]. Аналогично уровень глюкозы  $<40$  мг/дл или отношение глюкозы СМЖ к глюкозе сыворотки крови  $<0,4$  значительно повышает вероятность бактериального, а не вирусного менингита [33].

Большое количество лейкоцитов  $\geq 5$  кл./мм<sup>3</sup> нехарактерно для энцефалита и подтверждает менингеальное воспаление. Подсчет плеоцитоза требует быстрого исследования СМЖ, поскольку концентрация нейтрофилов падает примерно на 50% через 2 ч после люмбальной пункции [34]. При значительной задержке в обработке или если анализ образца откладывается, СМЖ должна быть заморожена для сохранения целостности образца.

При вирусных инфекциях ЦНС плеоцитоз обычно умеренный (50–1000 кл./мм<sup>3</sup>) с преимущественно мононуклеарными клетками. Напротив, бактериальный менингит представляет собой нейтрофильный плеоцитоз с общим количеством лейкоцитов  $>1000$  кл./мм<sup>3</sup>. Известно, что в ранней стадии менингита может отмечаться преходящий нейтрофильный плеоцитоз; в 87% случаев при повторной люмбальной пункции в течение 8 ч он переходит в лимфоцитарный плеоцитоз [35]. Даже при очевидных признаках вирусной инфекции необходимо сделать посев СМЖ на бактерии и в некоторых случаях — на грибы и микобактерии, чтобы исключить альтернативную, потенциально излечимую инфекцию [14].

### Прямое микроскопическое исследование СМЖ

Прямое микроскопическое исследование СМЖ имеет ограниченное значение в диагностике вирусных инфекций ЦНС, однако оно является важным этапом для исключения бактерий, микобактерий, дрожжей, плесневых грибов и, иногда, паразитов как возможных возбудителей заболевания. Изредка у больных с рецидивирующей формой асептического менингита («менингит Молларета»), развивающейся при инфицировании HSV-2, можно обнаружить «клетки Молларета» или огромные рыхлые клетки с бледно окрашенной вакуолизированной цитоплазмой, которые могут быть визуализированы. Эти клетки, исходя отнесенные к эндотелиальным клеткам, в настоящее время рассматриваются как активированные макрофаги [36].

### Вирусные культуры СМЖ

Культивирование вирусов (вирусные культуры) СМЖ обычно проводят на четырех клеточных линиях: клетках африканских зеленых мармышек, клетках Vero, амниотических эпителиальных клетках человека и эмбриональных фибробластах кожи человека с ежедневной оценкой цитопатического действия [4]. При доступности метода ПЦР культивирование вирусов, хоть и позволяет получить дополнитель-

ную информацию, обычно не рекомендуется в качестве рутинных исследований при вирусных инфекциях ЦНС [14]. В ретроспективных исследованиях более чем 22 000 вирусных культур ЦНС положительный результат был найден только в 5,7% образцов, а приблизительные расходы системы здравоохранения на эти исследования вылились более чем в миллион долларов [37].

## Серология СМЖ

Определение субарахноидальной продукции антител дает важную диагностическую информацию о вирусах, не относящихся к группе герпетических, и лучше всего изучено для флавивирусных инфекций. Например, присутствие специфичных IgM в СМЖ рассматривается как позитивный диагностический тест при определении вируса лихорадки Западного Нила, хотя не является необходимым в случае острой инфекции, поскольку антитела могут персистировать в СМЖ в течение более 500 дней [38]. Присутствие IgG менее специфично, поскольку они могут пассивно диффундировать через гемато-энцефалический барьер. Измерение отношения титров специфических антител в СМЖ и сыворотке может быть полезным для подтверждения присутствия инфекции в нервной системе или системного инфицирования организма [39, 40].

## Молекулярные исследования СМЖ

Молекулярно-диагностические клинические процедуры на основе амплификации нуклеиновых кислот, такие как ПЦР, обеспечивают быструю диагностику вирусных инфекций ЦНС с высокой чувствительностью и точностью. В табл. 21.5 приводятся случаи применения различных молекулярных методов к определенным возбудителям инфекций ЦНС. ПЦР и различные модификации метода ПЦР, включая ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), мультиплексную ПЦР, каскадную ПЦР, неспецифичную ПЦР и ПЦР в реальном времени, произвели революцию в диагностике и мониторинге вирусных инфекций ЦНС [41–51]. В дополнение к ПЦР метод амплификации, опосредованной транскрипцией (*transcription-mediated amplification*, TMA), или амплификация на основании последовательности нуклеиновых кислот (NASBA) начинается с синтеза молекул ДНК, комплементарных к целевым нуклеиновым кислотам (обычно РНК). Метод NASBA для идентификации энтеровирусов обладает высокой специфичностью и чувствительностью [52, 53]. Другие методы амплификации нуклеиновых кислот, не связанные с ПЦР, включают метод амплификации, с замещением цепей (SDA), лигазную цепную реакцию, технологию циклирующей гибридизационной пробы (СРТ), метод разветвленной ДНК, метод иммунологического захвата гибрида ДНК—РНК с последующей иммунохимической детекцией (метод гибридной ловушки) и технологию Invader. Некоторые методы исследования нашли применение в диагностике вирусных инфекций ЦНС.



Концентрация вирусов в ЦНС обычно низка, поэтому методика предусматривает последующее повышение чувствительности теста при детекции продуктов амплификации и стадии идентификации. Колориметрическая система ПЦР с использованием микротитровочных планшетов и система Invader Plus (Third Wave Technology, Мадисон, шт. Висконсин, США) используют дополнительную амплификацию сигнала на стадии детекции, достигая чувствительности до 10 копий вируса герпеса человека в СМЖ [51, 54, 57]. Разработано оборудование для дуплексной системы ПЦР в реальном времени TaqMan, которая применяется для одновременного обнаружения и дифференцировки в одной пробирке герпесвирусных инфекций человека и энтеровирусных инфекций [42]. Эта система обеспечивает быструю и чувствительную процедуру путем повышения 5'-эндонуклеазной активности Taq-полимеразы. Дифференциация этих двух возбудителей актуальна в течение лета и ранней осени, когда циркулируют энтеровирусы и герпесвирусы. Система GeneXpert Dx (Cepheid, Сан-ивейл, шт. Калифорния, США) полностью интегрирует и автоматизирует приготовление образцов нуклеиновых кислот, амплификацию и ПЦР-детекцию в режиме реального времени. Анализ энтеровируса на основе этой системы, которая обычно используется для быстрой диагностики асептического менингита, недавно получила одобрение FDA. Полная автоматизация и возможность быстрого анализа энтеровирусов идеально подходит для срочного исследования [45].

## **ОЦЕНКА И ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Интерпретация положительных результатов ПЦР-анализа требует корреляции с клиническими проявлениями. Положительный количественный анализ СМЖ показывает, что специфичные нуклеиновые кислоты обнаружены в СМЖ, но не обязательно указывают на наличие острого инфекционного процесса. ПЦР позволяет обнаружить латентные или слабовыраженные персистирующие инфекции, так же как и остро протекающие заболевания [59]. Например, вирус Эпштейна—Барр латентно переживает в макрофагах человека, сохраняя жизнеспособность, и может активироваться в условиях развития другой инфекции ЦНС [60].

Кроме того, молекулярно-диагностические исследования не стандартизованы, что приводит к значительной гетерогенности в методологии проведения анализов. Слепое молекулярно-диагностическое ПЦР-исследование герпесвирусов в девяти европейских референтных лабораториях дало согласованные результаты только в 28–30% случаев исследования [61]. В 8–18% исследуемых образцов показали ложноположительные результаты, остальные могут быть ложноотрицательными или сомнительными из-за недостаточной чувствительности. Аналогичные противоречивые результаты могут быть и в отношении эффективности панелей для энтеровирусов [62].

Таблица 21.5

**Применение молекулярных методов для обнаружения наиболее распространенных возбудителей вирусных инфекций ЦНС**

Микро-организм	Клинические заболевания/нарушения	Пригодность молекулярного метода <sup>a</sup>	Комментарии
Адено-вирусы	Менинго-энцефалит	В	Редко вызывают инфекции ЦНС. Молекулярные исследования СМЖ и ткани мозга, если клинические признаки позволяют подозревать инфекцию (например, кератоконъюнктивит) либо вирусная культура образцов, не относящихся к ЦНС
Арбо-вирусы	Менинго-энцефалит	В	Включает в себя EEE, LAC, SLE, WEE, WNV, VEE, JE, POW, RVF. Серология является методом выбора, хотя ОТ-ПЦР пробы СМЖ играет роль в диагностике энцефалита WNV у лиц с нарушением иммунитета (см. текст)
CMV	Энцефалит, миелит	А	ПЦР СМЖ является тестом выбора. Количественная ПЦР полезна для диагностики первичной CMV-энцефалопатии и анализа последующей ответной реакции на лечение. Есть сообщения о прямой детекции мутаций, связанных с резистентностью
Энтеро-вирусы	Менингит, редко — энцефалит	А	Молекулярный метод является тестом выбора. Statstat, обеспечивающий получение результатов в течение часов, может значительно сократить количество койко-дней (см. текст); одношаговая ПЦР, включая формат в реальном времени, может быть менее чувствительной
Вирус Эпштейна—Барр	Энцефалит, менингит, мозжечковая атакия; первичная лимфома ЦНС	А	Молекулярный метод является тестом выбора. Реактивация EBV или обнаружение латентного вируса в лимфоцитах может привести к положительным результатам ПЦР при ограниченной клинической значимости. Присутствие EBV при развитии двойственной инфекции также имеет неясное значение. Присутствие EBV в СМЖ может навести на мысль о первичной лимфоме ЦНС (см. текст)
Герпес-вирусы HHV-6, HHV-7	Энцефалит	А	Молекулярный метод является тестом выбора. Клиническое значение положительных результатов неопределенное, поскольку может отражать наличие латентного вируса. Энцефалит наиболее ясно показан в случае HHV-6 у больных, перенесших трансплантацию стволовых клеток

Продолжение табл. 21.5

Микро-организм	Клиниче-ские забо-левания/на-рушения	Пригод-ность молеку-лярного метода <sup>a</sup>	Комментарии
Вирус ВИЧ-1	Менинго-энцефалит, миелит	A	Вирусная нагрузка ВИЧ-1 может быть противоречива для крови с СМЖ
HSV-1, HSV-2	Энцефалит, менингит (менингит Моларета)	A	Молекулярный метод является тестом выбора. Одношаговая ПЦР, включая формат в реальном времени, может иметь неадекватную чувствительность
T-лимфо-тропный вирус человека HTLV-1	Миелит	B	Серология является тестом выбора. Молекулярный метод может повысить чувствительность
Вирус гриппа и пара-гриппа	Энцефалит	B	Серология или детекция антигена явля-ется тестом выбора. Большинство случаев энцефалопатии, ассоциированной с ви-русом гриппа, были ПЦР-отрицательны, что позволяет предположить, что пато-физиологические изменения развились не в результате прямой инвазии вируса
JC-поли-омавирус	Прогрес-сирующая многоочаго-вая лейко-энцефалопа-тия	A	Молекулярный метод является тестом выбора. Ложноположительный результат может быть получен в результате высо-кого уровня полиомавируса BKV
Аренави-рус лим-фоци-тарного хориоме-нингита (LCMV)	Менингоэн-цефалит	B <sup>6</sup>	Серология является тестом выбора. Молекулярный метод может повысить чувствительность
Вирус кори	Подострый склерозиру-ющий пан-энцефалит (SSPE)	B	Серология является тестом выбора. Молекулярный метод может повысить чувствительность. Мониторинг вирусной нагрузки позволяет контролировать раз-витие SSPE
Вирус инфек-ционного паротита	Энцефалит, менингит	B	Серология является тестом выбора. Молекулярный метод может повысить чувствительность

Окончание табл. 21.5

Микро-организм	Клиниче-ские забо-левания/на-рушения	Пригод-ность молеку-лярного метода <sup>а</sup>	Комментарии
Парвови-рус В-19	Менингоэн-цефалит	В	ПЦР СМЖ полезна для подтверждения инфицирования у больных с серологиче-ски положительным результатом острой инфекции
Вирус бешен-ства	Энцефалит	В <sup>б</sup>	ПФА или серология являются тестом выбора. Молекулярный метод использу-ется для образцов на наличие инфекции вне ЦНС (см. текст)
Герпес-вирус варицел-ла зостер (VZV)	Менингит, миелит, эн-цефалит	А	Молекулярный метод является тестом выбора, хотя результаты могут быть от-рицательными на поздних стадиях ин-фекции или при васкулите. Кожные про-явления могут отсутствовать (см. текст)
Вирус лихорад-ки За-падного Нила	Энцефалит, миелит	В <sup>б</sup>	Серология на IgM является тестом вы-бора. Молекулярный метод может по-высить чувствительность определения, в частности у больных с нарушением иммунитета
Вирус Нипах и Хенд-ра	Менингит, энцефалит	В	Серология на IgM является тестом вы-бора. Молекулярный метод подтверждает инфекцию ЦНС
<sup>а</sup> А — тест в целом полезен для установления диагноза; В — тест полезен при определенных обстоятельствах для диагностики определенных форм инфекции, описанных в правом столбце таблицы. <sup>б</sup> Молекулярные методы обычно использовались в случаях, ассоциированных с трансплантацией органов от инфицированных доноров			

### Молекулярно-диагностические исследования вне ЦНС

В процессе диагностики целесообразность проведения исследования экстрацеребральных образцов (например, из зева, стула, кожных высыпаний) определяется клиническими признаками и симптомами. Например, ПЦР или антигенное исследование носоглоточного аспирата на наличие вируса гриппа может сопровождаться установлением диагноза на основе респираторных жалоб больного, с соответствующей сезонностью заболевания, неврологическими проявлениями и лихорадкой. Жидкость, полученная из кожных высыпаний, может быть исследована методом прямой флуоресценции антител или ПЦР-методом для диагностики кожной формы VZV или инфекции HSV.

Дополнительное ПЦР-исследование помогает при диагностике, однако положительные результаты не всегда могут быть основанием

для диагноза инфекционного заболевания ЦНС. Например, в процессе острой инфекции энтеровирус может быть выделен из респираторного или желудочно-кишечного тракта, в течение нескольких недель возможна персистенция вирусов в этих экстраневральных участках, и они выявляются в небольшом количестве [63]. В результате этого продолжительного периода выявления энтеровируса идентификация его (или другого вируса) вне ЦНС может быть случайной находкой и интерпретация этих данных должна производиться с осторожностью.

### Биопсия мозга

До развития и широкой доступности метода ПЦР золотым стандартом для диагностики герпетического энцефалита (*herpes simplex encephalitis*, HSE) была биопсия мозга [64]. Амплификационный анализ нуклеиновых кислот при этом синдроме заменил биопсию мозга [5], поскольку в отношении результативности этой инвазивной процедуры по сравнению с альтернативными методами диагностики имеются весьма ограниченные данные [65]. Биопсия мозга может быть показана больным, у которых наблюдается быстрое ухудшение состояния, несмотря на медикаментозное лечение (применение ацикловира) при отрицательном результате неинвазивных методов клинического исследования [14]. В редких случаях, когда проводилась биопсия, наилучший результат был получен при взятии образца из патологического очага, обнаруженного путем томографии или исследования при нейрохирургической операции. Свежая ткань мозга должна быть передана на культивирование вирусов, иммунофлуоресцентный и ПЦР-анализы. Второй образец должен быть помещен в формалин для гистопатологического исследования с дополнительным окрашиванием для выявления возбудителей. Одна из проблем при биопсии мозга — определение оптимального времени для проведения этой процедуры, поскольку наиболее вероятно выявить вирус в начале развития инфекции.

## ВИРУСЫ-ВОЗБУДИТЕЛИ

### Вирусы герпеса

Все члены семейства герпесвирусов человека (HHV) — ДНК-вирусы, которые далее могут быть классифицированы на альфа-, бета- и гамма-вирусы [66]. Хотя многие герпес-вирусы нейротропны, некоторые из них способны быть причиной генерализованных инфекций у определенных групп людей (например, у лиц с нарушением иммунитета) и будут в дальнейшем обсуждаться в других главах. В этой главе обсуждаются вирусы HSV-1 и HSV-2, VZV и EBV, которые могут вызывать осложнения в ЦНС в результате первичной инфекции или реактивации вируса.

## Вирус *Herpes simplex*

### Клинические проявления

Термин «герпес», который относится к 400 г. до н. э. и приписывается Гиппократу, происходит от греческого слова «герпин» («ползучий»). Герпесвирусы могут быть разделены на подтипы HSV-1 и HSV-2 [5]. HSV-1 обычно вызывает повреждение слизистой рта и губ («герпетическая лихорадка»). После острой инфекции вирус переходит в латентную форму и персистирует в тройничном ганглии, где может периодически реактивироваться, вызывая повторяющиеся кожные повреждения периоральной зоны. HSV-2 преимущественно вызывает периодические поражения аногенитальной зоны.

Несмотря на то что оба подтипа могут вызвать неврологические заболевания, спектры клинических проявлений значительно различаются [67]. HSV-энцефалит (HSE) составляет от 10 до 20% всех случаев вирусных энцефалитов в США [68]. За исключением раннего детского возраста, более чем 95% случаев развивается в результате инфицирования HSV-1, а не HSV-2 [5]. HSV-1 вызывает очаговый некротический энцефалит височных долей, больные обычно жалуются на головную боль, повышение температуры, изменения личности, афазию и эпилептические припадки [69]. МРТ предпочтительнее КТ и позволяет обнаружить как монолатеральные, так и билатеральные поражения височных долей [30]. HSV-2, напротив, часто вызывает лимфоцитарный менингит, но редко бывает причиной HSE [70]. Примерно у 20% больных с первичными эпизодами HSV-2 менингита затем развивается рецидивирующий асептический менингит, который раньше назывался менингитом Молларета [71]. У больных обычно резко начинаются лихорадка и менингит с разрешением симптомов в течение трех-четырёх дней без лечения. Обострения могут периодически повторяться в течение многих лет с различными интервалами.

### Лабораторные исследования

**ПЦР-анализ.** ПЦР-анализ спинномозговой жидкости на HSV заменил метод исследования биопсии мозга для диагностики HSE и в настоящее время рекомендуется для всех больных с энцефалитами [14]. Молекулярный анализ имеет преимущество минимальной инвазивности в сочетании с небольшими затратами времени (менее чем один день) при использовании ПЦР в реальном времени или колориметрического иммуоферментного анализа [72]. В лабораториях с хорошо поставленными методами и опытом работы чувствительность ПЦР-анализа спинномозговой жидкости на HSV составляет 100% при специфичности 94% [64]. У новорожденных и детей раннего возраста чувствительность ниже и находится в диапазоне от 75 до 100% [73].

Рекомендуется проводить эмпирическую терапию ацикловиром всех больных при наличии симптомов [14]. Даже при проведении антивирусной терапии не отмечается значительного снижения чув-

ствительности ПЦР-анализа на первой неделе, хотя на второй неделе лечения чувствительность падает до 50% [64]. Обычно эмпирическое назначение ацикловира отменяют, если результаты ПЦР-анализа на HSV отрицательны, этот подход подвергается сомнению в свете сообщений о ложноотрицательных результатах ПЦР СМЖ больных, полученной более чем через 72 ч после появления симптомов [74]. У больных с клиническими проявлениями, позволяющими предположить HSE (например, усиление рисунка височных долей при МРТ), до отмены ацикловира рекомендуется повторное исследование вновь взятых проб СМЖ через 3–7 сут. после появления симптомов [70]. Еще одна причина ложноотрицательных результатов ПЦР-анализа на HSV-инфекцию — наличие большого количества эритроцитов в СМЖ, поскольку порфирин может ингибировать ПЦР при наличии 20 000 копий ДНК HSV [64].

Большая неопределенность сохраняется в отношении оптимального использования ПЦР-анализа для прогностических целей и мониторинга результатов терапии. Были сообщения о возможности количественного анализа HSV в СМЖ как прогностического фактора, однако этот метод нераспространенный и его польза остается неясной [30]. Некоторые крупные специалисты рекомендуют проведение повторного ПЦР-анализа на HSV образца цереброспинальной жидкости, полученной на 10–14 сут. после начала назначения ацикловира с пролонгированием терапии при положительных результатах теста [75]. У новорожденных персистенция вируса, приводящая к выявлению HSV методом ПЦР в конце курса лечения, не может служить прогностическим признаком [76].

ПЦР-анализ HSV часто проводится у больных с предполагаемой инфекцией, но на практике только небольшая доля проб СМЖ дает положительный результат [77]. По этой причине существует интерес к развитию скрининговой системы для повышения эффективности лабораторных исследований. Ретроспективный [78] и проспективный [79] анализы показали низкую результативность исследования проб СМЖ при нормальном уровне белка и лейкоцитов. В то время как возможность применять эти критерии для ограничения лабораторных исследований представляется привлекательной, наличие атипичных случаев неврологических HSV-инфекций при нормальном уровне клеток в СМЖ приводит к необходимости учитывать их при составлении алгоритма скрининговых исследований [80, 81].

**Серологические исследования.** Анализ антител в СМЖ и сыворотке крови имеет минимальное значение при диагностике HSE по разным причинам. Доминирование серотипа IgG HSV-1 у взрослых встречается так часто, что положительный результат анализа имеет ограниченную ценность [70]. Поскольку только треть случаев HSE ассоциированы с первичной инфекцией HSV-1, отсутствие IgM HSV не исключает ее [82]. Обнаружение в СМЖ HSV-антител обычно отсрочено по крайней мере на две недели от начала болезни, и, таким образом, анализ антител в СМЖ не рекомендуется для ранней диа-

гностики при поступлении. Определение антител может играть роль в установлении ретроспективного диагноза, если есть образец СМЖ, взятый в период выздоровления [83]. В редких случаях исследования антител в СМЖ должно также проводиться исследование сыворотки крови, в этом случае отношение уровня титра антител IgG к HSV в СМЖ и сыворотке  $\leq 20$  позволяет предположить субарахноидальную продукцию антител [4].

## Вирус варицелла зостер

### Клинические проявления

Первичное инфицирование вирусом варицеллы (VZV) проявляется в развитии ветряной оспы, которая известна как ветрянка. После инфицирования вирус остается латентным в ганглиях черепных нервов и дорсальных корешков, с реактивацией, вызванной дерматомными поражениями или нарушением иммунитета, приводящей к развитию диссеминированной инфекции герпеса зостер (опоясывающий лишай) [84]. До 1995 г., когда вакцинация против VZV стала широко распространенной, примерно 90% детей до перехода в юношеский возраст переболели первичной инфекцией VZV [85].

Менингоэнцефалиты, развивающиеся при острой инфекции, описаны в литературе прежних лет, однако до распространения ПЦР-анализа осложнения VZV диагностировались лишь на основании периода времени между возникновением типичной сыпи и развитием неврологических симптомов. При широком распространении молекулярной диагностики был идентифицирован широкий спектр клинических неврологических заболеваний, ассоциированных с VZV, часто возникающих без кожных проявлений [1, 85]. В широком исследовании, проведенном в Финляндии, у 174 больных с подтвержденным или вероятным диагнозом VZV-инфекции ЦНС в 27% и 65% случаев развился энцефалит и менингит соответственно без очагов на коже; заболевание получило название *herpes sine herpette* («герпес без сыпи») [86]. В одном исследовании пациентов с нарушением иммунитета был описан случай позднего появления сыпи, через 6 сут. после возникновения признаков и симптомов менингита [87].

Для VZV-инфекции характерно несколько неврологических синдромов. Острая мозжечковая атаксия возникает как осложнение первичной инфекции и не появляется при реактивации вируса [1]. У больных с острой мозжечковой атаксией развивается нарушение координации при ходьбе, нистагм, тошнота, тремор и головная боль, хотя обычно сознание сохранено. Симптомы, как правило, появляются на 10 день после кожной сыпи, однако изредка латентный период между высыпаниями и неврологической симптоматикой может продолжаться до 3 недель [7]. Полное выздоровление обычно наступает в период от нескольких недель до нескольких месяцев.

Другой неврологический синдром связан с опосредованными VZV васкулитами ЦНС, при этом поражаются как крупные, так и мелкие



кровеносные сосуды [84]. При ПЦР обнаруживаются частицы вируса в кровеносных сосудах больных с симптомами энцефалита, а также у больных с острым мозговым инсультом. Например, очаговый гранулематозный артериит крупных сосудов главным образом проявляется у пожилых людей и характеризуется острым очаговым неврологическим дефицитом (двигательным или чувствительным), который развивается в течение недель или месяцев после перенесенного герпетического поражения с противоположной стороны [84]. При этом синдроме были зарегистрированы периодические эпизоды ишемии, смертность составляет примерно 25% [88]. Многоочаговая васкулопатия мелких сосудов представляет собой подострое состояние и развивается, по-видимому, у лиц с нарушениями иммунитета [89, 90].

#### Лабораторные исследования

**ПЦР-анализ.** выбор вида ПЦР для подтверждения VZV очень сильно зависит от характера неврологического синдрома, продолжительности персистенции и иммунного статуса больного. В одном исследовании больных с клиническим подозрением на VZV-инфекцию ЦНС чувствительность ПЦР спинномозговой жидкости на VZV составила 44% у больных с кожными высыпаниями и менингоорадикулоневритом по сравнению с 66% больных с генерализованной сыпью и энцефалитом [91]. Другие исследования показали, что у 25% больных с неврологическими проявлениями, ассоциированными с первичным инфицированием или реактивацией VZV, ПЦР давала положительный результат СМЖ [86]. Среди подгруппы пациентов с первичной инфекцией результат ПЦР был положительным только среди детей младше 10 лет. В небольшом исследовании у детей с острой мозжечковой атаксией в трех из пяти случаев (60%) был положительный результат анализа спинномозговой жидкости на VZV [92]. Количественную ПЦР на VZV делают редко, тем не менее в одном исследовании у больных с менингитом или энцефалитом, развившимся в результате реактивации VZV, были обнаружены более высокие уровни вирусов в СМЖ у больных энцефалитом по сравнению с больными менингитом и этот признак был прогностическим фактором более острого течения болезни [93].

Показано, что важный фактор, определяющий чувствительность ПЦР на VZV, — период времени забора образцов: от начала высыпаний до взятия пробы СМЖ. При герпетической инфекции и менингите ПЦР СМЖ была положительна в 62% образцов, собранных в течение 7 сут. после высыпаний по сравнению с 25% проб, собранных в более поздние сроки — после 7 сут. от появления сыпи [91]. Похожие результаты были получены для первичной VZV-инфекции, для которой ПЦР СМЖ была положительной только в образцах, полученных в течение 9 сут. после кожных проявлений [86]. Диагностический уровень ПЦР СМЖ у больных с VZV-васкулопатией составлял 28% при снижении чувствительности для значительно отсроченных

(в среднем 4,2 мес.) периодов забора образцов между появлением неврологических симптомов и молекулярным исследованием [90].

ДНК варицелла-вирусов может быть амплифицирована из СМЖ в 2,5–7% случаев ВИЧ-инфицированных больных с появлением новых неврологических признаков или симптомов [94, 95]. Значимость этих находок не всегда ясна, поскольку репликация VZV может происходить на фоне других инфекций ЦНС. Это также позволяет предполагать в некоторых случаях субклиническую реактивацию [95]. Кожные проявления различным образом выражены у ВИЧ-инфицированных больных с VZV-инфекций ЦНС [96, 97]. Среди больных с VZV-васкулопатией ПЦР была положительной более чем у половины лиц с нарушениями иммунитета, по сравнению с 10% у больных без поражений иммунной системы [90].

**Серологический анализ.** Серологическая оценка больных с VZV-инфекцией ЦНС применяется для дифференцировки первичной инфекции и реактивации. В то время как кожная форма заболевания предполагает реактивацию вируса, у лиц с нарушениями иммунной системы могут возникать диссеминированный опоясывающий лишай или кожные проявления, такие же как при первичном инфицировании VZV. В этих случаях появление IgM, особенно при отсутствии IgG, позволяет диагностировать новую инфекцию [86].

Измерение уровня антител в СМЖ может играть важную роль в диагностике. Особенно когда существует значительный период времени между проявлениями сыпи и получением образца СМЖ. В то время как антитела в СМЖ определяются только у трети больных с кожным опоясывающим лишаем и менингоорадикулоневритом, среди проб СМЖ, взятых позже семи дней от начала болезни, антитела обнаруживаются у 83% [91]. Это явление еще более выражено у больных с VZV-васкулитами: у 93% были обнаружены IgG в СМЖ, при этом только у четверти из них были положительные результаты VZV ПЦР в СМЖ [90]. Для детей наилучшим методом является сочетание ПЦР с определением IgM. У взрослых ПЦР вместе с измерением уровня продукции антител в СМЖ — наиболее чувствительное сочетание диагностических тестов [86].

## Вирус Эпштейна–Барр

### Клинические проявления

Более 90% взрослых имеют серологические признаки инфицирования вирусом Эпштейна—Барр (EBV) [83]. Наиболее часто инфицирование EBV проявляется в виде инфекционного мононуклеоза, характеризующегося фарингитом, шейной лимфаденопатией и лихорадкой, но в большинстве случаев наблюдается бессимптомная сероконверсия [98]. После острого инфицирования EBV переходит в латентное состояние, персистирует в В-лимфоцитах, симптомы реактивации преимущественно наблюдаются у лиц со значительным нарушением Т-клеточного звена иммунитета [99].

Частота неврологических осложнений при инфицировании EBV остается достаточно низкой (<0,5% от инфицированных) даже при использовании молекулярных методов диагностики [13]. Наиболее частые симптомы: головная боль, ригидность мышц шеи, но они не обязательно предполагают инвазивную неврологическую инфекцию, поскольку часто сопровождают вирусемию. Неврологические осложнения могут возникнуть при острой инфекции или реактивации вируса и включают головную боль при менингите, энцефалит, миелит и острую мозжечковую атаксию [100]. Уникальный неврологический симптомом при EBV-инфекции — сенсорная деформация, известная как «синдром Алисы в Стране чудес», при котором больной воспринимает яркое ощущение растяжения или увеличение размеров тела [101, 102]. Первичная лимфома ЦНС (PCNSL), злокачественная опухоль, которая встречается у ВИЧ-инфицированных больных, развивается в результате реактивации EBV в ЦНС с клональной пролиферацией лимфоцитов [103].

#### Лабораторное исследование

**ПЦР-анализ.** Амплификация ДНК EBV в СМЖ представляет собой диагностическую проблему, поскольку присутствие вируса может отражать как инфекцию ЦНС, так и выявление активированного вируса в результате воспалительного ответа, вызванного другой причиной [59, 83]. Количественное определение вирусной нагрузки может быть полезно для различения инфекции от реактивации, вызванной иным возбудителем, тем не менее точные предельные значения для показателей пока не определены [104]. Неизвестно также, меняет ли течение и клинические симптомы инфекционного заболевания ЦНС, вызванного другим нейротропным возбудителем, присутствие EBV, создающее двойную инфекцию, по сравнению с моноинфекцией.

Значение детекции EBV в СМЖ больных с ВИЧ-инфекцией заслуживает особого внимания. PCNSL была достаточно распространенным осложнением ВИЧ в эру, предшествовавшую высокоактивной антиретровирусной терапии [105]. У ВИЧ-больных амплификация EBV из СМЖ может служить маркером PCNSL при массивных поражениях ЦНС [106] и в качестве прогностического фактора позднего развития PCNSL у больных без поражений мозга [107, 108]. Однако это мнение стало подвергаться критике после получения результатов исследований, показавших, что только у 10–29% ВИЧ-инфицированных больных с неврологией EBV определяется при помощи ПЦР-анализа СМЖ [109–110]. Чувствительность молекулярно-диагностических тестов можно немного увеличить, используя количественную границу отсечения на уровне 10 000 копий/мл [109], но вирусная нагрузка EBV недостоверно различается при PCNSL и EBV-энцефалите [104], и для определенного диагноза PCNSL требуется исследование тканей мозга.

**Серологическое исследование.** Серологический анализ на EBV — сопутствующий метод молекулярного тестирования. Пре-

где чем ПЦР-исследование стало доступным и широко распространенным, серология была единственным методом, позволяющим подтвердить острую EBV-инфекцию у больных с вновь развившимися неврологическими симптомами, многие из которых не имели типичных признаков неврологической патологии и мононуклеоза [111, 112]. Неизвестно, как часто больные с неврологическими осложнениями и серологически подтвержденной острой EBV-инфекцией имеют определяемый уровень вирусной нагрузки в СМЖ [113], но показано, что, по крайней мере, среди взрослых большинство больных с положительным результатом ПЦР на EBV в СМЖ имеют высокий уровень антител при реактивации вируса [59]. Измерение продукции антител в СМЖ в качестве маркера EBV-инфекции в настоящее время в большинстве случаев заменено методом ПЦР [114].

### Арбовирусы

Арбовирусы — это гетерогенная группа возбудителей, которые распространяются путем укусов инфицированных членистоногих (москитов или клещей) [115]. В настоящее время в Северной Америке идентифицировано более чем 60 арбовирусов [116], хотя только шесть из них рассматриваются как значимые патогены, представляющие угрозу здоровью человека в США и подлежащие государственной регистрации инфекции человека. В последнее десятилетие обнаружено, что вирус лихорадки Западного Нила (WNV) является наиболее распространенной причиной эпидемического энцефалита в Западном полушарии. Поскольку показана высокая значимость данного вируса для здравоохранения, существует значительный интерес в развитии молекулярных методов для быстрой диагностики и скрининга. По этой причине WNV будет обсуждаться отдельно от остальных арбовирусов.

#### *Вирус лихорадки Западного Нила*

Вирус лихорадки Западного Нила (WNV) — одноцепочечный РНК-вирус семейства *Flaviviridae*, принадлежащий к серогруппе вирусов японского энцефалита, которая включает также вирус энцефалита Сент-Луис (SLE), японского энцефалита (JE) и вирус энцефалита долины Муррея. WNV передается комарами, некоторые виды птиц служат резервуаром и источником зоонозной инфекции. Люди играют ограниченную роль в цикле передачи, поскольку имеют относительно низкий уровень и короткую продолжительность виремии.

Исторически WNV редко был возбудителем инфекций человека и животных, вызывая отдельные эпидемические вспышки с умеренной лихорадкой и различными неврологическими проявлениями [17]. Начиная с 1990-х гг. был обнаружен более вирулентный подтип, часто приводящий к гибели птиц и ответственный за большое количество вспышек энцефалита у людей в Румынии и Израиле [117]. В 1999 г. группа из пяти больных пожилого возраста, проживавших в одном районе Нью-Йорка, была госпитализирована с энцефалитом, возбуди-

телем которого был штамм WNV 9118. С тех пор в центр по контролю за заболеваниями (CDC) поступило сообщение о более чем 16 000 случаях заболевания, погибло более 600 человек, преимущественно с нейтроинвазивными случаями WNV [17].

### Клинические проявления

Большинство случаев WNV протекают субклинически, однако примерно у 20% инфицированных развивается гриппоподобное заболевание с высокой температурой, ознобом, недомоганием, головной болью, артралгией и миалгией — это состояние называется лихорадкой Западного Нила (WNF) [119]. У половины больных развивается кореподобная или макулопапулезная сыпь, особенно часто у детей [120]. Слабость и недомогание продолжаются в среднем 36 дней после острой инфекции WNF [121].

Примерно у 1 из 150 инфицированных развивается неврологическая форма лихорадки Западного Нила (WNDD), характеризующаяся менингитом, миелитом, энцефалитом либо отдельно либо в сочетании [122]. Острое развитие неврологических нарушений наиболее распространено у пожилых людей и лиц с нарушениями иммунитета [119, 120, 123]. Летальность больных энцефалитом составляет от 4 до 15% и увеличивается с возрастом [17]. Примерно у 60% выживших остаются нарушения в виде утомления, слабости, депрессий, изменений личности, походки и дефицита памяти, продолжающиеся в течение года после острой инфекции [124].

### Лабораторное исследование

**ПЦР-анализ.** Диагностическое значение метода заключается в определении динамики вирусной нагрузки и иммунного ответа на инфекцию. Виремия WNV возникает в течение 1–3 сут. после внедрения вируса, но обычно кратковременна. Общие инфекционные симптомы обычно предшествуют неврологическим проявлениям, которые развиваются в течение 7–9 дней после начала инфекции. В это время вирус исчезает из кровотока [126, 127]. По этой причине основная цель методов амплификации нуклеиновых кислот — скрининг крови доноров при бессимптомном течении, ОТ-ПЦР или транскрипционный метод амплификации (NASBA) могут обнаружить 50 копий вируса/мл [128].

Недавно при изучении крупной вспышки WNV в Канаде было обнаружено, что в 45% образцов плазмы больных WNV присутствует вирус в определяемом количестве [129]. Количество положительных результатов ПЦР на WNV в плазме увеличивалось при проведении исследования в течение 8 дней после появления симптомов. При положительной ПЦР чаще наблюдалось развитие симптомов WNF (36% положительных результатов), чем WNDD (9,5% положительных результатов). Вирусная нагрузка WNV в плазме не коррелировала с продолжительностью развития симптомов или с частотой поражения ЦНС.

Амплификация WNV из СМЖ имеет ограниченную ценность, поскольку только у 57% больных с серологически подтвержденным WNDD были получены в пробах СМЖ положительные результаты в ПЦР в режиме реального времени и 0% образцов были положительны при обычной ПЦР [130]. Исключение — лица с нарушениями иммунитета, которые представляют группу высокого риска неврологических заболеваний и неблагоприятного исхода. Есть сообщения о случаях заболевания с положительным результатом ПЦР в СМЖ после трансплантации и при онкогематологических заболеваниях [131, 132]. В этих случаях вирус в крови и СМЖ может персистировать в течение продолжительного периода времени, с поздним появлением нейтрализующих антител, которые можно определить серологическими методами [133].

**Серологическая оценка.** Исследование сыворотки на наличие специфических IgM при помощи коммерчески доступных наборов для ИФА остается основой диагностики [134]. Обнаружение IgM к WNV в СМЖ при развитии клинически сходных заболеваний с большой степенью достоверности позволяет предположить WNDD. Повышенный уровень IgM в сыворотке также дает основания для диагноза острой инфекции, возрастание титра антител в четыре раза в парных сыворотках считается окончательным лабораторным подтверждением. Обнаружение повышения титра IgM к WNV в единичном образце сыворотки нужно интерпретировать с осторожностью, поскольку IgM могут персистировать в крови более 500 дней после выздоровления [38].

Есть еще одна проблема, связанная с интерпретацией уровня антител: WNV серологически перекрестно реагирует с другими вирусами подгруппы вируса японского энцефалита и родственных флавивирусов, включая вирусы желтой лихорадки и денге. Вероятность перекрестного выявления флавивирусов можно минимизировать путем определения титров IgM против указанных вирусов с учетом анамнеза и истории вакцинации, постановки реакции торможения агглютинации и определения титра нейтрализующих антител против WNV и других флавивирусов [126].

### *Другие арбовирусы*

Другие эндемичные флавивирусы необходимо рассматривать в контексте их географического распространения, особенностей пациента, и в меньшей степени клинических проявлений (табл. 21.6). Например, вирус энцефалита Ла-Кросс (LAC) оказывается возбудителем всех инфекций, вызванных калифорнийской серогруппой в США [135]. Большинство случаев были описаны в штатах Среднего Запада и Средне-Атлантического побережья [1] в течение сезона, характерного для классического арбовирусного энцефалита: от позднего лета до ранней осени. Более 90% характерных инфекций выявлено у детей и подростков младше 15 лет преимущественно мужского пола [116].

Таблица 21.6

Дифференциальные признаки арбовирусов, эндемичных для  
Северной Америки, вызывающих заболевания человека

Вирус	Семейство	Переносчик	Хозяин	Географическое распространение (в Северной Америке)	Примечания
Вирус западного лошадиного энцефалита (WEE)	<i>Togaviridae</i>	Комары <i>Culex tarsalis</i>	Дети чаще, чем взрослые	Запад реки Миссисипи	В ходе эпидемии у многих взрослых происходит бессимптомная сероконверсия
Вирус восточного лошадиного энцефаломиелиита (EEE)	<i>Togaviridae</i>	Комары <i>Culiseta melanura</i>	Взрослые, дети	Восточное побережье океана и побережье Мексиканского залива	Самая высокая летальность среди арбовирусов в Северной Америке
Вирус лихорадки Западного Нила (WNV)	<i>Flaviviridae</i>	Комары <i>Culex</i> sp.	Взрослые, (изредка дети) при возрастании риска неврологического заболевания у лиц пожилого возраста	На всем протяжении континентальных Соединенных Штатов и Канады	Есть сообщения о передаче при лабораторных заражениях, переливании крови и трансплантации органов
Энцефалит Сент-Луис (SLE)	<i>Flaviviridae</i>	Комары <i>Culex</i> sp.	80% случаев энцефалита у людей старше 60 лет	Эндемичен для западных штатов с периодическими вспышками на востоке реки Миссисипи	У больных могут быть уринарные симптомы (например, недержание мочи) на ранней стадии болезни
Вирус энцефалита Повассан (POW)	<i>Flaviviridae</i>	Клещи <i>Ixodes cookei</i>	Дети и подростки, 2/3 мужского пола	Штаты Мэн, Мичиган, Нью-Йорк, Висконсин; Канада	Летальность 10%

Окончание табл. 21.6

Вирус	Семейство	Переносчик	Хозяин	Географическое распространение (в Северной Америке)	Примечания
Вирус Ла-Кросс (LAC), калифорнийская серогруппа	<i>Bunyaviridae</i>	Комары <i>Aedes triseriatis</i>	Наиболее симптоматические инфекции у лиц младше 15 лет	Лесистые участки в бассейне рек Миссисипи и Огайо	Вирус ответственен за почти все случаи инфекционных заболеваний, вызванных калифорнийской серогруппой

Возрастная диспропорция также наблюдается в развитии инфекций, вызванных вирусом энцефалита Сент-Луис (SLE), однако в этом случае 87% случаев наблюдались у больных старше 60 лет [1] и летальность у заболевших старше 70 лет достигала 25% [136]. SLE характеризуется эпидемическим подъемом на фоне низкого уровня заболевания. Последняя вспышка произошла в 1993 г., сообщено было о 1095 случаях заболевания с 201 случаем смерти [136]. Недавно было опубликовано сообщение о спорадических случаях инфекции SLE в летний и осенний периоды почти во всех регионах США.

Вирус восточного лошадиного энцефаломиелита (*eastern equine encephalitis*, ЕЕЕ) вызывает наиболее острые заболевания ЦНС и обладает самой высокой летальностью из всех арбовирусов Северной Америки [1, 137]. С 1955 г. ежегодно возникает менее 36 случаев заболеваний ЕЕЕ [116], наиболее часто на северном побережье Мексиканского залива и Средне-Атлантическом побережье [138]. Географическая вариабельность между западным лошадиным энцефаломиелитом (WEE) и ЕЕЕ прямо связана с распространением основных переносчиков вирусов [139]. Вирус WEE редко вызывает энцефалит, в период между 1987 и 2002 гг. было описано только семь случаев, преимущественно у детей [1]. Хотя смертность от WEE остается низкой (3–4%), частота осложнений в виде эпилептического синдрома и замедленного развития остается значительной [140].

По сравнению с вышеупомянутыми арбовирусами, которые передаются комарами, переносчики вируса Повассан — иксодовые клещи. Согласно информации Центра по контролю и профилактике заболеваний (Подразделение трансмиссивных инфекций) сообщалось о 12 подтвержденных или возможных случаях инфекций, вызванных вирусом Повассан, причем все они были в штатах Мэн, Мичиган, Нью-Йорк и Висконсин. Это может отражать как редкость данной инфекции, так и, что более вероятно, редкость выявления данного возбудителя.



## Лабораторное исследование

**ПЦР-анализ.** Для многих медицински значимых арбовирусов разработан высокочувствительный амплификационный метод исследования нуклеиновых кислот. Однако его роль более значима в научных целях, чем в рутинной диагностике [138]. Главный фактор, лимитирующий применение ПЦР, — относительно короткий период виремии и низкий уровень вирусов при генерализованной инфекции или поражении ЦНС. Частота этих инфекций среди заболеваний ЦНС так мала, что крупномасштабные проспективные исследования не проводятся [141]. Пробы СМЖ наиболее широко изучались методом ОТ-ПЦР для выявления вирусов семейства *Bunyaviridae*, особенно вируса Ла-Кросс [142, 143], но этот тест не применяется широко и редко бывает подтвержден клиническими данными.

**Серологическое исследование.** Главный метод диагностических исследований на арбовирусы, не относящиеся к WNV, — определение антител в сыворотке. Повышение титра IgG и IgM в однократных образцах сыворотки при наличии клинических признаков позволяет предположить инфекцию. Четырехкратное повышение уровня антител в парных сыворотках можно рассматривать как диагностический критерий инфекции [144]. Как обсуждалось в предыдущем разделе, вирус SLE перекрестно реагирует с WNV, поэтому для дифференциальной диагностики требуются дополнительные исследования.

## Энтеровирусы

До 1960-х гг. таксономия энтеровирусов основывалась на человеческих и животных моделях (эховирусы (ECHO), коксакивирусы групп А и В и полиовирусы). Перекрытие между группами привело к путанице и последующему объединению этих групп в один род *Enterovirus*, включающий пять групп, содержащих более 80 пронумерованных подтипов (например, *enterovirus 71*) [145, 146]. Было показано, что два первых представителя этого рода — эховирусы 22 и 23, которые были переименованы как парэховирусы человека 1 и 2, — вызывают менингиты у детей младшего возраста [147]. Человек является единственным естественным хозяином энтеровирусов, главный путь передачи вирусов от человека к человеку — фекально-оральный [1].

### Клинические проявления

Клинические синдромы, характерные для энтеровирусов, находятся в диапазоне от мягкого проявления с умеренным повышением температуры до тяжелого течения с потенциально смертельным исходом. Энтеровирусная инфекция остается наиболее распространенной причиной асептического менингита в США, составляя от 80 до 92% подтвержденных случаев заболеваний [13] с сезонным распространением с июня по октябрь [148]. У подростков и взрослых могут возникать

различные симптомы, такие как миалгия, головная боль, тошнота, анорексия и экзантемы. Лихорадка может быть двухфазной; вначале соответствует вирусемии, а затем вновь возникает на фоне появления неврологической симптоматики [1].

В то время как асептический менингит, вызванный неполиома-энтеровирусами, протекает нетяжело, изредка эти вирусы могут быть причиной тяжелых, угрожающих жизни инфекций — энцефалита, паралича, миоперикардита и сепсиса новорожденных [148]. Недавняя вспышка инфекций, вызванных энтеровирусом 71 в Юго-Восточной Азии, протекала в форме стволового энцефалита у детей и была причиной высокой летальности и значительных нарушений когнитивных функций среди выживших [149, 150].

### Лабораторная диагностика

**ПЦР-анализ.** Полимеразная цепная реакция на основе специфичной обратной транскриптазы (ЭВ-ПЦР) имеет чувствительность и специфичность, достигающие 100%. При помощи нового колориметрического метода этот анализ может обеспечить результаты в течение примерно 5 ч [48]. Внедрение ПЦР привело к сокращению расходов на лечение в связи с уменьшением сроков пребывания в больнице и на диагностические исследования у детей с подтвержденным энтеровирусным менингитом [13, 151]. Мишень большинства ЭВ-ПЦР систем — высоко консервативный 5'-нетранслируемый участок (NTR), позволяющий амплифицировать все энтеровирусы человека [152]. Недостаток этого метода в том, что для дальнейшего типирования возбудителя необходимо секвенирование, а это редко осуществляется в клинике и может препятствовать ранней диагностике очага заболевания.

Окончательный диагноз энтеровирусного менингоэнцефалита устанавливается при обнаружении вируса в образце СМЖ или в других образцах (кровь, моча, мазок из зева), при наличии характерных клинических признаков, даже если получение образца СМЖ невозможно. В одном исследовании у 34 больных с диагнозом энтеровирусного менингита, поставленного на основе выделения вируса и/или обнаружения антител, специфичность и чувствительность ПЦР фекалий составила 93% [63]. Сообщалось также, что в этой группе больных ПЦР диагностики СМЖ была значительно ниже для образцов, полученных позже 2 сут. после появления симптомов. Эти данные прежде не были опубликованы. Преимущества исследования ректального мазка включают в себя высокую энтеровирусную нагрузку в стуле, а также продолжительный период выделения вируса в желудочно-кишечном тракте, где он может персистировать более двух недель [153]. Иногда ПЦР проб фекалий дает ложноположительный результат у больных с перенесенным прежде гастроэнтеритом, притом что неврологические нарушения могут быть вызваны другим возбудителем.

## Бешенство

Вирус бешенства — РНК-рабдовирус, который, как первоначально считалось, передается исключительно при укусе инфицированными животными. Начиная с начала 1980-х гг. был зарегистрирован прямой механизм передачи (аэрозольный путь передачи вируса, нераспознанное точечное ранение, нанесенное летучей мышью), что побудило CDC изменить рекомендации для профилактики после вероятного инфицирования. Была также показана передача инфекции при пересадке органов [155]. Согласно ВОЗ, во всем мире зарегистрировано примерно 55 000 случаев бешенства главным образом при укусах диких животных (в частности, собак). В течение последних 20 лет ежегодно в среднем отмечается от одного до трех случаев заболеваний бешенством в США [156].

### *Клинические проявления*

Бешенство у человека может проявляться в двух основных формах: в виде энцефалита или буйного бешенства (80–85%) и более редкой паралитической форме (тихое бешенство). Первые клинические синдромы — головная боль, повышение температуры, недомогание, тошнота и рвота, которые могут не отличаться от любых других форм энцефалита или совпадают с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Больные часто жалуются на парестезию в области попадания вируса. Этот предвестник болезни может продолжаться около двух дней до развития острого неврологического синдрома, который в начале проявляется в обильном слюноотечении, возбуждении, водобоязни, ригидности затылочных мышц шеи, затем присоединяются симптомы вовлечения в процесс вегетативной нервной системы [157]. После появления симптомов поражения ЦНС антирабическая вакцина или антирабический иммуноглобулин (RIG) уже неэффективны. Смерть наступает обычно в течение одной-двух недель от начала проявления симптомов.

### *Лабораторная диагностика*

**ПЦР-анализ.** В идеале диагноз бешенства должен быть установлен прижизненно для оценки прогноза и улучшения качества обследования и лечения контактных лиц. По той причине, что диагностические исследования проводятся только в специализированных лабораториях, все случаи подозрения на бешенство, должны быть координированы государственными органами эпидемиологического контроля. Небольшое количество исследований по оценке вируса бешенства в СМЖ и слюне у больных с подтвержденным методом ПЦР диагнозом бешенства, показали, что чувствительность метода составляет 9% и 30% соответственно [158]. Чувствительность определения вируса бешенства в пробах слюны обычной ПРЦ — 37%, а ОТ-ПРЦ — 75% [159].

**Серологическая оценка.** Для диагностики может потребоваться комбинация нескольких методов оценки различных образцов тканей, поскольку чувствительности отдельного теста недостаточно для установления прижизненного диагноза. Ретроспективный обзор различных методов указывает на наибольшую чувствительность определения антигена методом иммунофлуоресценции в коже задней поверхности шеи (69%), затем следует выявление антител в сыворотке (14%), в СМЖ (21%) и иммунофлуоресценция отпечатков роговицы (14%) [158]. Позже в ходе развития болезни может быть обнаружена сероконверсия антигена, поэтому можно провести серию исследований образцов [160].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирусные инфекции ЦНС — важная причина тяжелых заболеваний с высокой летальностью. Из-за низкого уровня идентификации возбудителей требуются быстрые и эффективные диагностические методы, позволяющие улучшить и ускорить диагностику, они помогают оценить прогноз и принять клиническое решение, а также быстро мобилизовать ресурсы общественного здравоохранения для предотвращения распространения арбовирусных инфекций или бешенства. Поскольку эпидемиология вирусных заболеваний ЦНС продолжает сдвигаться в сторону болезней, контролируемых с помощью вакцинации, и возникновения новых инфекций, для разработки эффективного и быстрого подхода к диагностике необходимо координированное взаимодействие клиницистов и сотрудников лабораторий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: Traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003; 14(2):72–82.
2. Coyle PK. Overview of acute and chronic meningitis. *Neurol Clin* 1999; 17(4): 691–710.
3. Fitch MT, van de Beek D. Emergency diagnosis and treatment of adult meningitis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(3):191–200.
4. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, et al. Viral encephalitis: A review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12(5):331–343.
5. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: Adolescents and adults. *Antiviral Res* 2006; 71(2-3):141–148.
6. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gildea DH. Varicella-Zoster virus infections of the nervous system: Clinical and pathologic correlates. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125(6):770–780.
7. Connolly AM, Dodson WE, Prensky AL, et al. Course and outcome of acute cerebellar ataxia. *Ann Neurol* 1994; 35(6):673–679.
8. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al. Beyond viruses: Clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2006; 43(12):1565–1577.

9. Beghi E, Nicolosi A, Kurland LT, et al. Encephalitis and aseptic meningitis, Olmsted County, Minnesota, 1950–1981:1. *Epidemiology. Ann Neurol* 1984; 16(3):283–294.
10. Khetsauriani N, Holman RC, Anderson LJ. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988–1997. *Clin Infect Dis* 2002; 35(2):175–182.
11. Rantala H, Uhari M. Occurrence of childhood encephalitis: A population-based study. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8(7):426–430.
12. Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolioenterovirus in the United States, 1970–1983. *J Infect Dis* 1986; 153(2):346–351.
13. Ramers C, Billman G, Hartin M, et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000; 283(20):2680–2685.
14. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, et al. The management of encephalitis: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 47(3):303–327.
15. Koskiniemi M, Vaheri A. Effect of measles, mumps, rubella vaccination on pattern of encephalitis in children. *Lancet* 1989; i(8628):31–34.
16. Barnes DW, Whitley RJ. CNS diseases associated with varicella zoster virus and herpes simplex virus infection. *Pathogenesis and current therapy. Neurol Clin* 1986; 4(1):265–283.
17. Gubler DJ. The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1039–1046.
18. Koskiniemi M, Rantalaiho T, Piiparinen H, et al. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: A collaborative study from Finland. *J Neurovirol* 2001; 7(5):400–408.
19. Khetsauriani N, Holman RC, Lamonte-Fowlkes AC, et al. Trends in encephalitis-associated deaths in the United States. *Epidemiol Infect* 2007; 135(4):583–591.
20. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, et al. In search of encephalitis etiologies: Diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998–2000. *Clin Infect Dis* 2003; 36(6):731–742.
21. Jolles S, Sewell WA, Leighton C. Drug-induced aseptic meningitis: Diagnosis and management. *Drug Saf* 2000; 22(3):215–226.
22. Solomon T, Hart LJ, Beeching NJ. Viral encephalitis: A clinician's guide. *Pract Neurol* 2007; 7(5): 288–305.
23. Garg RK. Acute disseminated encephalomyelitis. *Postgrad Med J* 2003; 79(927):11–17.
24. Young NP, Weinschenker BG, Lucchinetti CF. Acute disseminated encephalomyelitis: Current understanding and controversies. *Semin Neurol* 2008; 28(1):84–94.
25. Johnson RT. Acute encephalitis. *Clin Infect Dis* 1996; 23(2):219–224; quiz 25–26.
26. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(9):1267–1284.
27. Marchbank ND, Howlett DC, Sallomi DF, et al. Magnetic resonance imaging is preferred in diagnosing suspected cerebral infections. *BMJ* 2000; 320(7228): 187–188.
28. Dale RC, de Sousa C, Chong WK, et al. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 2000; 123 (Pt 12):2407–2422.

29. Maschke M, Kastrup O, Forsting M, et al. Update on neuroimaging in infectious central nervous system disease. *Curr Opin Neurol* 2004; 17(4):475–480.
30. Domingues RB, Fink MC, Tsanaclis AM, et al. Diagnosis of herpes simplex encephalitis by magnetic resonance imaging and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1998; 157(2):148–153.
31. de Almeida SM, Nogueira MB, Raboni SM, et al. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(5):489–495.
32. Spanos A, Harrell FE Jr., Durack DT. Differential diagnosis of acute meningitis. An analysis of the predictive value of initial observations. *JAMA* 1989; 262(19):2700–2707.
33. Bonadio WA. The cerebrospinal fluid: Physiologic aspects and alterations associated with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(6):423–431.
34. Steele RW, Manner DJ, O'Brien MD, et al. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5):965–966.
35. Feigin RD, Shackelford PG. Value of repeat lumbar puncture in the differential diagnosis of meningitis. *N Engl J Med* 1973; 289(11):571–574.
36. Ginsberg L. Difficult and recurrent meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75 (suppl 1): i16–121.
37. Polage CR, Petti CA. Assessment of the utility of viral culture of cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis* 2006; 43(12):1578–1579.
38. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(3):376–379.
39. Denne C, Kleines M, Dieckhofer A, et al. Intrathecal synthesis of anti-viral antibodies in pediatric patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11 (1):29–34.
40. Monteyne P, Albert F, Weissbrich B, et al. The detection of intrathecal synthesis of anti-herpes simplex IgG antibodies: Comparison between an antigen-mediated immunoblotting technique and antibody index calculations. European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Med Virol* 1997; 53(4):324–331.
41. Ahmed A, Brito F, Goto C, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of enteroviral meningitis in infancy. *J Pediatr* 1997; 131(3):393–397.
42. Doong H, Xu J, McCormac M, et al. Duplex eQ-PCR for simultaneous detection and differentiation of herpes simplex viruses and enteroviruses in cerebrospinal fluid. In: 108th General Meeting of the American Society for Microbiology Boston, Massachusetts, 2008.
43. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19 (1):165–256.
44. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 2002; 100 (1–2):27–35.
45. Kost CB, Rogers B, Oberste MS, et al. Multicenter beta trial of the GeneXpert Enterovirus assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1081–1086.
46. Powell KF, Anderson NE, Frith RW, et al. Non-invasive diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990; 335(8685) 357–358.
47. Rabenau HF, Clarici A, Mihlbauer G, et al. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and real-time fluorescence PCR. *J Clin Virol* 2002; 25(2):155–164.

48. Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32(10):2590-2592.
49. Rouah E, Rogers BB, Wilson DR, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in primary central nervous system lymphomas by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hum Pathol* 1990; 21(5) 545-550.
50. Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, et al. Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990; 335(8687):440-441.
51. Tang YW, Rys PN, Rutledge BJ, et al. Comparative evaluation of colorimetric microtiter plate systems for detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9):2714-2717.
52. Fox JD, Han S, Samuelson A, et al. Development and evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) for diagnosis of enterovirus infections using the NucliSens Basic Kit. *J Clin Virol* 2002; 24(1-2):117-130.
53. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Real-time nucleic acid sequence-based amplification using molecular beacons for detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7):3136-3139.
54. Allawi HT, Li H, Sander T, et al. Invader plus method detects herpes simplex virus in cerebrospinal fluid and simultaneously differentiates types 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3443-3447.
55. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4):903-925, table of contents.
56. van der Meer JT, Drew WL, Bowden RA, et al. Summary of the International Consensus Symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis and cytomegalovirus infection. *Antiviral Res* 1996; 32(3):119-140.
57. Mantero G, Zonaro A, Albertini A, et al. DNA enzyme immunoassay: General method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem* 1991; 37(3):422-429.
58. Kleinschmidt-DeMasters BK, DeBiasi RL, Tyler KL. Polymerase chain reaction as a diagnostic adjunct in herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 2001; 11(4):452-464.
59. Weinberg A, Bloch KC, Li S, et al. Dual infections of the central nervous system with Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 2005; 191(2):234-237.
60. Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, et al. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol* 2006; 35(3):257-263.
61. Schloss L, van Loon AM, Cinque P, et al. An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J Clin Virol* 2003; 28(2):175-185.
62. Van Vliet KE, Muir P, Echevarria JM, et al. Multicenter proficiency testing of nucleic acid amplification methods for the detection of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9):3390-3392.
63. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpaa R, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid, stool, and serum specimens. *Clin Infect Dis* 2005; 40(7):982-987.
64. Lakeman FD, Whitley RJ; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 1995; 171(4):857-863.

65. Whitley RJ, Cobbs CG, Alford CA Jr., et al; NIAD Collaborative Antiviral Study Group. Diseases that mimic herpes simplex encephalitis. Diagnosis, presentation, and outcome. *JAMA* 1989; 262(2): 234-239.
66. Mori I, НГибридизация in situ yama Y. Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: Why do these human alpha-herpesviruses behave so differently from one another? *Rev Med Virol* 2005; 15(6):393-406.
67. O'Sullivan CE, Aksamit AJ, Harrington JR, et al. Clinical spectrum and laboratory characteristics associated with detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid. *Mayo Clin Proc* 2003; 78(11):1347-1352.
68. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (2). *N Engl J Med* 1986; 314(12):749-757.
69. Whitley RJ, Soong SJ, Linneman C Jr., et al. Herpes simplex encephalitis. Clinical Assessment. *JAMA* 1982; 247(3):317-320.
70. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: Encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* 2004; 11 (suppl 2):57A-64A.
71. Bergstrom T, Vahlne A, Alestig K, et al. Primary and recurrent herpes simplex virus type 2-induced meningitis. *J Infect Dis* 1990; 162(2):322-330.
72. Tang YW. Laboratory Diagnosis of CNS Infections by Molecular Amplification Techniques. *Expert Opin Med Diagn* 2007; 1 (4):489-509.
73. Kimberlin DW, Lakeman FD, Arvin AM, et al; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. *J Infect Dis* 1996; 174(6):1162-1167.
74. Weil AA, Glaser CA, Amad Z, et al. Patients with suspected herpes simplex encephalitis: Rethinking an initial negative polymerase chain reaction result. *Clin Infect Dis* 2002; 34(8):1154-1157.
75. Cinque P, Cleator GM, Weber T, et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected herpes simplex encephalitis: A consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61(4):339-345.
76. Malm G, Forsgren M. Neonatal herpes simplex virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 81(1):F24-F29.
77. Simko JP, Caliendo AM, Hogle K, et al. Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex virus (HSV) documented by detection of HSV DNA. *Clin Infect Dis* 2002; 35(4):414-419.
78. Tang YW, Hibbs JR, Tau KR, et al. Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. *Clin Infect Dis* 1999; 29(4):803-806.
79. Hanson KE, Alexander BD, Woods C, et al. Validation of laboratory screening criteria for herpes simplex virus testing of cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3):721-724.
80. Fodor PA, Levin MJ, Weinberg A, et al. Atypical herpes simplex virus encephalitis diagnosed by PCR amplification of viral DNA from CSF. *Neurology* 1998; 51(2) 554-559.
81. Auyeung P, Dunn A. Atypical case of Herpes simplex encephalitis. *Intern Med J* 2008; 38(4):294-295.
82. Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine AN, et al. Herpes simplex virus encephalitis: Laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis* 1982; 145(6):829-836.



83. Gilden DH, Mahalingam R, Cohrs RJ, et al. Herpesvirus infections of the nervous system. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3(2):82-94.
84. Gilden DH, Kleinschmidt-DeMasters BK, LaGuardia JJ, et al. Neurologic complications of the reactivation of varicella-zoster virus. *N Engl J Med* 2000; 342(9):635-645.
85. Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: Herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol* 2007; 6(11):1015-1028.
86. Koskiniemi M, Piiparinen H, Rantalaiho T, et al. Acute central nervous system complications in varicella zoster virus infections. *J Clin Virol* 2002; 25(3):293-301.
87. Ihekweba UK, Kudesia G, McKendrick MW. Clinical features of viral meningitis in adults: Significant differences in cerebrospinal fluid findings among herpes simplex virus, varicella zoster virus, and enterovirus infections. *Clin Infect Dis* 2008; 47(6):783-789.
88. Hilt DC, Buchholz D, Krumholz A, et al. Herpes zoster ophthalmicus and delayed contralateral hemiparesis caused by cerebral angiitis: Diagnosis and management approaches. *Ann Neurol* 1983; 14(5) 543-553.
89. Gilden D. Varicella zoster virus and central nervous system syndromes. *Herpes* 2004; 11 (suppl 2):89A-94A.
90. Nagel MA, Cohrs RJ, Mahalingam R, et al. The varicella zoster virus vasculopathies: Clinical, CSF, imaging, and virologic features. *Neurology* 2008; 70(11):853-860.
91. Gregoire SM, van Pesch V, Goffette S, et al. Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(8):938-942.
92. Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, et al. Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes zoster. *J Clin Microbiol* 1991; 29(7):1513-1516.
93. Aberle SW, Aberle JH, Steininger C, et al. Quantitative real time PCR detection of Varicella-zoster virus DNA in cerebrospinal fluid in patients with neurological disease. *Med Microbiol Immunol* 2005; 194 (1-2):7-12.
94. Burke DG, Kalayjian RC, Vann VR, et al. Polymerase chain reaction detection and clinical significance of varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1997; 176(4):1080-1084.
95. Cinque P, Bossolasco S, Vago L, et al. Varicella-zoster virus (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with human immunodeficiency virus: VZV disease of the central nervous system or subclinical reactivation of VZV infection? *Clin Infect Dis* 1997; 25(3):634-639.
96. Iten A, Chatelard P, Vuadens P, et al. Impact of cerebrospinal fluid PCR on the management of HIV-infected patients with varicella-zoster virus infection of the central nervous system. *J Neurovirol* 1999; 5(2):172-180.
97. De La Blanchardiere A, Rozenberg F, Caumes E, et al. Neurological complications of varicella-zoster virus infection in adults with human immunodeficiency virus infection. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(3):263-269.
98. Crawford DH, Macsween KF, Higgins CD, et al. A cohort study among university students: Identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43(3):276-282.

99. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, et al. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: Biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 1993; 118 (1):45–58.
100. Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *BrainPathol* 2001; 11(4):440–451.
101. Evans RW. Case studies of uncommon headaches. *Neurol Clin* 2006; 24(2):347–362.
102. Liaw SB, Shen EY. Alice in Wonderland syndrome as a presenting symptom of EBV infection. *Pediatr Neurol* 1991; 7(6):464–466.
103. Hochberg FH, Miller G, Schooley RT, et al. Central-nervous-system lymphoma related to Epstein-Barr virus. *N Engl J Med* 1983; 309(13):745–748.
104. Weinberg A, Li S, Palmer M, et al. Quantitative CSF PCR in Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Ann Neurol* 2002; 52(5) 543–548.
105. Cinque P, Scarpellini P, Vago L, et al. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: Cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS* 1997; 11(1): 1–17.
106. Cinque P, Vago L, Dahl H, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996; 10(9):951–958.
107. Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993; 342(8868) 398–401.
108. al-Shahi R, Bower M, Nelson MR, et al. Cerebrospinal fluid Epstein-Barr virus detection preceding HIV-associated primary central nervous system lymphoma by 17 months. *J Neurol* 2000; 247(6): 471–172.
109. Corcoran C, Rebe K, van der Plas H, et al. The predictive value of cerebrospinal fluid Epstein-Barr viral load as a marker of primary central nervous system lymphoma in HIV-infected persons. *J Clin Virol* 2008; 42(4):433–436.
110. Ivers LC, Kim AY, Sax PE. Predictive value of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid for detection of Epstein-Barr virus to establish in situ the diagnosis of HIV-related primary central nervous system lymphoma. *Clin Infect Dis* 2004; 38(11):1629–1632.
111. Grose C, Henle W, Henle G, et al. Primary Epstein-Barr-virus infections in acute neurologic diseases. *N Engl J Med* 1975; 292(8) 392–395.
112. Domachowske JB, Cunningham CK, Cummings DL, et al. Acute manifestations and neurologic sequelae of Epstein-Barr virus encephalitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(10):871–875.
113. Imai S, Usui N, Sugiura M, et al. Epstein-Barr virus genomic sequences and specific antibodies in cerebrospinal fluid in children with neurologic complications of acute and reactivated EBV infections. *J Med Virol* 1993; 40(4):278–284.
114. Joncas JH, Chicoine L, Thivierge F, et al. Epstein-Barr virus antibodies in the cerebrospinal fluid. A case of infectious mononucleosis with encephalitis. *Am J Dis Child* 1974; 127(2):282–285.
115. Anonymous. Arboviral infections of the central nervous system—United States, 1996–1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 47(25) 517–522.
116. CalГибридизация in situ CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(1):89–116.
117. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286(5448):2333–2337.

118. Nash D, Mostashari F, Fine A, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344(24):1807-1814.
119. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371(9611) 500-509.
120. Johnson RT. Emerging viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 2003; 9(2):140-147.
121. Watson JT, Pertel PE, Jones RC, et al. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* 2004; 141(5) 360-365.
122. Voelker R. Effects of West Nile virus may persist. *JAMA* 2008; 299(18):2135-2136.
123. Chowers MY, Lang R, Nassar F, et al. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4):675-678.
124. Murray KO, Sierra M, Resnick M, et al. Long-term Clinical Sequelae and Rates of Recovery Following Infection with West Nile Virus. In: International Conference on Emerging Infectious Diseases, March 17, 2008, Atlanta, Georgia, U.S.A.
125. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 2007; 25(30) 5563-5576.
126. Tyler KL. West Nile virus infection in the United States. *Arch Neurol* 2004; 61(8):1190-1195.
127. Hindiyeh M, Shulman LM, Mendelson E, et al. Isolation and characterization of West Nile virus from the blood of viremic patients during the 2000 outbreak in Israel. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(4): 748-750.
128. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med* 2005; 353(5):460-467.
129. Tilley PA, Fox JD, Jayaraman GC, et al. Nucleic acid testing for West Nile virus RNA in plasma enhances rapid diagnosis of acute infection in symptomatic patients. *J Infect Dis* 2006; 193(10):1361-1364.
130. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4066-4071.
131. Hiatt B, Desjardin L, Carter T, et al. A fatal case of West Nile virus infection in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis* 2003; 37(9):e129-e131.
132. Huang C, Slater B, Rudd R, et al. First isolation of West Nile virus from a patient with encephalitis in the United States. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(12):1367-1371.
133. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 348(22):2196-2203.
134. Petersen LR, Marfin AA, Gubler DJ. West Nile virus. *JAMA* 2003; 290(4) 524-528.
135. Roos KL. Encephalitis. *Neurol Clin* 1999; 17(4):813-833.
136. Day JF. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: Lessons from recent, and not so recent, outbreaks. *Annu Rev Entomol* 2001; 46:111-138.
137. Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: Familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 2002; 359(9305) 507-513.
138. Bloch KC, Glaser C. Diagnostic approaches for patients with suspected encephalitis. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9(4):315-322.
139. Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (1):379-385.

140. Bale JF Jr. Viral encephalitis. *Med Clin North Am* 1993; 77 (1):25–42.
141. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: The role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3):691–696.
142. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2003; 26 (1):1–28.
143. Lambert AJ, Nasci RS, Cropp BC, et al. Nucleic acid amplification assays for detection of La Crosse virus RNA. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4):1885–1889.
144. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Recomm Rep* 1997; 46 (RR-10): 1–55.
145. Khetsauriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, et al. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55(8): 1–20.
146. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and New Enteroviruses, 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
147. Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsis like illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 2008; 47(3) 358–363.
148. Anonymous. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity—United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52(32):761–764.
149. Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 1999; 341(13):936–942.
150. Chang LY, Huang LM, Gau SS, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 2007; 356(12):1226–1234.
151. King RL, Lorch SA, Cohen DM, et al. Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. *Pediatrics* 2007; 120(3):489–496.
152. Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, et al. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol* 2008; 43(2):207–211.
153. Chung PW, Huang YC, Chang LY, et al. Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34(3):167–170.
154. Anonymous. Human rabies prevention—United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1999; 48:1–21.
155. Lapiere V, Tiberghien P. Transmission of rabies from an organ donor. *N Engl J Med* 2005; 352(24):2552; author reply.
156. Fishbein in situbein DB, Robinson LE. Rabies. *N Engl J Med* 1993; 329(22):1632–1638.
157. Hankins DG, Rosekrans JA. Overview, prevention, and treatment of rabies. *Mayo Clin Proc* 2004; 79(5):671–676.
158. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, et al. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36(4):1117–1121.
159. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, et al. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol* 2006; 36 (1):17–23.
160. Anonymous. Human rabies—Tennessee, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51(37):828–829.

## 22 ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

### **А. Уолд**

Anna Wald, Departments of Medicine, Laboratory Medicine, Epidemiology, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.

### **П.Е. Грэвитт**

Patti E. Gravitt, Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, U.S.A.

### **Р.А. Морроу**

Rhoda A. Morrow, Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Seattle Children's, Seattle, Washington, U.S.A.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Инфекции, вызванные вирусом простого герпеса (HSV) и вирусом папилломы человека (HPV), самые распространенные вирусные заболевания, передающиеся половым путем. Несмотря на то что половые отношения наиболее распространенный путь передачи обоих типов вирусов, HSV и HPV дают различные клинические проявления и требуют различных подходов для лабораторной диагностики. Таким образом, эти две инфекции будут обсуждаться по отдельности. Также в данной главе бегло обсуждается контагиозный моллюск — вирусная кожная инфекция без серьезных осложнений для человека, которая часто поражает генитальную область.

HSV и HPV не единственные вирусные возбудители, передающиеся половым путем. Во всем мире половой путь — важнейший способ передачи гепатита В и ВИЧ; эти инфекции подробно описаны в гл. 19 и 23. Гепатит С и гепатит А также могут передаваться половым путем, хотя ни для одного из этих вирусов он не является ведущим (гл. 19).

## **ВИРУС ПРОСТОГО ГЕРПЕСА**

### **Клинические проявления**

Вирусы простого герпеса (HSV) типов 1 и 2 относятся к повсеместно распространенным инфекциям человека. Оба типа являются альфа-герпесвирусами и вызывают синдромы, которые не отличаются друг от друга без дополнительной лабораторной диагностики, несмотря на определенные особенности клинических проявлений. В табл. 22.1 показаны клинические синдромы, характерные для HSV-1 и HSV-2.

Таблица 22.1

**Предрасположенность различных типов HSV  
к развитию клинических синдромов**

Синдром	HSV-1	HSV-2
Генитальный герпес, первичный эпизод	+++	+++
Рецидивирующий генитальный герпес	+	+++
Оролабиальный герпес	+++	+
HSV-энцефалит	+++	
HSV-менингит	+	+++
Неонатальный герпес	++	++
Герпес спортсменов-борцов ( <i>herpes gladiatorum</i> )	++	
HSV-кератит/ирит	+++	
Острый некротический ретинит	+	++
Панариций	+	++

Генитальный герпес вызывается как HSV-1, так и HSV-2. Клинические эпизоды генитального герпеса могут отражать как новое инфицирование, так и рецидивирующее течение инфекции, вызванное реактивацией вируса. Острота инфекционного процесса обычно выше при новом инфицировании, точный сценарий развития болезни у данного больного не может быть установлен без лабораторного исследования. Новая генитальная инфекция HSV-1 и HSV-2 у серонегативного в отношении обоих вирусов больного называется первичным инфицированием и клинически протекает наиболее остро. Новая генитальная инфекция HSV-2 у человека, инфицированного HSV-1, называется непервичной инициальной инфекцией, которая протекает менее остро и сопоставима по частоте с первичной инфекцией. Инфицирование HSV-1 на фоне прежде произошедшего инфицирования вирусом HSV-2 возникает редко: по-видимому, HSV-2 защищает организм от инфицирования HSV-1. Рецидивирующая инфекция имеет более мягкое течение и является результатом реактивации прежде полученной инфекции и реинфекции генитального эпителия.

Генитальные инфекции, вызванные HSV-1 и HSV-2, проникают в организм при оральном или генитальном контакте с инфицированным партнером. Инфекция сопровождается лихорадкой, недомоганием и головной болью, которые продолжаются 1–2 нед. [1]. Большинство больных, обращающихся за медицинской помощью, жалуются на боли или поражение слизистой в области инфицирования. Первоначально поражения имеют вид эритематозных папул, быстро переходящие в небольшие везикулы, которые превращаются в неглубокие эрозии с эритемой вокруг. Количество участков повреждений может широко варьировать. У женщин стадия изъязвления может быть очень продолжительной, поскольку везикулы иногда незаметны, а язвы могут сливаться. Часто одновременно бывают поражены вуль-

ва, промежность и периаанальная область; для первичной инфекции характерна билатеральность поражения.

У женщин часто развивается цервицит, периодически проявляющийся только выделениями из матки. Также распространен уретрит, который может развиваться в результате раздражения поврежденных влагалища потоком мочи или из-за внутренних поражений мочеоточника. У мужчин обычно возникают повреждения слизистой полового члена; периаанальная зона поражается у гомосексуалов при анальном контакте. Могут развиваться уретрит и проктит. У мужчин язвы могут быстро подсыхать и покрываться корочкой еще до начала лечения. Поражения слизистой гениталий в ходе первичного инфицирования могут продолжаться до трех недель с появлением все новых участков, по крайней мере, в течение двух первых недель. Часто возникает двусторонняя паховая лимфаденопатия. Неврологические симптомы — асептический менингит или задержка мочеиспускания — могут возникать на второй и третьей неделе заболевания и медленно разрешаются, но почти всегда полностью проходят в последующие недели. Изредка больные жалуются на боль неврологического характера в области гениталий или других зонах, иннервируемых крестцовым нервом.

Рецидивирующий генитальный герпес имеет более мягкое течение с меньшим количеством участков повреждения и отсутствием или слабой выраженностью системных симптомов или аденопатии. Обычно повреждения односторонние, проходят самостоятельно через 5–10 дней. У многих больных некоторым эпизодам предшествует боль в области будущего поражения или дистальнее по ходу пораженного нерва. Этот «продромальный симптом» часто и заставляет обратиться к врачу при рецидивирующей форме герпеса, применение противовирусной терапии снижает его интенсивность и частоту возникновения.

Анамнез инфекций, вызванных HSV-1 и HSV-2, различается. Почти все больные с генитальным герпесом HSV-2 будут иметь рецидивирующее течение, особенно в первые годы после инфицирования [2]. В группе из 326 больных с документированной инфекцией HSV-2 средняя частота рецидивов составляла четыре случая в первый год после инфицирования у женщин и пять у мужчин; у 20% больных было более 10 рецидивов. Постепенно происходило снижение частоты рецидивов, хотя примерно четверть больных сообщили о большей частоте рецидивов в пятый год после инфицирования, по сравнению с первым годом [3]. Напротив, у многих больных генитальным герпесом HSV-1 единичные случаи рецидива были в течение первого года после инициальной инфекции и только несколько рецидивов в последующие годы [4].

У лиц с нарушениями иммунитета повреждения могут быть обширными, глубоко проникающими в подслизистый слой, где без лечения вирусы могут персистировать в течение месяцев. Они также могут быть локализованы в местах, которые редко повреждаются у людей с нормальным иммунитетом, либо распространяться со слизистой на кожу. Атипичные проявления и локализация повреждений могут задержать

диагностику, изредка проводится биопсия, при которой обнаруживают гистопатологические изменения, характерные для герпесвирусной инфекции. В таких повреждениях много вирусов, и при взятии мазков из участка изъязвления вирусы легко можно выделить.

## Выделение вирусов

Периодическое выделение вируса из слизистой является отличительным признаком инфицирования вирусом простого герпеса. После первоначальной стадии репликации в эпителии HSV попадает в нервные клетки и перемещается в ганглии. На животных показано возникновение ганглионита с распространением вируса в рядом расположенные и коллатеральные ганглии. Вирус персистирует в ганглии в течение всей жизни хозяина [5]. В это время репликация вируса ограничена, и набор экспрессирующихся генов отличается от продуктивной фазы инфекции. Результаты исследований у животных и людей показывают, что латентное состояние отражает активный контроль репликации вируса в ганглии клетками CD8. Тем не менее иммунный контроль на уровне ганглиев несовершенен и поэтому движение вируса по эфферентным путям завершается в слизистой через определенные интервалы времени. Таким образом, HSV-специфичные клетки CD8 формируют кластеры вокруг нервов, заканчивающихся в слизистой, и ограничивают репликацию вирусов в эпителии [6].

Изучалась частота реактивации вируса в организме человека с помощью ежедневных мазков со слизистой гениталий. Суммарный темп выделения вирусов у иммунокомпетентных больных отличался широкой вариабельностью, у мужчин эта величина составляла от 12 до 20% в зависимости от популяции, которую исследовали [7]. Тем не менее некоторые люди могут иметь HSV в слизистой гениталий в 70–90% дней, в которые отбираются пробы, особенно в течение первого года после первичного инфицирования вирусом HSV-2 [8]. У других больных выделение вируса редкое. В исследованиях, которые используют частое взятие проб (четыре раза в день), было обнаружено, что многие эпизоды реактивации вируса кратковременны, примерно 50% из них продолжаются 12 ч и менее [9]. Почти все кратковременные эпизоды бессимптомны и риск клинически обнаруживаемых рецидивов повышается с увеличением продолжительности периода выделения вируса. Подобным образом, количество копий, обнаруживаемых в образце, повышается, когда имеются участки поражения. Продолжительность выделения вируса увеличивается даже во время кратковременных периодов реактивации, когда количество вирусных копий часто достигало  $10^3$  в 1 мл образца, что было ассоциировано с передачей вируса HSV-2 новорожденному [10]. У лиц, имеющих клинические признаки генитального герпеса, вызванного HSV-2, примерно одна треть от всех выделяемых вирусов имела место между периодами формирования обнаруживаемых генитальных повреждений. Бессимптомное выделение вирусов отражает биологию вируса в большей



степени, чем недостаток внимания к наличию повреждений, поскольку дни обнаружения вирусов без сопутствующих повреждений были отмечены также в исследованиях, участники которых были тщательно обследованы опытными клиницистами.

У HSV-2-сероположительных пациентов без генитального герпеса в анамнезе типичный процесс выделения вируса отличается. Более того, уровень выделения вирусов у таких людей ниже по сравнению с теми, кто имеет в анамнезе генитальный герпес, поскольку такие люди преимущественно имеют бессимптомное выделение вируса [11]. Будучи диагностированным при помощи серологического тестирования либо при установлении факта передачи вируса партнеру, большинство пациентов, прежде не отмечавших симптомов генитального герпеса, начинают замечать признаки рекуррентного течения заболевания, хотя рецидивы у них короткие и редкие, что, возможно, объясняет, почему у них ранее герпес не был диагностирован.

Клинически выделение вируса является важным фактором повышенного риска передачи. Примерно в 85% случаев передачи вируса партнер-источник не имел в анамнезе зарегистрированного случая заболевания генитальным герпесом. В этих случаях затруднительно сказать, была ли передача вируса в отсутствие признаков поражения или эти повреждения были умеренными и малозаметными. Таким образом, даже среди лиц, которые имели зарегистрированный случай герпеса в истории болезни, примерно 75% передач вируса имело место в период бессимптомного выделения вируса [12]. Относительный риск передачи при наличии выделения вируса количественно лучше всего был оценен при передаче вируса от матери новорожденному. Когда HSV выделяется из генитального секрета во время родов, риск неонатального герпеса в 345 раз выше по сравнению с периодом, когда вирус в секрете не обнаруживается [13]. Поскольку передача половым путем обычно включает в себя многократное воздействие, риск, связанный с выделением вируса, трудно оценить количественно. Кроме того, половое поведение партнеров с часто появляющимися поражениями гениталий отлично от тех, у кого процесс протекает бессимптомно. Тем не менее даже среди людей с вновь диагностированным герпесом 20% имели половые контакты до начала лечения поражений [14].

## Эпидемиология

Вирус простого герпеса повсеместно распространен в популяции человека. Поскольку клинические проявления могут отсутствовать или вариабельны, эпидемиологические исследования распределения HSV в различных группах базируются на серологических исследованиях. Исторически лабиальный вирус герпеса HSV-1 приобретает детьми в семье при тесных контактах, и почти все исследованные лица были HSV-1-сероположительны. Всеобщее инфицирование HSV-1 также отмечалось в серологических исследованиях, проведенных в странах

Азии и Африки. Повышение стандартов жизни и гигиенических навыков отразилось в последние годы в частоте инфицирования вирусом HSV-1 в Северной Америке и Европе так, что в целом только 60% населения в США HSV-1-сероположительны [15]. В последнее десятилетие HSV-1 инфекции стало присуще повышение доли генитального герпеса, возможно в результате снижения инфицирования этим вирусом детей, приводящее к тому, что первый контакт с вирусом и инфицирование происходят при половых контактах.

Вирус HSV-2, напротив, поражает гораздо меньшую часть населения, особенно в развитых странах. Недавно проведенная оценка эпидемиологического состояния показала, что в США 17% лиц в возрасте от 14 до 49 лет сероположительны по HSV-2 [15]. Среди женщин детородного возраста 22% HSV-2-сероположительны; доля сероположительного результата у мужчин этого возраста составляет около 15% [16]. В Европе в большинстве стран сообщается о доминировании серотипа HSV-2 у 10–20% популяции. Популяционные исследования, проведенные в Африке, сообщают о значительно большем проценте доминирования серотипа HSV-2. Так, например, в четырех городских зонах рядом с Сахарой доминирование этого серотипа было обнаружено у 50% женщин и более 25% мужчин [17]. Меньшее количество исследований было проведено в Азии; среди беременных женщин в Китае доминирование серотипа HSV-2 было обнаружено у 11% [18].

Риск заражения HSV-2 отражает как базовое доминирование серотипа HSV-2 в группе половых партнеров, так и индивидуальное половое поведение. Так, у людей, склонных к половому поведению с высоким риском заражения, включая гомосексуальных мужчин (*man sex man*, MSM) и проституток, доля доминирования серотипа HSV-2 выше — от 70 до 100% в некоторых группах исследования. Девушки в Южной Африке очень быстро инфицируются HSV-2 после начала половых контактов, и в возрасте до 21 года сероположительны оказываются 60% исследованных лиц [19].

Серологические исследования на HSV-2 не только позволяют провести мониторинг половых предпочтений и обычаев населения, но и предупреждают распространение ВИЧ в обществе. Риск ВИЧ-инфицирования повышается в два — четыре раза у людей, которые уже заражены HSV-2. Повышенный относительный риск был отмечен среди сероположительных женщин (*relative risk*, RR = 3), гетеросексуальных мужчин (RR = 3) и гомосексуальных мужчин (RR = 1,7) [20, 21]. Уменьшение показателя относительного риска у MSM, вероятно, отражает независимый риск ВИЧ-инфицирования, который имеет пассивный партнер.

Неонатальный HSV — острая инфекция, которой ребенок приобретает при прохождении через родовые пути, зараженные инфицированным секретом. HSV-2-инфицированные женщины независимо от анамнеза являются группой риска передачи вируса новорожденным. Тем не менее, несмотря на явно повышенную частоту контакта с генитальным секретом, содержащим HSV-2 при рождении, менее

чем у 1% детей, рожденных женщинами с подтвержденным диагнозом HSV-2, развивается герпес новорожденного. Напротив, женщины, впервые инфицированные вирусом герпеса в последнем триместре беременности, составляют группу очень высокого риска (30–50%) передачи HSV новорожденному ребенку [22]. Причины, вероятно, включают в себя недостаток материнских антител, которые переносятся плоду в последний месяц беременности, и, возможно, высокую вирусную нагрузку, которая сопровождает HSV-инфекцию у лиц, иммунная система которых прежде не встречалась с вирусом герпеса. Недавно было показано, что одновременно с повышением частоты HSV-1-генитальных инфекций более частой причиной герпеса новорожденных стал также HSV-1 [23].

### Лабораторные исследования и дифференциальный диагноз

Диагноз генитального герпеса трудно поставить без проведения лабораторно-диагностического исследования. В то время как клинические проявления — везикулы и изъязвления — позволяют частично диагностировать заболевание, лишь небольшая часть больных генитальным герпесом имеют выраженные признаки этих поражений. Большинство лиц с HSV-1 и HSV-2-инфекцией имеют умеренно и слабо выраженные симптомы, которые могут не сильно досаждают больному и часто не приводят к посещению врача. Трудность диагностики генитального герпеса была показана в проспективном исследовании вакцины, находящейся на стадии эксперимента. В этом исследовании люди, имевшие известный риск заражения HSV-2 наблюдались на предмет инфицирования [24]. Среди 155 человек, заразившихся HSV-2, только 39% был своевременно поставлен диагноз. При этом у 20% лиц, которым сказали, что они получили генитальный герпес в результате посещения врача, при тщательном лабораторном исследовании диагноз не подтвердился. Таким образом, клинический диагноз не является ни специфическим, ни чувствительным, и для точной диагностики в каждом случае необходимо лабораторное подтверждение, включая больных, которым предварительный диагноз был поставлен клиницистами без предшествующего лабораторного тестирования.

Для больного, имеющего поражения гениталий, золотым стандартом диагностики является культивирование вируса. Тем не менее этот метод сильно зависит от (1) стадии поражения, поскольку везикулярная или ранняя язвенная стадия дает наибольший выход вирусов; (2) типа инфекции, поскольку при первичном инфицировании выход вируса составляет около 80% по сравнению с 40% при рецидивном течении; (3) метода взятия мазка и транспортировки в лабораторию. Когда используется вирусная культура как единственный лабораторный метод исследования и при этом результат отрицательный, больной (и врач) могут предположить, что он или она не имеет HSV-инфекции. Сама по себе полезность вирусной культуры ограничена, и амплификация вирусного генома во многих случаях заменяет

культуру вируса. По сравнению с вирусной культурой, метод детекции ДНК герпес-вирусов в четыре раза чувствительнее, ДНК устойчива к деградации в окружающей среде, а анализ может быть проведен в более короткие сроки [25]. То, что инфицирование HSV является во всем мире наиболее распространенной причиной появления генитальных язв, не было известно, пока не был разработан молекулярно-диагностический метод, поскольку культуры имеют очень низкий выход продукта, особенно в тропических странах. В некоторых приборах возможна прямая детекция антигена, при этом чувствительность сопоставима с культурой вирусов.

Многие университетские и коммерческие лаборатории предлагают использовать ПЦР для обнаружения ДНК HSV. Первоначально этот тест был разработан для обнаружения вируса в ЦНС у взрослых и новорожденных, поскольку культивирование вируса из цереброспинальной жидкости больных с энцефалитом практически никогда не бывает положительным, и применение ПЦР снизило необходимость проведения биопсии мозга у больных с энцефалитом [26]. В последнее десятилетие использование ПЦР для диагностики HSV распространилось на пробы из изъязвлений генитальной зоны, и этот метод продолжает вытеснять вирусную культуру. Метод пока не переведен на коммерческую основу и поэтому его чувствительность варьирует от лаборатории к лаборатории.

Дифференциальная диагностика простого герпеса включает в себя проведение дифференциального диагноза между изъязвлениями инфекционной и неинфекционной природы. Мягкий шанкр и сифилис, передающиеся половым путем, также могут приводить к образованию язв. Несмотря на то что определенные морфологические особенности более характерны для сифилитических или шанкroidных изъязвлений, сообразительности и интуиции врача недостаточно для точной диагностики и желательно провести лабораторное подтверждение диагноза. Трудность установления клинического диагноза повышается у больных с одновременно протекающей ВИЧ-инфекцией. Знание эпидемиологии, анамнеза больного, в том числе его половое поведение и недавние путешествия, необходимы для установления дифференциальной диагностики HSV с сифилисом и шанкром. Возможны также смешанные инфекции. Другие инфекции половых органов, включая кандидоз и чесотку, также могут давать картину герпеса. Травма, вероятно, наиболее распространенная причина поражений гениталий неинфекционной природы. Системные заболевания, такие как болезнь Крона, мультиформная эритема, болезнь Бехчета или изъязвления после аппликации фармакологических препаратов, также могут давать клиническую картину генитального герпеса.

### Типоспецифические серологические тесты

Во многих обстоятельствах диагностика HSV должна быть проведена в отсутствие генитальных повреждений. Примеры тому — боль-

ные с рецидивирующей формой течения, у которых культивирование вируса дало отрицательный результат, больные с неясными или атипичными генитальными симптомами, больные, которые имели половой контакт с HSV-инфицированными партнерами, или те, которым требуется тщательная проверка на ИППП. В этих случаях рекомендуемым методом является серологическое исследование на наличие антител к HSV-1 и HSV-2. Кроме того, у больных, которые обращаются к врачу с жалобами на первичные генитальные поражения, серологические исследования помогут установить, является ли инфекция вновь полученной или рецидивирующей. В случае вновь полученной инфекции антитела к тому типу HSV, который был обнаружен в половых путях, будут отрицательными. Напротив, если у больного в очагах поражения гениталий обнаруживается HSV-2 и он серопозитивен по HSV-2, то инфекция представляет собой рецидив и не является новой инфекцией для этого больного. В качестве варианта, HSV-1 или HSV-2-инфицирование может быть установлено путем сероконверсии у прежде серонегативных больных. После первого инфицирования антитела продолжают персистировать в течение всей жизни человека и могут быть использованы в качестве маркера инфекции. У больных с бессимптомным течением с антителами к HSV-2 можно предположить генитальную инфекцию, у большинства таких больных можно будет распознать рецидивирующее течение и выделение вируса, как только он обратится к врачу. У больных с бессимптомным течением с антителами к HSV-1 участком инфекции может быть как ротовая полость, так и половые органы либо и то и другое. Среди взрослых людей с сероконверсией HSV-1 треть инфицированных больных имеют генитальные поражения, треть — высыпания в оролабиальной зоне и треть имеет бессимптомное течение.

Антитела к HSV развиваются в течение первых нескольких недель после инфицирования и персистируют неопределенно долго [27]. Хотя антитела к большинству вирусных белков HSV-1 и HSV-2 имеют высокую перекрестную реактивность, антитела к гликопротеину G (gG-1 или gG-2) преимущественно типоспецифичны. Поскольку предшествующие антитела к HSV-1 могут эффективно экранировать ответ на HSV-2 в тех исследованиях, которые используют смесь вирусных антигенов, при поиске HSV-2 следует использовать метод анализа, основанный на типоспецифическом гликопротеине G (*gG-based assay*).

Типоспецифические серологические методы, основанные на исследовании гликопротеина G, были разработаны и стандартизованы более 10 лет назад и в настоящее время коммерчески доступны в нескольких форматах (табл. 22.2). В лабораториях с умеренными объемами исследований как наиболее экономичный широко применяется ИФА. Диагностический стрип-иммуноблот («HerpeSelect 1&2 Differentiation Immunoblot») можно приобрести в компании Focus Diagnostics. Тест-система позволяет дифференцировать HSV-1 и HSV-2 может быстро и легко использоваться как единственный тест в лаборатории с низкими объемами исследований и не требует специального оборудова-

ния. Тест-системы для анализа «у постели больного» от Focus и Biokit могут обнаружить антитела к HSV-2 в капиллярной крови или сыворотке; результаты этих тестов оцениваются визуально по изменению окраски; их точность определения по сравнению с вестерн-блотом может варьировать в зависимости от опытности исследователя и места взятия пробы [28]. В настоящее время Focus и Diasorin производят тест-системы с высокой пропускной способностью для централизованных лабораторий с большими объемами проб. Результаты этих тестов хорошо коррелируют с результатами, полученными с использованием коммерческих ИФА-наборов [29, 30]. Золотым стандартом в области типоспецифической серологической диагностики на HSV остается вестерн-блот Университета Вашингтона, который определяет антитела к большому числу различных белков, включая gG [31].

Объявленная эффективность серологических тестов изменяется в зависимости от используемого золотого стандарта и зависит от времени между появлением симптомов заболевания и взятием образцов сыворотки. Ложноотрицательные результаты регистрируются, когда этот период равняется шести неделям [27]. К сожалению, анализ IgM может быть не слишком полезными при идентификации HSV-2 на ранних стадиях болезни. На рынке пока нет наборов для типоспецифического анализа IgM. Неспецифическое выявление HSV у больных, имеющих антитела к HSV-1, неэффективно в силу часто повторяющегося образования IgM в течение долгого времени после первичного инфицирования. Прототипы типоспецифических HSV-2 наборов для определения IgM, которые основываются на определении gG-2, пока не могут различать новую и хроническую рецидивирующую инфекции [32]. Повторный анализ в более поздние сроки может быть полезным, если предполагается первичное инфицирование генитальным герпесом.

Ложноположительные результаты серологического анализа на антитела к HSV, хотя они редко бывают при исследовании на основе гликопротеина G, можно ожидать у больных с низкой вероятностью HSV-инфекции или у больных с прежде имевшейся HSV-1-инфекцией [33]. Существуют принятые референсные тесты, которые можно использовать в тех случаях, когда необходимо подтверждение положительных результатов в образце (табл. 22.2). Некоторые исследования показали, что использование набора Biokit HSV-2 Rapid assay в качестве референсного теста для сыворотки при слабоположительных результатах ИФА-тестов, существенно повышает прогностическую ценность положительных результатов [34, 35].

Серология для HSV-2 полезна в следующих случаях: (1) рецидивирующий генитальный симптом или атипичная симптоматика с отрицательным результатом культуры HSV; (2) клинический диагноз генитального герпеса без лабораторного подтверждения; (3) половой партнер с генитальным герпесом. Знание HSV-2 инфекционного статуса каждого партнера снижает риск передачи HSV-2 на 50% в каждой паре [36].

Таблица 22.2

**Коммерчески доступные наборы для определения HSV-2  
типоспецифических антител в США**

Наименование	Производитель	Комментарии	Возможность тестирования HSV-1
HerpeSelect® HSV-2 ИФА	Focus Diagnostics (2000/2002)	Имеются полуавтоматические платформы	Да; отдельный планшет для ИФА с gG-1
Captia HSV-2 IgG типоспецифический ИФА	Trinity Biotech USA (2004)	Имеются полуавтоматические платформы	Да; отдельный планшет для ИФА с gG-1
EUROIMMUN HSV-2 ИФА (IgG) Anti-HSV-1 ИФА (IgG)	EUROIMMUN US LLC (2007)		Да; отдельный планшет для ИФА
biokitHSV-2 Rapid Test	Biokit USA (1999)	Тест «у постели больного». Также продается как SureVue® HSV-2 Rapid Test производства Fisher situer HealthCare	Нет
Herpesselect® Express™ HSV-2	Focus Diagnostics (2007)	Тест «у постели больного»	Нет
HerpeSelect® 1&2 Differentiation Immunoblot	Focus Diagnostics (2000)	Стрип-иммуноблот; не требует прибора для измерения оптической плотности в лаборатории	Да; связывающий gG-1 участок на каждом стрипе
Plexus™ HerpeSelect® 1 & 2 IgG	Focus Diagnostics	Высокая пропускная способность; требуется оборудование Luminex xMAP®	Да, мультиплексный формат
Liaison® HSV-2 Type Specific IgG	DiaSorin Inc. (2008)	Высокая пропускная способность; хемилюминесцентный метод	Да
UW Western blot	University of Washington Virology Laboratory (N/A)	Референсные тесты, полезные для подтверждения положительных результатов	Нет
HSV-2 Inhibition ИФА	Focus Diagnostics (N/A)		Нет

Поскольку почти все случаи HSV-2 связаны с половым контактом, присутствие типоспецифических антител к HSV-2 обозначает аногенитальное инфицирование. Присутствие антител только к HSV-1 сложнее интерпретировать, поскольку серологически невозможно различить антитела к HSV-1, возникшие путем орального или аногенитального инфицирования. В случае серологической детекции HSV-1 следует заметить, что ИФА на HSV-1 обладает значительно меньшей чувствительностью, чем вестерн-блот, если исследуется наличие антител к HSV-1 в сыворотке ребенка [37]. Использование более чем одного теста обеспечивает оптимальную чувствительность к HSV-1 [38].

Типоспецифичные HSV-2-тесты не рекомендуется использовать для сыворотки детей, поскольку имеются сообщения о ложноположительных результатах [34, 37]. В результате высокой частоты бессимптомного течения HSV-2 и различной продолжительности периода сероконверсии у больных, использование серологии для медико-юридических целей редко бывает полезным. Обследование жертв сексуального насилия дает противоречивые результаты и должно начинаться на основе изучения каждого случая после тщательного опроса и исследования истории половых контактов и клинических проявлений.

## ПАПИЛЛОМАВИРУС ЧЕЛОВЕКА

Папилломавирусы человека (HPV) принадлежат к семейству Papillomaviridae и представляют собой разнообразные совокупности вирусов. HPV классифицируются в соответствии с гомологией генетической последовательности по филогенетическим группам по двум большим родам: альфа и бета, которые имеют особенности предрасположенности к локализации в эпителии определенного типа: слизистой генитальной области и кожном эпителии соответственно.

В данной главе обсуждаются HPV, передающиеся половым путем и принадлежащие к роду альфа. Эти типы в дальнейшем вновь подразделяются на видовые группы на основе сиквенса нуклеиновых кислот и их родственности. Видовые группы коррелируют с некоторыми фенотипическими характеристиками вируса, включая риск рака и эпителиальный тропизм [39].

## Клинические проявления

Подавляющее большинство оро-аногенитальных HPV-инфекций протекает бессимптомно и обнаруживаются только путем молекулярно-диагностических исследований нуклеиновых кислот. Продуктивная HPV-инфекция как высокого, так и низкого риска может вызывать клеточные изменения, которые микроскопически диагностируются как слабо выраженные сквамозные интраэпителиальные повреждения (*low-grade squamous intraepithelial lesions, LSILs*). Подобно HPV-инфекции в целом, эти LSILs обычно преходящи и разрешаются без медицинского вмешательства. HPV высокого риска могут вызывать более острые предраковые поражения или резко выраженные сквамоз-



ные интраэпителиальные повреждения (*high-grade squamous intraepithelial lesions*, HSILs). Такие повреждения, которые подразделяются гистологически на умеренные и острые цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN2/3), служат мишенью для скрининговых исследований рака шейки матки. Лечение повреждений CIN2/3 путем иссечения предупреждает развитие инвазивного рака шейки матки, угрожающего жизни человека, и является основой успеха скрининговых программ исследования рака шейки матки в США и в других странах.

Определенные типы HPV низкого риска (например, HPV6 и HPV11) вызывают 90% бородавок наружных половых органов как у мужчин, так и у женщин в разных зонах нижних отделов половых путей (шейка матки, влагалище, матка, промежность, анус, пенис). Лечение аногенитальных бородавок может включать хирургическое вмешательство или местное применение препаратов, включая подофилокс или имиквимод. В очень редких случаях перинатальная инфекция гортани вирусами HPV6/11 может привести к ювенильной атаке респираторного папилломатоза. Лечение включает повторяющееся хирургическое уменьшение объема с адьювантной химиотерапией или без нее, обычно бывают рецидивы.

## Эпидемиология

HPV не относится к группе ИППП, которые должны регистрироваться и, следовательно, в США не ведется мониторинга распространения этой инфекции. Национальный центр экспертизы здоровья и питания (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES), который исследовал репрезентативную выборку населения США, сообщает о преимущественном распространении HPV высокого риска (*high risk HPV*, HR-HPV), составившем 15,2% [40]. Преобладание HR-HPV было значительное и достигало 23% в индикаторных контрольных исследованиях женщин, ухаживающих за больными ИППП и работающих в центрах планирования семьи или клиниках скорой помощи [41]. При одинаковом возрасте и месте жительства более высокая доля HR-HPV была выше в клиниках ИППП (26%), чем в клиниках скорой помощи (17%). В обоих исследованиях было показано, что увеличение возраста приводит к снижению преимущественного распространения HR-HPV.

HR-HPV передается преимущественно при половом контакте. Наряду с этим основным путем, вирус также достаточно эффективно передается путем царапин и трения эпителия при непроникающем половом акте, что может объяснять обнаружение HPV-инфекции у девственниц [42]. HPV легко передается. Показано, что более половины женщин были инфицированы HPV в течение четырех лет после первого полового контакта [42], кумулятивный риск уменьшения продолжительности жизни достигает 80–90% в группе сексуально активного населения [43]. Примерно 90% инфекций имеет субклиниче-

скую форму и становится не обнаруживаемой без лечения в течение одного-двух лет [44] при наличии здорового клеточно-опосредованного иммунитета. Примерно у 50–70% женщин с эпизодами HPV-инфекции в течение последующих 18 мес. развивается типоспецифический сывороточный антителый ответ к вирусу [45]. Показано, что в то время, как высокий титр антител в сыворотке предупреждает дальнейшую типоспецифическую инфекцию и ассоциированные с ней заболевания у вакцинированных лиц [46], иммунная защита, ассоциированная с естественным инфицированием не доказана [47, 48]. Примерно 10% женщин, у которых не произошло выведение вируса из организма в течение первых двух лет после инфицирования, составляют группу повышенного риска формирования предраковых поражений (CIN) и развития рака шейки матки [49].

Мужчины также страдают от HPV-ассоциированных заболеваний, включая аногенитальные бородавки и рак ануса, ротоглотки и пениса. Тем не менее, поскольку риск HPV-ассоциированного рака шейки матки у женщин значительно выше, чем частота HPV-ассоциированного рака у мужчин, последнему уделяется значительно меньшее внимание, кроме того аспекта, что мужчины могут быть резервуаром и переносчиком инфекции. Недавно было сообщено, что у мужчин в США в половом члене также преобладает HR-HPV (23,3%) [50]. Интересно, что преобладание HR-HPV в зоне пениса не снижается с возрастом, как это отмечалось для цервикальных HPV-инфекций. Поскольку не существует специального лечения HPV-инфекции у мужчин (кроме лечения аногенитальных бородавок), скрининговые исследования HPV у мужчин в настоящее время не рекомендуются.

## Лабораторная диагностика

### *Типы образцов для исследования*

В рутинных клинических исследованиях наиболее распространены мазки и цервикальные биопсии; достаточно эффективным путем получения образцов для лабораторной диагностики является взятие биопсии шейки матки с помещением ее в жидкую среду для цитологических исследований. Эти биопсийные образцы могут быть использованы также для обычных цитологических исследований, а оставшийся материал может быть использован для лабораторной диагностики на HPV. Для получения материала для исследования используют следующие инструменты, в том числе шпатель, скринет (предназначен для взятия эндоцервикальных мазков), эндобраш (предназначен для взятия эндометриальных мазков) и нейлоновые щетки (Cervex-Brush). Тест-система для выделения ДНК и анализа «HPV Digene-test» представляет собой альтернативу сбора цервикальных проб, совместимую с коммерчески доступными методами анализа. Оба метода непосредственно позволяют получать как экто-, так и эндоцервикальные пробы.

Наряду со взятием проб медицинским персоналом, широко распространяется и самостоятельное взятие женщинами цервика-вагинальных мазков при помощи дакроновых тампонов, при этом, по данным ПЦР-анализа, согласованность между пробами, взятыми обоими путями, оценивается от хорошей до отличной [51, 52]. В то время как самостоятельное взятие мазков не относится к списку стандартных методов «у постели больного», следует все-таки рассматривать этот метод для расширения проведения скрининговых исследований рака шейки матки в ситуации, когда исследование с помощью зеркал неосуществимо [53].

### Анализ нуклеиновых кислот

Анализ нуклеиновых кислот и выявление ДНК HPV считается золотым стандартом диагностики HPV. В настоящее время одобрение FDA получили три тест-системы HPV: Digene-test (Qiagen, Gaithersburg, MD), Cervista™ HR-HPV и тест-система HPV16/18 (Hologic, Bedford, MA). Результаты анализа на HPV должны быть получены для сортировки больных при скрининговых исследованиях, когда мазки-отпечатки по Папаниколау (Пап-тест) обнаруживают атипичные сквамозные клетки неясного значения (АСКНЗ). Анализ ДНК также используется при скрининговых исследованиях женщин старше 30 лет одновременно с Пап-тестом [54]. Важно заметить, что HPV-анализ и Пап-тест не рекомендуется использовать для скрининга женщин младше 30 лет, поскольку в этой возрастной группе отмечается высокая частота транзитной HPV-инфекции.

Qiagen Digene-HPV test или тест-система Hybrid Capture 2 (hc2) обнаруживает присутствие в пробе одного или более из 13 типов HR-HPV, включая HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68. Тест hc2 основан на технологии таргетной амплификации. Метод основан на том, что денатурированная ДНК, экстрагированная из цервикального образца, добавляется к гибридизационному буферу, содержащему подробные РНК-зонды, специфичные для 13 целевых генотипов HR-HPV. Образцы ДНК и РНК-гибридные зонды связываются в микролунках, покрытых анти-ДНК—РНК-антителами. После того как негибридизованная нуклеиновая кислота отмывается, гибриды ДНК—РНК определяются путем связывания с вторичными анти-ДНК—РНК-антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой и затем обнаруживаются с хемилюминесцентным субстратом. Сигнал амплифицируется благодаря свойству многократного усиления сигнала от конъюгированных антител при связывании с каждым ДНК—РНК-гибридом. Щелочная фосфатаза расщепляет субстрат, испуская световой импульс, который считывается люминометром и измеряется в относительных световых единицах (*relative light units*, RLU). Анализ считается положительным, если RLU в образце равен или больше, чем в положительном контроле ( $K^+$ ), т. е.  $RLU/K^+ \geq 1,0$ .

Следует заметить, что некоторые генотипы LR-HPV, включая типы 40, 42, 53, 66, 67, 70, 73, 81, 82 и 82v, при большом количестве копий могут дать ложноположительный результат исследования на HR-HPV [55]. Кроме того, *hc2* не может различать специфические типы HR-HPV, присутствующие в образце. Тест-система Cervista™ HR-HPV обнаруживает присутствие одного или более 14 генотипов вирусов HPV высокого риска HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68. Эта система основана на химическом методе изотермической амплификации сигнала, Invider® [56], с использованием зонда, связывающего компонента и FRET-олигонуклеотидов, обеспечивающих флуоресцентный резонансный перенос энергии. В первичной реакции таргет-специфичные зонды и связывающие олигонуклеотиды соединяются с таргетной последовательностью с образованием *single base overlap* (перекрывающихся комплексов единичных оснований), которые распознаются при расщеплении соответствующими ферментами Cleavase®, которые отрезают 5'-конец целевого зонда, перекрывающего зондсвязывающий участок. Продукты ферментативного расщепления затем взаимодействуют с зондом FRET и вторично расщепляются с высвобождением флуорофоров, которые измеряются стандартными планшетными ридерами флуоресценции. Cervista™ HR-HPV 16/18 использует похожую технологию, но позволяет обнаружить конкретный 16 и 18 генотипы. В результате особо высокого риска развития CIN 2/3 при положительных результатах анализа на генотипы HPV16/18 [57] настоящее руководство предлагает немедленное направление к врачу-специалисту для кольпоскопического обследования всех лиц, имеющих положительный результат анализа HPV 16/18 при цитологически нормальных результатах, по сравнению с повторным исследованием при помощи HR-HPV и Пап-теста через 12 мес. тех лиц, у которых цитологически не обнаружено отклонений и HPV-тест положителен, но не на 16/18 генотипы [54, 58].

### Выделение вируса

Вирус HPV не может быть культивирован традиционными диагностическим культуральными методами; следовательно, выделение интактного вируса не требуется. Образцы подвергаются специальной обработке для выделения и очистки вирусной ДНК, которые проводятся в соответствии со стандартными методами в зависимости от последующих методов детекции ДНК.

Для метода *hc2* образцы, собранные с использованием набора Digene-sampler kit, денатурируют при помощи NaOH и добавляют непосредственно в гибридизационную смесь. Если используется избыток среды для цитологических исследований (LBC), образец должен быть смешан с буфером Sample Conversion Buffer, клетки осаждаются центрифугированием. После удаления супернатанта клетки ресуспендируют и помещают в стандартную транспортную среду (STM), денатурация проводится при 65 °C на вортекс-мешалке до начала гибриди-

зации. Образцы как в LBC, так и в STM совместимы с ПЦР-методами генотипирования, описанными ниже, хотя может потребоваться более тщательная очистка ДНК, которая включает расщепление при помощи протеаз и преципитацию в этаноле. ДНК может быть выделена непосредственно из образцов с использованием набора Qiagen MinElute Media DNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA).

Следует заметить, что одним из источников межлабораторной вариабельности результатов исследований HPV оказывается различие в процессе пробоподготовки. Протоколы, описанные выше, широко распространены и утверждены. Отклонения от них — в средах, применяемых для пробоподготовки или размеров обрабатываемых и анализируемых образцов, — могут привести к значительным вариациям в чувствительности методов определения HPV. Модификации протоколов пробоподготовки не поощряются, но если существует необходимость, должно быть проведено параллельное исследование для валидации модификаций метода, чтобы убедиться в сравнимости качества и результатов анализа.

### *Типирование*

Генотипирование HPV может быть осуществлено с использованием как консенсусных праймеров, так и типоспецифических ПЦР методов. В настоящее время одобрены и коммерчески доступны две консенсусных ПЦР-системы; Roche HPV Linear Array (LA) Test (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) и Innogenetics INNO-LiPA HPV Genotyping Extra test (Innogenetics NV, Belgium). Эти системы используют совокупность HPV типоспецифических праймеров: 18 олиго-PGMU праймеров в системе LA-тест [59] и 10 олиго-SPF10 праймеров в системе INNO-LiPA-тест. Эти праймеры предоставляют возможность проведения одной реакции амплификации для широкого диапазона генитальных HPV различных типов. Разделение типов HPV достигается путем реверсивной линейной блот-гибридизации, при которой меченые продукты ПЦР гибридизуются с отдельными зондами на стрипах, содержащих 37 или 25 отдельных зондов в системах LA и INNO-LiPA соответственно. Более короткие продукты ПЦР, использующие SPF10 праймеры (62 п. н. по сравнению с 450 п. н. в LA), делают этот метод анализа преимущественным при диагностике сильно деградированных образцов HPV, например в парафинированных срезах тканей, фиксированных в формалине. Эти системы обладают соотносимыми рабочими характеристиками при детекции типоспецифических HPV, при этом LA позволяет обнаруживать в среднем большее количество типов HPV. В крупных эпидемиологических исследованиях широко применяются также другие консенсусные ПЦР-системы для обнаружения HPV (например, MY09/11 и GP5+/6+), но они в настоящее время не представлены на рынке. Разработка методов генотипирования с использованием технологий зондов на микроносителях может повысить производительность методов ПЦР-генотипирования [62].

Описано несколько типоспецифических ПЦР-систем в реальном времени для генотипирования HPV [60]. Эти методы могут предоставить несколько более высокую чувствительность на типоспецифическом уровне при снижении эффективности генотипирования. Эти методы позволяют проводить количественную оценку вирусной нагрузки; однако высокая степень перекрытия вирусной нагрузки при HPV остротой клинических проявлений устраняет любое значение клинического применения количественной оценки вирусной нагрузки при HPV.

### *Серологический анализ*

Примерно у 50–60% женщин с положительными результатами анализа на ДНК HPV обнаруживаются типоспецифичные антитела к L1-капсидному белку. Обычно титры антител очень низкие, особенно по сравнению с титрами, которые вызываются вакцинацией L1-вирусоподобными частицами (VLP) [64]. Антитела к HPV распознают конформационно-специфичные эпитопы капсидного белка. В формате стандартного серологического анализа, включая ИФА и конкурентный радиоиммунный анализ, используют типоспецифические L1 VLP как связывающий антиген. Серореактивность на капсидный белок L1 HPV типоспецифична; таким образом, тщательный серологический анализ требует многочисленных повторов. Присутствие L1 HPV-антител — специфичный, но относительно низкочувствительный маркер накопления HPV-типоспецифичного воздействия и, как таковое, не имеет клинического применения.

### *Иммуногистохимия*

Клеточная экспрессия онкопротеина E7 при инфицировании HR-HPV приводит к снижению функции опухолевого супрессора pRB с повышающей регуляцией p16 как следствие последующего процесса [65]. Иммуногистохимическое обнаружение p16 на цитологических и гистологических препаратах, таким образом, служит хорошим маркером активной вирусной инфекции при HR-HPV [66].

## **КОНТАГИОЗНЫЙ МОЛЛЮСК**

Контагиозный моллюск представляет собой доброкачественную вирусную инфекцию кожи. В то время как контагиозный моллюск у детей проявляется обычно на лице, туловище и конечностях, у взрослых людей молодого возраста чаще всего в процесс вовлечены кожные покровы гениталий, что позволяет предположить передачу инфекции половым путем. Отсутствие серьезных последствий, ассоциированных с этой инфекцией, и частота спонтанных разрешений привела к малочисленности историй заболеваний и клинических исследований.

Контагиозный моллюск представляет собой вирус человека, принадлежащий к семейству *Poxviridae*, хотя его отношение к натураль-

ной оспе очень отдаленное [67]. В тропическом климате он часто вызывает высыпания у детей, в развитых странах он чаще проявляется как ИППП [68]. Передача осуществляется при контакте кожа к коже, инкубационный период составляет несколько месяцев. Инфекция также может проявляться после повреждений кожи, таких как татуировка и бритье, или при использовании контаминированных предметов, например гимнастического оборудования и полотенец. В последние 30 лет в развитых странах в клиниках лечения ИППП было отмечено повышение частоты заражения контактным моллюском в несколько раз [68]. Поскольку фактором риска является экзема, это повышение может быть скорее параллельным повышению атопических экзематозных нарушений, чем признаком распространения вируса в новых популяциях.

Повреждения кожи присутствуют в матовых папулах цвета кожи, обычно 3–5 мм в диаметре, имеющих центральное вдавление. У пациентов без нарушения иммунитета количество папул составляет от 5 до 20. В отличие от HPV, с которым проводится дифференциальный диагноз, моллюск чаще предпочитает кожу, чем слизистые. Поскольку выведение вируса из организма зависит от интактного клеточного иммунитета, больные с выраженной ВИЧ-инфекцией или ятрогенным нарушением иммунитета могут иметь обильные высыпания, включающие несколько сотен повреждений, часто на лице.

Диагноз контактного моллюска ставится на основании клинических проявлений. При наличии атипичного течения диагноз может быть подтвержден биопсией. Инфекция ограничена эпителием с характерными изменениями, демонстрирующими гиперплазию кератиноцитов в телах моллюска. Вирусные частицы также могут быть найдены при электронной микроскопии, где они обнаруживаются в виде типичных вирусов оспы либо путем амплификации вирусного генома. Хотя серологическое тестирование может быть проведено в исследовательских целях, клинического применения оно не находит, поскольку эффективность его для постановки клинического диагноза не показана. У иммунокомпетентных лиц наиболее часто похожими проявлениями являются генитальные бородавки. У больных с выраженной ВИЧ-инфекцией может присутствовать диссеминированная микотическая, особенно криптококковая, инфекция, которая морфологически может давать такие же проявления, как контактный моллюск [69].

При диссеминированной криптококковой инфекции повреждения многочисленны и имеют тенденцию располагаться на лице и туловище. Обычно наличествуют признаки системного заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Corey L, Adams HG, Brown ZA, et al. Clinical course of genital herpes simplex virus infections in men and women. *Ann Intern Med* 1983; 48:973.
2. Benedetti JK, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med* 1994; 121:847–854.

3. Benedetti JK, Zeh J, Corey L. Clinical reactivation of genital herpes simplex virus infection decreases in frequency over time. *Ann Intern Med* 1999; 131(1):14-20.
4. Engelberg R, Carrell D, Krantz E, et al. Natural History of Genital Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Sex Transm Dis* 2003; 30(2):174-177.
5. Baringer JR. Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglia. *N Engl J Med* 1974; 291:828-830.
6. Zhu J, Koelle DM, Cao J, et al. Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med* 2007; 204(3): 595-603.
7. Corey L, Wald A, Patel R, et al. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* 2004; 350(1):11-20.
8. Gupta R, Wald A, Krantz E, et al. Valacyclovir and Acyclovir for Suppression of Shedding of Herpes Simplex Virus in the Genital Tract. *J Infect Dis* 2004; 190(8):1374-1381.
9. Mark KE, Wald A, Margaret AS, et al. Rapidly cleared episodes of herpes simplex virus reactivation in immunocompetent adults. *J Infect Dis* 2008; 198(8):1141-1149.
10. Cone R, Hobson A, Brown Z, et al. Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. *JAMA* 1994; 272:792-796.
11. Wald A, Zeh J, Selke S, et al. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 2000; 342(12):844-850.
12. Mertz GJ, Benedetti J, Ashley R, et al. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann Intern Med* 1992; 116:197-202.
13. Brown ZA, Wald A, Morrow RA, et al. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA* 2003; 289(2):203-209.
14. Richards J, Krantz E, Selke S, et al. Healthcare seeking and sexual behavior among patients with symptomatic newly acquired genital herpes. *Sex Transm Dis* 2008; 35(12):1015-1021.
15. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* 2006; 296(8):964-973.
16. Xu F, Markowitz LE, Gottlieb SL, et al. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 in pregnant women in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(1):43, e1-e6.
17. Weiss H, Buve A, Robinson N, et al. The epidemiology of HSV-2 infection and its association with HIV infection in four urban African populations. *AIDS* 2001; 15 (suppl 4):S97-S108.
18. Chen XS, Yin YP, Chen LP, et al. Herpes simplex virus 2 infection in women attending an antenatal clinic in Fuzhou, China. *Sex Transm Infect* 2007; 83(5):369-370.
19. Auvert B, Ballard R, Campbell C, et al. HIV infection among youth in a South African mining town is associated with herpes simplex virus-2 seropositivity and sexual behaviour. *AIDS* 2001; 15(7):885-898.
20. Sobngwi-Tambekou J, Taljaard D, Lissouba P, et al. Effect of HSV-2 serostatus on acquisition of HIV by young men: results of a longitudinal study in Orange Farm, South Africa. *J Infect Dis* 2009; 199(7):958-964.
21. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, et al. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* 2006; 20(1):73-83.



22. Brown ZA, Selke S, Zeh J, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med* 1997; 337(8):509-515.
23. Kropp RY, Wong T, Cormier L, et al. Neonatal herpes simplex virus infections in Canada: results of a 3-year national prospective study. *Pediatrics* 2006; 117(6):1955-1962.
24. Langenberg A, Corey L, Ashley R, et al. A Prospective Study of New Infections with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *N Engl J Med* 1999; 341:1432-1438.
25. Wald A, Huang ML, Carrell D, et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA on Mucosal Surfaces: Comparison with HSV Isolation in Cell Culture. *J Infect Dis* 2003; 188(9):1345-1351.
26. Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003; 14(2):83-89.
27. Ashley Morrow R, Krantz E, Friedrich D, et al. Clinical correlates of index values in the focus Herpe-Select ELISA for antibodies to herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *J Clin Virol* 2006; 36(2):141-145.
28. Saville M, Brown D, Burgess C, et al. An evaluation of near patient tests for detecting herpes simplex virus type-2 antibody. *Sex Transm Infect* 2000; 76(5):381-382.
29. Chen F CJ, Prince H, Wagner M, et al. Evaluation of a Multiplex Bead-based Assay for Herpes Simplex Virus-1 and -2 (HSV-1 and HSV-2) Type-specific Serology. 2006 National STD Prevention Conference; 2006; Jacksonville, FL.
30. Bobba G PA, Vaught D, Tuttle A, et al. Comparison of LIAISON HSV-1 and HSV-2 type specific IgG fully automated chemiluminescent immunoassays to HerpeSelect 1 and 2 and Captia HSV-1 and HSV-2 ELISA assays. 48th Ann IntersciConfAntimicrob Agents and Chem, 2008 and 46th Infect Dis Soc of America Ann Meeting, 2008.
31. Ashley RL, Militoni J, Lee F, et al. Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera. *J Clin Microbiol* 1988; 26(4):662-667.
32. Morrow R, Friedrich D. Performance of a novel test for IgM and IgG antibodies in subjects with culture-documented genital herpes simplex virus-1 or -2 infection. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(5):463-469.
33. Golden MR, Ashley-Morrow R, Swenson P, et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) Western blot confirmatory testing among men testing positive for HSV-2 using the focus enzyme-linked immunosorbent assay in a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis* 2005; 32(12):771-777.
34. Ramos S, Lukefahr JL, Morrow RA, et al. Prevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 among children and adolescents attending a sexual abuse clinic. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(10):902-905.
35. Morrow RA, Friedrich D, Meier A, et al. Use of «biokit HSV-2 Rapid Assay» to improve the positive predictive value of Focus HerpeSelect HSV-2 ELISA. *BMC Infect Dis* 2005; 5:84.
36. Wald A, Krantz E, Selke S, et al. Knowledge of partners' genital herpes protects against herpes simplex virus type 2 acquisition. *J Infect Dis* 2006; 194(1):42-52.
37. Leach CT, Ashley RL, Baillargeon J, et al. Performance of two commercial glycoprotein G-based enzyme immunoassays for detecting antibodies to herpes simplex viruses 1 and 2 in children and young adolescents. *ClinDiagn Lab Immunol* 2002; 9(5):1124-1125.

38. Ashley-Morrow R, Krantz E, Wald A. Time course of seroconversion by HerpeSelect ELISA after acquisition of genital herpes simplex virus type 1 (HSV-1) or HSV-2. *Sex Transm Dis* 2003; 30(4):310–314.
39. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337 (1):76–84.
40. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007; 297(8):813–819.
41. Datta SD, Koutsky LA, Ratelle S, et al. Human papillomavirus infection and cervical cytology in women screened for cervical cancer in the United States, 2003–2005. *Ann Intern Med* 2008; 148(7):493–500.
42. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2003; 157(3):218–226.
43. Brown DR, Shew ML, Qadadri B, et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 2005; 191(2):182–192.
44. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180(5):1415–1423.
45. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000; 181(6):1911–1919.
46. Joura EA, Kjaer SK, Wheeler CM, et al. HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vaccine* 2008; 26(52):6844–6851.
47. Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2):324–327.
48. Viscidi RP, Snyder B, Cu-Uvin S, et al. Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (1):283–288.
49. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286(24):3106–3114.
50. Giuliano AR, Lu B, Nielson CM, et al. Age-specific prevalence, incidence, and duration of human papillomavirus infections in a cohort of 290 US men. *J Infect Dis* 2008; 198(6):827–835.
51. Winer RL, Feng Q, Hughes JP, et al. Concordance of self-collected and clinician-collected swab samples for detecting human papillomavirus DNA in women 18 to 32 years of age. *Sex Transm Dis* 2007; 34(6):371–377.
52. Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, et al. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervicalexamples for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2007; 105(2):530–535.
53. Sowjanya AP, Paul P, Vedantham H, et al. Suitability of self-collected vaginal samples for cervical cancer screening in periurban villages in Andhra Pradesh, India. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(5):1373–1378.
54. Solomon D, Papillo JL, Davey DD. Statement on HPV DNA test utilization. *Am J Clin Pathol* 2009; 131(6):768–769; discussion 70–73.

55. Wentzensen N, Gravitt PE, Solomon D, et al. A study of Amplicor human papillomavirus DNA detection in the atypical squamous cells of undetermined significance-low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(5):1341-1349.
56. de Arruda M, Lyamichev VI, Eis PS, et al. Invader technology for DNA and RNA analysis: principles and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2(5):487-496.
57. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1072-1079.
58. Wright TC Jr., Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(4):340-345.
59. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):357-361.
60. Gravitt PE, Coutlee F, Iftner T, et al. New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine*. 2008; 26 (suppl 10):K42-K52.
61. Castle PE, Porras C, Quint WG, et al. Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10):3437-3445.
62. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2) 504-512.
63. Fontaine J, Hankins C, Mayrand MH, et al. High levels of HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS* 2005; 19(8):785-794.
64. Harro CD, Pang YY, Roden RB, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 LI virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4):284-292.
65. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer* 1997; 75(10):1410-1416.
66. Klaes R, Friedrich T, Spitzkovsky D, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92(2):276-284.
67. Gübser C, Hue S, Kellam P, et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 2004; 85 (Pt 1):105-117.
68. Tyring SK. Molluscum contagiosum: the importance of early diagnosis and treatment. *Am J ObstetGynecol* 2003; 189 (suppl 3):S12-S16.
69. Ramdial PK, Calonje E, Sing Y, et al. Molluscum-like cutaneous cryptococcosis: a histopathological and pathogenetic appraisal. *J Cutan Pathol* 2008; 35(11):1007-1013.

**Р. У. Кумбз**Robert W. Coombs, Department of Laboratory Medicine,  
University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Нельзя отрицать, что вирусные инфекции иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1; ВИЧ-инфекция) стали самыми распространенными инфекциями за последние три десятилетия, если не за последнее столетие. И хотя, по существу, эндогенная вирусная инфекция способствовала незаметной эволюции наших обезьяноподобных предков, именно возникновение ВИЧ-1 как смертельной вирусной инфекции с сопутствующим иммунодефицитом вывела медицинские исследования на совершенно новый уровень лабораторной диагностики и клинической медицины. Ни одна другая современная вирусная инфекция не продвинула так наше понимание важных биологических отношений между вирусами и иммунной системой в той же мере, что и ВИЧ-1. Что гораздо важнее, с точки зрения данной главы, ВИЧ-1 явился важным толчком для разработки и введения комплексных серологических и молекулярных диагностик от производителей-поставщиков медицинских услуг как для здравоохранения, так и для исследователей. Введение количественного теста на нуклеиновые кислоты (РНК и в меньшей степени ДНК ВИЧ-1) и генотипирования на лекарственную чувствительность в качестве стандартных методов молекулярной диагностики при клинической борьбе с ВИЧ, а также введение практики диагностики ВИЧ-1 «у постели больного» укрепило сотрудничество между системой здравоохранения (Центры контроля заболеваний Соединенных Штатов, CDC), клиническими лабораториями и сообществом практикующих врачей. Современные исследования патогенеза, эпидемиологии, клинических особенностей и лечения ВИЧ-1-инфекции доступны повсюду [1]. В этой главе сделан акцент на последние разработки в области лабораторной диагностики и борьбы с ВИЧ-инфекцией с целью достижения наиболее оптимального использования лабораторных ресурсов в данных целях и обзора последних достижений по данной теме [2].

## **КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА**

### **Общие положения**

Вскоре после заражения ВИЧ-1 в плазме крови или клетках может быть обнаружена репликация вируса, после которой следует предсказуемая гуморальная и иммунная реакция. Развитие вирусологических

и серологических маркеров ВИЧ-1, которые приведены в табл. 23.1, известно под названием стадий Фибига I—VI [3]. Для практических целей большинство больных ВИЧ-1 диагностируют по иммунной реакции в серии чувствительных и специфических тестов, которые выявляют ВИЧ-1-специфические антитела. Однако ВИЧ-1-инфекцию также можно обнаружить посредством метода сигнальной амплификации либо с помощью метода целевой амплификации вирусной РНК или провирусной ДНК у большинства сероположительных пациентов с ВИЧ-1. Подобные тесты могут быть особенно важны для пациентов с ранней стадией заболевания (до того как развиваются подтверждающие антитела, стадии Фибига I—IV). Для подтверждения ВИЧ-инфекции текущие лабораторные критерии CDC США позволяют использование нуклеиновых кислот, антигенов, вирусной культуры и иммуноферментного анализа (ИФА) на реактивный ВИЧ-1 [4]. Однако, как указано требованиями CDC для скрининга ВИЧ-1/2, не рекомендуется использовать вирусологические (несерологические) тесты на ВИЧ вместо одобренных серологических тестов на ВИЧ-1/2, так как отрицательный результат (т. е. невыявленный или неактивный) вирусологического теста на ВИЧ-1/2 еще не означает подтвержденный диагноз ВИЧ-инфекции. Поэтому отрицательный тест на ВИЧ-1, в рамках задержанного развития ВИЧ-1, следует повторять через установленные интервалы в период от 6 до 12 мес. после любого возможного заражения высокой степени риска. Практикующий врач может определить новую (острую) ВИЧ-инфекцию по соответствующим признакам и симптомам, таким как: самокупирующееся мононукле-

Таблица 23.1

## Лабораторные стадии первичной ВИЧ-1-инфекции

Лабораторный тест ВИЧ-1						
			Анализ на антитела (ферментный иммуноанализ)			
стадия	РНК	Антиген р24	1-е поколение	2-е и 3-е поколение	Вестерн-блот	Кумулятивная продолжительность стадии в днях (95% СВ)
I	+	-	-	-	-	5 [3, 8]
II	+	+	-	-	-	10 [7, 14]
III	+	+	-	+	-	14 [10, 17]
IV	+	±	-	+	Не определено	19 [15, 23]
V	+	±	±	+	+ <sup>a</sup>	89 [47, 130]
VI	+	±	+	+	+ <sup>b</sup>	Неизвестно

+ присутствует, - отсутствует; ± варьирует  
<sup>a</sup> Подтвержденный вестерн-блот без полосы р31.  
<sup>b</sup> Подтвержденный вестерн-блот с полосой р31

озоподобное заболевание, затяжная лихорадка, усталость или потеря веса, вспышка оппортунистических инфекций и поведение высокой степени риска: гомосексуальные контакты, инъекционное употребление наркотиков, многократное переливание крови и ее компонентов (в условиях ограниченных ресурсов), гомо- и гетеросексуальные контакты с партнером из группы риска или с ВИЧ-1 сероположительным партнером, жителями определенных районов Африки, Азии или Карибского бассейна, где преобладание ВИЧ крайне высоко, мужская или женская проституция или ребенок, рожденный от родителей, находящихся в данных группах риска. Но самую большую сложность при диагностировании ВИЧ-инфекции для практикующих врачей представляют люди с острыми инфекциями, с бессимптомными заболеваниями, с заболеванием с нетипичными признаками и симптомами или же люди, которые отрицают свою принадлежность к группе риска.

На данный момент в области здравоохранения CDC рекомендует расширить ВИЧ-скрининг пациентов, включая беременных, при этом сразу же по постановке диагноза следует начинать антиретровирусную терапию, уменьшая вертикальную передачу инфекции, а также процент заболеваемости и смертности от ВИЧ. Это позволит улучшить качество жизни, восстановить и сохранить иммунологическую функцию и подавить вирусную нагрузку максимально эффективно и на продолжительное время [1, 5]. Данные рекомендации создают ряд дополнительных сложностей для практикующих врачей и клинических лабораторий, а именно необходимость не только диагностировать заболевания как можно быстрее, но также количественно определить уровень вирусных РНК, посредством чего прогнозируется скорость развития заболевания и конечный успех или безуспешность противовирусной терапии.

Современный подход к клиническому ведению больных с ВИЧ-1-инфекцией основан на данных клинических испытаний, свидетельствующих о том, что уровень вирусной РНК в плазме и подсчет клеток CD4 — самые удобные биологические маркеры при определении клинической прогрессии и оценки эффективности терапии. Обнаружение единичных РНК ВИЧ-1 все еще остается надежнейшим методом при прогнозировании времени развития СПИДа и смерти, а также позволяет, в общем, оценить около половины различных клинических исходов [6].

Для описательных и технических целей лабораторное обнаружение инфекций ВИЧ-1 и ВИЧ-2 можно разделить на анализы, определяющие ВИЧ-специфические антитела, и анализы, определяющие инфекционный вирус ВИЧ, вирусный антиген или вирусные нуклеиновые кислоты.

## Острая инфекция

Ежегодно во всем мире регистрируется около двух миллионов новых ВИЧ-инфицированных больных, из которых от 38 000 до 68 000 регистрируются в США. Отчетливая роль острой инфекции при половой

передаче ВИЧ еще плохо описана, однако эпидемиологические исследования показывают, что более половины заражений происходит во время острой инфекции из-за высокого уровня вирусов в крови и генитальных выделениях [7]. Повлияют ли эпидемиологические, диагностические и терапевтические усилия по выявлению и лечению данных больных на ранней стадии инфекции на передачу или клинический исход, неизвестно. Недавние улучшения в области чувствительности и специфичности анти-ВИЧ-анализов значительно сократили оконный период предварительной сероконверсии (от 42 до 45 дней) (средний инфекционный оконный период, задокументированный в прошлых исследованиях от 1987 г.) до менее чем 20 дней с ИФА-анализами, которые определяют как анти-ВИЧ IgM и IgG (см. табл. 23.1) [3]. Введение прямых анализов на обнаружение вирусов в алгоритм проверки уменьшает оконный период на 9 дней для антигена p24 или ПЦР ДНК и на 11 дней для ПЦР РНК (табл. 23.2) [8]. В некоторых популяционных исследованиях при скрининге на острую инфекцию были использованы методы создания совокупного пула плазмы [9, 10]. Хотя большинство проявлений сероконверсии наступает через 2 мес. после заражения, приблизительно в 5% случаев профессиональных заболеваний встречается отсроченная сероконверсия, которая может проявиться более чем через 6 месяцев после заражения.

Обычно вирусемия, обнаруживаемая антигеном p24 или ВИЧ РНК, предшествует анти-ВИЧ-сероконверсии за 1–3 нед. Подобная задержка между вирусемией и сероконверсией (вирусная фаза «затмения»), скорее всего, означает развитие локализованной вирусной репликации на слизистой оболочке и, возможно, в лимфоидных тканях, сообщающихся с местами заражения, и предшествует систематической вирусемии и последующей сероконверсии [12].

## АНАЛИЗЫ НА АНТИТЕЛА К ВИЧ

### Общие положения

Алгоритм проверки ВИЧ-1, рекомендованный Службой здравоохранения США, включает в себя начальный ИФА-скрининг, лицензированный Федеральной комиссией по лекарственным веществам (FDA), с последующим подтверждением исследования на антитела циклически реактивирующихся образцов при помощи FDA-лицензированных дополнительных тестов, таких как, например, иммуноблот (вестерн-блот) или непрямо-иммунофлуоресцентное исследование. Может применяться также один из ряда вирусологических (т. е. не антительных) тестов либо тест на нуклеиновые кислоты ВИЧ, ВИЧ-тест на антиген p24 с реакцией нейтрализации или тест на выделение ВИЧ в вирусной культуре [4]. И хотя ИФА — высокочувствительный и избирательный метод, положительная прогностическая значимость ИФА сильно зависит от вида доминирования серотипа ВИЧ-1 антител

Таблица 23.2

Тесты на ВИЧ-1 в порядке уменьшения периода иммунологического «окна» и по скорости получения результатов

Лабораторный тест на ВИЧ	Краткое описание процедуры	Средний период «окна» (нед.)	Среднее уменьшение периода выявления (сут.) <sup>a</sup>
Первое поколение ИФА <sup>b</sup>	Вирусные частицы, связанные антителами больного, выявляются мечеными античеловеческими антителами	-6	...
Второе поколение ИФА	ИФА первого поколения с использованием очищенного антигена ВИЧ-1 или рекомбинантного вируса	-4-6	10
Третье поколение ИФА	«Антигеновый сэндвич»: синтетический пептид связывается антителами к ВИЧ-1 пациента, добавляется антигеном ВИЧ, который обнаруживает анти-ВИЧ-1 IgM и IgG	-3-4	6
Четвертое поколение ИФА	ИФА третьего поколения с моноклональными антителами для обнаружения антигена р24 ВИЧ-1	-2	5
Метод амплификации нуклеиновых кислот ВИЧ в общей РНК <sup>c</sup>	Несколько образцов совмещаются в один, затем приводят ПЦР РНК ВИЧ-1 или другие реакции амплификации для обнаружения вирусных нуклеиновых кислот (РНК)	<1-2	3
Метод индивидуальной амплификации нуклеиновых кислот ВИЧ-1	Как и в предыдущий период, кроме того, проводят исследование каждого образца отдельно; также используется для подтверждения и определения пациента из положительного пула нуклеиновых кислот	<1-2	3

<sup>a</sup> По сравнению с предыдущим менее чувствительным анализом.  
<sup>b</sup> Иммуноферментный анализ.  
<sup>c</sup> ПЦР РНК. По: [8]

пациента. Поэтому использование как ИФА, так и дополнительного теста увеличивает точность обнаружения ВИЧ-инфекции. Правила клинической лабораторной практики запрещают клиническим лабораториям разглашать результаты иммуноферментной пробы Кумбса на циклически реактивный ВИЧ клиническим врачам или пациентам без результатов более специфичного подтверждающего теста. Однако вместе с развитием простой диагностики ВИЧ (диагностики «у постели больного») перед клиническими лабораториями встает необходимость заблаговременно сообщать о «вероятно-положительных»



результатах ИФА в связи с тестом на циклически реактивные ВИЧ-антитела; подтверждающий вестерн-блот и конечный отчет могут быть проведены позже. Что важно для максимальной точности диагностирования, результаты лабораторного теста на ВИЧ должны быть рассмотрены практикующим врачом. Также должна быть проведена проверка эпидемиологической истории больного.

### Иммуноферментные анализы

Существует четыре типовых коммерчески доступных форматов ИФА. В ИФА-системах первого поколения используются антигены, полученные из цельного разрушенного вируса, и метод «сэндвича» ферментно-связанного анти-IgG человека для обнаружения и захвата анти-ВИЧ антител. В системах второго поколения используется рекомбинантный (рДНК) вирусный протеин (антиген) и связанный античеловеческий IgG, или же рДНК антиген как для захвата анти-ВИЧ антител, так и для обнаружения данных антител, с использованием ферментно-связанных рДНК протеинов в качестве зонда. В системах третьего поколения используются синтетические пептиды. Если присутствуют IgG или IgM к ВИЧ-1 или ВИЧ-2, то они связываются с данными пептидами и обнаруживаются с помощью метода «сэндвича» ферментно-связанного анти-IgG человека. В системах четвертого поколения методы третьего поколения совмещены с обнаружением ВИЧ-1 антигена р24, который позволяет обнаружить раннюю ВИЧ-1-инфекцию с еще большей точностью.

Более чувствительные системы третьего и четвертого поколений сократили средний период окна отрицательного результата на антитела первичной инфекции до менее чем 20 дней по сравнению со средним периодом в 3 мес. для анализов первого и второго поколения (см. табл. 23.2) [8]. Специфичность текущего коммерческого варианта ИФА превышает 99,5%. При анализах первого поколения, которые все еще используются, ложноположительные реакции могут быть результатом неспецифических антител с перекрестной реакцией у лиц с сопутствующим иммунологическим заболеванием, беременностью, а также подвергшихся множественным переливаниям или недавней иммунизации. В методах исследований следующего поколения результаты анализа обусловлены взаимодействием перекрестно-реагирующих антител с дрожжами и бактериями, которые производят коммерчески заданные антитела. Некоторые коммерческие виды ИФА-систем обнаруживают как ВИЧ-1, так и ВИЧ-2 антитела. Для эпидемиологических целей специфические ИФА могут оценивать уровень анти-ВИЧ антител, а также степень проявления положительных результатов ВИЧ-1 при серологическом исследовании.

### Иммуноблот

Как уже упоминалось, положительные прогностические значения ИФА сильно зависят от уровня доминирования серотипа ВИЧ-1 ан-

тител пациента. Поэтому для предотвращения ложноположительного диагноза ВИЧ-инфекции требуется подтверждение реактивного ЭИА посредством независимого высокоспецифичного теста. Иммуноблот (или вестерн-блот) — самый широко распространенный подтверждающий тест в США, хотя существуют и другие подтверждающие тесты, например непрямой флуоресцентный анализ или дополнительные тесты для качественного анализа РНК ВИЧ-1 (Gen-Probe ARTIMA RNA Qualitative Assay).

Вестерн-блот обнаруживает антитела сыворотки против специфических белков ВИЧ с различными молекулярными массами, разделяет их посредством гель-электрофореза и закрепляет на нитроцеллюлозную бумагу. Вестерн-блот обнаруживает антитела следующих специфических белков ВИЧ-1: ядро (p17, p24 и gag-предшественники p40 и p55); полимераза (p31, p51, p66) и оболочка (gp41, gp120/160). Задokumentированная расчетная специфичность иммуноблот-анализа составляет 97,8%. Результат вестерн-блота считается отрицательным, если связка антиген — антитело не найдена. Результат считается положительным, когда антитела присутствуют в ядре (p24), оболочке (gp41 или gp120/160) и, в некоторых случаях, в интегразе. И хотя несколько организаций предложили различные критерии оценки реактивности вестерн-блота, Центр контроля заболеваний (CDC) утвердил интерпретационные критерии, согласно которым требуется присутствие антител, по крайней мере, к двум из трех ВИЧ-1 антигенов: p24, gp41 или gp120/160 [14].

Независимо от доминирования серотипа антител ВИЧ-1 реактивный ИФА и подтверждающий вестерн-блот, вместе взятые имеют положительное прогностическое значение более 99,99% [15]. В популяции доноров крови приблизительно 10 из 10 000 людей (0,1%) без риска ВИЧ-1-инфекции будут циклически реактивны на ВИЧ-1 ИФА. Однако у людей из группы пониженного риска с циклически реактивными ВИЧ-1 ИФА-анализами результат вестерн-блота на ВИЧ-1 будет отрицательным и неопределенным. Случаи ложноположительных результатов на ВИЧ-1 антитела у человека, не зараженного ВИЧ-1, при реактивных результатах ИФА и вестерн-блота встречаются крайне редко (менее чем 1 случай из 100 000 осмотренных пациентов). Поэтому при скрининге пациентов с низким уровнем доминирования серотипа антител ВИЧ-1 неопределенный результат вестерн-блота встречается чаще ложноположительного результата вестерн-блота [16]. К счастью, другие тесты на обнаружение ВИЧ-1 позволяют прояснить результаты серологии.

## Другие подтверждающие методы

Как было упомянуто ранее, непрямой иммунофлуоресцентный анализ также одобрен в качестве подтверждающего теста, однако он используется реже иммуноблота. Также зарегистрированы другие подтверждающие методы, к примеру использование ИФА первого или второ-

го поколения в качестве скрининга с последующим использованием ИФА на нативный белок ВИЧ-1 gp160 или ИФА на пептид, полученный на основе антигена с помощью рекомбинантной ДНК. Также существуют эффективные альтернативы вестерн-блоту, которые имеют сходные запроотоколированные результаты, но не одобрены для данных целей Управлением по контролю за продуктами и лекарствами. Однако полный потенциал этих методов еще не полностью раскрыт и не может способствовать улучшению диагностического алгоритма [17–19]. Gen-Probe APTIMA RNA Qualitative Assay, одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами, также может использоваться для подтверждения, но этот метод неэффективен, если ВИЧ-1 подавляется антиретровирусной терапией.

Тем не менее для развивающихся стран комбинация быстрых тестов может стать более дешевой и быстрой альтернативой стандартным алгоритмам проверки [20]. В моей клинической лаборатории, дабы сообщать о результатах ВИЧ-теста в день тестирования, мы незамедлительно подтверждаем реактивность ИФА на ВИЧ-1/2 многоточечным анализом на ВИЧ-1 и сообщаем «предварительный результат теста на ВИЧ-инфекцию», после чего проводим стандартный подтверждающий вестерн-блот (личное послание автора 9/1/09).

### Неопределенные иммуноблоты

Учитывая, что использование скрининга на ВИЧ-1 антитела у людей из групп пониженного риска возросло, для медработников, оказывающих первичную медицинскую помощь, важно точно интерпретировать результаты тестов ВИЧ-1. От 4 до 20% образцов сыворотки, которые повторно реактивны при ИФА-анализе на ВИЧ-1, показывают неопределенный результат при вестерн-блоте [21]. Неопределенные результаты при вестерн-блоте у больных ВИЧ-1 могут означать раннее образование антител против антигенов вирусного ядра во время фазы первичной инфекции, а также раннее обнаружение ВИЧ-1 антител более чувствительным анализом третьего поколения на IgM и ИФА четвертого поколения на антиген p24 перед подтверждающим результатом иммуноблота. В редких случаях результат объясняется потерей ядерно-специфического антитела из-за жесткой иммуносупрессии при поздней стадии инфекции. При ВИЧ-отрицательном диагнозе у больных используют перекрестную реакцию на антитела ВИЧ-2 [22]. Ложноположительные иммуноблоты могут иметь место после иммунизации экспериментальными ВИЧ-1 вакцинами, однако эти случаи встречаются крайне редко с частотой <1 из 135 000 тестов [15, 23].

Таким образом, для тактики ведения больных с неопределенным вестерн-блотом были даны следующие рекомендации [24]. Люди из группы пониженного риска с нереактивным ИФА не нуждаются в дальнейшем обследовании. Люди из группы повышенного риска должны обследоваться серологически по крайней мере 6 мес., осо-

бенно люди с окрашенной полоской на р24 при вестерн-блоте. Раннее селективное использование дополнительных тестов, например на ВИЧ-1 антиген р24, ВИЧ-1 культуру (сейчас используется редко, но доступен в некоторых лабораториях), ВИЧ-1 провирусную ДНК или на РНК плазмы, может помочь определить инфекционный статус людей из группы повышенного риска до развития сероконверсии. Дополнительные отрицательные тесты также могут облегчить напряжение, связанное с неопределенной ВИЧ-1 серологией.

### Простое и быстрое серологическое тестирование

Простые, быстрые, надежные и менее дорогие альтернативы ИФА с подтверждающим иммуноблотом используются в условиях неотложной помощи, в палатах реанимации, клиниках венерических заболеваний, при медосмотрах, а также в развивающихся странах. Виды анализов основаны на трех форматах: иммуноконцентрация (проточные устройства), иммунохроматография (устройства растекания жидкости в радиальном направлении) и частичная агглютинация [25]. На данный момент Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) было лицензировано шесть быстрых ВИЧ-систем, доступных в США. Однако для РОС-теста подходят лишь три простых тест-системы: тест на антитела OraQuick Advance Rapid HIV-1,2 Test (OraSure Technologies), Un-Gold Recombigene HIV-1 Test (Trinity Biotechnologies) и Clearview HIV-1/2Sta-Pak (Chembio Diagnostic Systems), которые допущены FDA для домашнего использования (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA waived kits).

Другие тесты имеют среднюю сложность и поэтому более подходят для лабораторных условий. Обычно данные тестовые процедуры занимают менее 30 мин и отрицательные результаты становятся доступны сразу же. Положительные тесты нужно подтвердить вестерн-блотом или иммунофлуоресцентным анализом. Положительное прогностическое значение данных тестов сравнимо со стандартным ИФА (>80%), и для некоторых тестов отрицательные прогностические значения составляют 100%.

Относительная чувствительность (99,9%) и специфичность (99,6%) данных тестов и их способность обнаруживать как IgM, так и IgG антитела делает их особенно полезными при обнаружении ранних стадий инфекции. Однако, так как некоторые из данных простых и быстрых тестов полагаются на обнаружение антител gp41 (OraQuick), любая задержка в развитии анти-gp41 может уменьшить чувствительность данных тестов при ранней ВИЧ-инфекции [26].

CDC рекомендует, чтобы диагностическое тестирование и обязательное исследование на ВИЧ беременных и госпитальных больных было включено в стандартное клиническое обследование во всех учреждениях здравоохранения, так как эта мера значительно увеличит эффективность тестовых программ, устраняя необходимость длительных бесед и согласований с серонегативными больными, а также

позволит сероположительным больным узнать предварительные результаты, тем самым обеспечивая оптимальные клинические и превентивные процедуры [5]. Данные предварительные результаты могут побудить пациентов обратиться с просьбой получения подтверждающих тестов и принять меры по изменению поведения, связанного с высокой степенью риска, по сравнению с принятыми на сегодняшний день правилами о неразглашении результатов теста [27]. К тому же быстрый скрининг на ВИЧ-1 возможных заражений крови, связанных с характером медицинской работы, сведет к минимуму продолжительность антиретровирусной терапии медицинского персонала, контактировавшего с биологически активным материалом, тем самым снижая расходы, и в случае отрицательного результата скорее снимет волнение сотрудников.

### **Обнаружение антител к ВИЧ-1 в слюне**

Достоверно известно, что ВИЧ-1 антитела могут быть обнаружены в жидкостях полости рта у людей, больных ВИЧ [28]. Существует ряд очевидных преимуществ сбора образцов для ВИЧ-1, тестирования неинвазивным способом, к примеру большая безопасность, большая уступчивость пациента и как альтернатива флеботомии. Ранние проблемы, связанные с низкой чувствительностью, были исправлены с помощью использования специальных устройств сбора, которые концентрируют и стабилизируют слюнные иммуноглобулины. Модификация ИФА и вестерн-блота увеличила чувствительность с 97 до 100% и специфичность с 98 до 100%, в зависимости от исследования [29]. В июне 2004 г. FDA одобрило улучшенный быстрый тест OraQuick® Advance Rapid HIV-1,2 Antibody Test (OraSure Technologies) для обнаружения ВИЧ-1/2 антител в жидкости рта в качестве РОС-теста.

### **Тест на антитела ВИЧ в условиях ограниченных ресурсов**

Существует несколько серьезных проблем при тесте на антитела ВИЧ в условиях ограниченных ресурсов (в домашних или иных условиях). К примеру, 21% больных ВИЧ в США не осведомлены о своем ВИЧ-статусе и могут быть ответственны за 50% заражений [5, 30]. Более того, приблизительно 80% больных ВИЧ в странах с низким и средним уровнем дохода не осведомлены о том, что они ВИЧ-положительны. Недавние отчеты по странам тропической Африки свидетельствуют о том, что только 12% мужчин и 10% женщин были проверены на ВИЧ и получили результаты своих тестов.

В данных обстоятельствах ВИЧ-тестирование должно соответствовать тестовым стратегиям CDC-ЮНЕЙДС-ВОЗ и релевантным мировым тестовым алгоритмам, краткое описание которых можно найти по адресу ([http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/publications/HIVRapidGuide.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/HIVRapidGuide.pdf); от 10/06/09).

Тестовые алгоритмы включают в себя либо последовательное (серийное), либо параллельное тестирование ([http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/en/](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/en/); от 10/06/09). Алгоритмы ИФА в основном серийные и требуют подтверждения второго положительного результата теста, при котором используются либо различные антигены, либо исследовательская платформа (либо оба метода) из первого теста. Второй результат реактивного теста считается подтверждением первого реактивного теста, если доминирование серотипа составляет 5% и более. В условиях низкого уровня доминирования серотипа, при котором вероятны ложноположительные результаты, следует провести третий подтверждающий тест (например, ВИЧ-1 РНК или ДНК). Серийное тестирование менее дорого, и второй тест требуется, только если первый тест среагировал.

Параллельное (одновременное) тестирование рекомендуется при использовании образцов цельной крови из пальца вместо венозной крови и подходит для простого и быстрого тестирования, хотя серийное тестирование также можно использовать. Алгоритм параллельного тестирования применяет два теста, в которых используются либо различные антигены, либо различные лаборатории (или и то и другое) и анализы проводятся одновременно. Согласованные отрицательные или положительные результаты точно считаются отрицательными или положительными соответственно.

Когда результаты параллельных исследований противоречат друг другу, может потребоваться консультация специалиста. Также ВОЗ и UNAIDS рекомендуют использовать специфичные тесты с минимальной чувствительностью 99% и специфичностью 98%, а также оценивать комбинацию тестовых алгоритмов в конкретной ситуации перед широкомасштабным использованием.

В качестве примера можно привести недавнее исследование в Уганде, в котором было выдвинуто предположение о том, что слабо окрашенные полосы, обнаруживаемые простыми и быстрыми анализами на антитела, которые согласно утверждениям производителя обозначают положительный результат, на самом деле уменьшили положительное прогностическое значение алгоритма анализа, использованного в данном исследовании. В этой связи, перед оглашением результатов наличие слабых положительных окрашенных полосок следует дополнительно проверять методом ИФА и вестерн-блотом. Также для простых и быстрых анализов должен проводиться качественный контроль с серологической пробой.

## Выявление подтипов ВИЧ-1

Белок оболочки ВИЧ-1, выделенный в различных географических зонах по всему миру, может различаться более чем на 35% позиций аминокислот [32]. В результате подобного разнообразия виды ВИЧ-1 разделяют на три группы: М (*major*, главная, которая ответственна за большинство инфекций в странах Америки и Европы), О (*outlier*,

обособленный вид, встречающийся в Камеруне и Габоне), N (не-M-не-O) и самая молодая разновидность P, которая была выделена у женщины из Камеруна и родственен вирусу иммунодефицита гориллы.

В группе M было обнаружено 11 главных подтипов (или филогенетических ветви), обозначенных буквами от A до H, J, K и U, а также 29 главных циркулирующих рекомбинантных форм (<http://www.hiv.lanl.gov/> от 10/06/09). Подтип B наиболее широко распространен в США и Европе, в то время как подтипы A, C, и AE распространены в странах Африки и Азии. В США подтипы других групп, помимо группы B, приобретают все большую распространенность и в национальном масштабе могут составлять приблизительно 5% ВИЧ-инфекций [33]. Рекомбинантные формы преобладают в отдельных географических зонах мира, к примеру AE преобладает в Юго-Восточной Азии, AG — в Западной и Центральной Африке, AB — в России, FD — в Демократической Республике Конго, BC — в Китае, BF — в Южной Америке. Также существует несколько дополнительных и уникальных рекомбинантов, совмещающих в себе три или более подтипов.

Штамм вируса группы O был выделен от жителей Западно-Центральной Африки. Также встречаются разрозненные сообщения о разновидности вируса группы O в Европе и США. Реагенты для набора диагностики были улучшены для обеспечения оптимальной чувствительности и специфичности для антител вируса группы O.

Так как большинство пар праймеров для ПЦР РНК ВИЧ-1 были оптимизированы для группы вирусов B (см. ниже), неудивительно, что ПЦР ВИЧ-1 РНК может не обнаружить ВИЧ-1 группы O и некоторых подтипов M [34, 35]. Для устранения данных недостатков улучшенные пары праймеров для таргетной области гена капсидных белков ВИЧ-1 были введены в тест-системы Roche Amplicor™ на ВИЧ-1 ДНК и Roche Monitor™ HIV-1 RNA (версия 1,5), а также в экспресс-тест-систему ПЦР Roche COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 (версия 1.0). Однако сложность в обнаружении некоторых филогенетических ветвей и нефилогенетических ветвей привела к созданию новой версии тест-системы Roche COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan (версия 2.0), который покрывает как область гена капсидных белков, так и LTR-области и увеличивает чувствительность анализа. Из-за большого числа роl-специфических синтетических олигонуклеотидных таргетных зондов, использованных в анализе на вДНК (Baye Versant HIV-1 RNA 3,0), при обнаружении группы O и различных подтипов группы B для анализа на вДНК проблема количественной оценки не возникает.

## Выявление антител к ВИЧ-2

В США было зафиксировано относительно мало случаев ВИЧ-2, однако в разных штатах качество анализов различается, и потому ВИЧ-2-инфекцию скорее всего недооценивают [36]. ВИЧ-2-инфекция у до-

норов крови в США крайне редка. При обследовании за июль 1995 г. из 74 млн доноров было обнаружено лишь три случая [37]. Из 62 больных с ВИЧ-2-инфекцией, зафиксированных в США, 44 (77%) родились, путешествовали или имели полового партнера из Западной Африки. Тем не менее диагностика ВИЧ-2-инфекции в США представляет растущую проблему и, вероятно, недостаточно освещена, поэтому требуется проведение скрининга на антитела обоих вирусов.

Геномы ВИЧ-1 и ВИЧ-2 гомологичны приблизительно на 60% в консервативных генах, например в гене капсидных белков и *pol*-гене. Для генов *env* гомологичность составляет от 35 до 45%. Капсидные белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2 часто проявляют перекрестную реактивность, в то время как белки оболочки более специфичны по типу. Несмотря на данную перекрестную реактивность, при обследовании доноров крови в США с помощью ИФА на анти-ВИЧ-1 было обнаружено от 55 до 91% ВИЧ-2-инфекций [38]. При использовании ВИЧ-2-положительной сыворотки вестерн-блоты на ВИЧ-1 антитела могут быть положительными, отрицательными или неопределенными.

При подтверждении ВИЧ-2 методом ИФА реактивности p26 и gp36 реагируют на свои ВИЧ-1 аналоги p24 и gp41 соответственно. Busch et al. протестировали 913 образцов анти-ВИЧ-1 реактивной сыворотки доноров крови, используя анти-ВИЧ-2 скрининг ИФА с подтверждающим анти-ВИЧ-2 ИФА и анти-ВИЧ-2 вестерн-блотом. Эти 913 сывороток были получены посредством анти-ВИЧ-1 скрининга приблизительно 242 000 доноров за трехлетний период. Ни одного случая ВИЧ-2-инфекции обнаружено не было.

При назначенном ВИЧ-тестировании следует получить тесты на антитела ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в следующих случаях: присутствие эпидемиологических факторов риска ВИЧ-2-инфекции, имеется клиническое подтверждение ВИЧ-заболевания при отсутствии положительного теста на антитела ВИЧ-1 или результаты ВИЧ-1 иммуноблота демонстрируют неопределенный и необычный паттерн гена капсидных белков (*gag*) и окрашенных полосок гена *pol* в отсутствие окрашенных полосок гена *env*.

В случае если и ВИЧ-1 и ВИЧ-2-тесты проводятся с помощью комбинированного ВИЧ-1/ВИЧ-2 ИФА, рекомендуется выполнение следующих процедур [22]. Повторно реактивный образец ВИЧ-1/ВИЧ-2 ИФА должен быть проверен ВИЧ-1-иммуноблотом (или другим дополнительным одобренным тестом на ВИЧ-1). Положительный результат ВИЧ-1 иммуноблота подтверждает присутствие антител ВИЧ-1, поэтому тест на ВИЧ-2 рекомендуется только в случае присутствия факторов риска ВИЧ-2. Если результаты вестерн-блота на ВИЧ-1 отрицательные или неопределенные, следует провести ВИЧ-2 ИФА. Если ВИЧ-2 ИФА реактивен, следует провести дополнительный тест на ВИЧ-2, например ВИЧ-1-специфический вестерн-блот. К тому же для определения инфекции ВИЧ-1, ВИЧ-2 или обоих вирусов используется ПЦР на ДНК ВИЧ-2 (смотри ниже). Как было ранее упомянуто, Клиническая лаборатория ретровирусологии Университета Ва-



Вашингтона производит немедленную проверку всех реактивных ИФА на ВИЧ-1/2 с помощью многоточечного быстрого теста на ВИЧ-1/2. К настоящему времени нами было обнаружено полное соответствие между результатами ВИЧ-1 или ВИЧ-2-специфического вестерн-блота, с помощью которого, в общем, обнаруживают один или два случая ВИЧ-2 — это составляет приблизительно 1% всех ВИЧ-1, подтвержденных вестерн-блотом тестов в Университете Вашингтона, которые являются ВИЧ-1 РНК отрицательными, Multispot ВИЧ-2 реактивными, и ВИЧ-2 подтвержденными вестерн-блотом (личное сообщение автора, 10/1/09).

## ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

### Культура

Обнаружение ВИЧ-1 в смешанной культуре лимфоцитов — специальная процедура, которая имеет беспрецедентно высокий уровень специфичности и более низкую чувствительность у больных с высоким уровнем клеток CD4+ и низким вирусным уровнем менее  $10^4$ – $10^5$  копий РНК/мл по сравнению с методами обнаружения вирусных нуклеиновых кислот (смотри ниже) [39, 40]. Более низкая чувствительность культуры ВИЧ-1 (за исключением других педиатрических методов диагностики), гораздо более высокая цена и временные затраты в сравнении с сегодняшними методами обнаружения вирусных нуклеиновых кислот позволяют использовать метод культуры ВИЧ-1 преимущественно для исследовательских лабораторий. Однако метод культуры ВИЧ-1 может найти свое применение при оценке вирусного заражения после сильной антиретровирусной терапии [41–43].

### Антиген р24 ВИЧ-1

В основном метод обнаружения антигена р24 используется в период окна острой ВИЧ-1-инфекции, который дает отрицательные результаты при детекции антител, однако сейчас его практически вытеснил метод тестирования ВИЧ нуклеиновых кислот (метод амплификации нуклеиновых кислот). И хотя метод обнаружения антигена дешевле детекции вирусной РНК, методы обнаружения вирусной РНК или мовонуклеарной клеточной культуры периферической крови гораздо более чувствительны, чем обнаружение антигенами р24, даже если чувствительность антигена р24 увеличить кислотной диссоциацией [44]. Однако, по сообщениям, ИФА с тирамид-амплификацией сигнала для количественной оценки антигена р24, диссоциированного при нагреве, имеет чувствительность, сравнимую с методом амплификации вирусной РНК полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) при 200–400 РНК копий/мл. При реактивности ИФА на антиген р24 требуется подтверждение анализа на нейтрализацию [45].

## Вирусная нуклеиновая кислота

Обнаружение вирусной нуклеиновой кислоты (провирусной ДНК или вирусной РНК) коммерчески доступными технологиями амплификации представляет собой специфический и чувствительный метод прямого обнаружения ВИЧ у больных без проявлений сероконверсии и зараженных детей, который также подходит для разрешения неопределенных результатов ВИЧ-1 серологии антител. К тому же количественный анализ вирусных РНК в плазме оказал неоценимую поддержку при диагностировании прогноза болезни и возможной реакции на антиретровирусную терапию.

## Вирусные ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови

Количественная ПЦР-амплификация ДНК ВИЧ-1 — стандартный метод, используемый при диагностике ВИЧ-1-инфекции у новорожденных и детей [49]. Набор для тестирования ВИЧ-1 Roche Amplicor™ (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) одобрен FDA для использования в клинических и исследовательских целях и использует тест для выявления ДНК ПЦР в реальном времени COBAS Amplicor/COBAS AP/TM HIV-1.

Главные преимущества ВИЧ-1 ДНК ПЦР по сравнению с методом культуры ВИЧ заключается в большей чувствительности и в более ранних сроках получения результатов теста, а именно один день по сравнению с периодом от двух до четырех недель. Однако диагностическая эффективность теста на обнаружение ВИЧ РНК может равняться или превышать эффективность метода культуры и обнаружения ДНК ВИЧ [50]. Всегда существует риск возможной ложноположительной реактивности, вызванной контаминацией образца ампликонами (так называемая контаминация при переносе), хотя его и можно немного уменьшить использованием фермента урацил-N-гликозилазы в анализе [51, 52]. Ложноотрицательные результаты также могут быть вызваны подавлением реакции ПЦР гемоглобином или гепарином или же в случае, если в пробе присутствует меньше целевых клеток, чем ожидалось. Чтобы проконтролировать последнее и улучшить точность анализа, тест на ДНК ВИЧ-1 также должен включать в себя конкурентную амплификацию, например HLA-Dqa или глобулиновый локус. Участие в программе проверки качества также поможет быстро определить проблемы чувствительности и специфичности. Использование ПЦР ДНК ВИЧ-1 для диагностики инфекции у взрослых должно быть сведено к ситуациям, в которых известно, что тесты на антитела или подтверждающие тесты на антитела будут недостаточными в силу низких уровней РНК ВИЧ (<5000 копий/мл) и предполагаемой первичной ВИЧ-инфекции. Однако во время терапии наблюдение за изменением уровня ДНК ВИЧ-1 обычно не производится.

## Вирусные РНК в плазме крови

Детекция РНК ВИЧ-1 в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), реакция транскрипционной амплификации (NASBA), сигнальная амплификация вДНК (метод разветвленных ДНК-зондов) или транскрипционно опосредованная амплификация обладают большей чувствительностью, чем ИФА на антиген р24 или метод культуры ВИЧ при обнаружении РНК ВИЧ-1 в плазме крови (табл. 23.3). Поэтому использование РНК из плазмы в качестве диагностического теста представляет большой интерес и существует множество предпосылок для введения технологий амплификации нуклеиновых кислот в алгоритмы диагностики, особенно когда присутствует острая инфекция.

Во избежание ложноположительного диагноза анализ РНК ВИЧ-1 следует использовать только в качестве дополнительного теста при обнаружении острой инфекции, отрицательной на антитела. Поэто-

Таблица 23.3

Одобренные FDA коммерческие анализы ВИЧ-1 РНК в США (2009)<sup>a</sup>

Тест на РНК ВИЧ-1	Производитель	Метод амплификации
ОТ-ПЦР-амплификация	Amplicor HIV-1 Monitor (Roche) v. 1.5. В основном используется в клинической практике, однако сейчас все больше уступает место анализу ПЦР в реальном времени (см. ниже)	РНК целевого гена капсидных белков
Амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA)	NucliSens HIV-1 RNA QT (bioMérieux)	РНК-мишень
Гибридизация нуклеиновых кислот или разветвление цепи ДНК (вДНК)	VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (Siemens)	Сигнал; многоточечные <i>pol</i> -мишени, улучшенное обнаружение нефиллогенетической ветви
ОТ-ПЦР-амплификация в режиме реального времени <sup>b</sup>	COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 Test <sup>c</sup> (Roche) ВИЧ-1 тест вирусной нагрузки в режиме реального времени (Abbot)	РНК-мишень ( <i>gag</i> или <i>pol</i> -интеграза соответственно); тесты имеют улучшенное качество обнаружения групп М, N, и О

<sup>a</sup> Другие тесты на основе таргетной амплификации нуклеиновых кислот включают в себя: (1) ДНК-гибридизация и колориметрическое обнаружение (анализ Дигена); (2) множественная транскрипционно-опосредованная амплификация (Gen-Probe APTIMA RNA Qualitative Assay или Procleix HIV-1/HCV Assay, оба одобрены FDA для скрининга продуктов крови).

<sup>b</sup> Наиболее распространенный независимый (в пределах лаборатории) анализ.

<sup>c</sup> Во второй версии данного теста мишенями служат участки *gag* и *LTR*; тест-система одобрена для применения в Европе, однако не имеет разрешения FDA в США.

му в данных условиях диагностики экспресс-анализ РНК на ВИЧ-1 (особенно при низком числе копий вирусных РНК <5000 копий/мл) нужно подтверждать другим тестом на нуклеиновые кислоты, предпочтительно ПЦР на ДНК ВИЧ-1 или на антиген р24 ВИЧ-1 (если тест имеется в наличии). Также можно провести повторное тестирование на специфические антитела к ВИЧ-1, которые обычно развиваются после двух или трех недель после обнаружения вирусной РНК (см. табл. 23.1). Само по себе присутствие РНК ВИЧ-1 требует сопоставления с медицинской и эпидемиологической историей и обязательного повторного анализа крови для подтверждающего теста на ВИЧ-1.

### Количественные анализы на ВИЧ-1 РНК

Существует пять различных коммерческих анализов для обнаружения и количественной оценки вирусных РНК в плазме крови, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами. В данных анализах количественная оценка производится посредством амплификации либо целевой РНК, либо сигнала (табл. 23.3). Предельные значения количественного анализа предоставляют приемлемый уровень чувствительности и диапазон для большинства клинических задач. Предельное значение количественного анализа означает уровень, при котором дисперсия метода составляет менее  $10^{0,15}$  РНК копий/мл, так что 95%-я уверенность ограничена разницей между двумя показателями равными  $\pm 10^{0,5}$  РНК копий/мл, или разницей приблизительно утроенного достоверно измеренного количества вирусных РНК [53].

Данная интерпретация отличается от заявленной производителями, сообщающих о более низкой базе количественной оценки с менее строгими критериями оценки.

Для обнаружения ВИЧ-1-инфекции FDA были одобрены две тест-системы, применяемые для автоматизированной подготовки образцов и ПЦР-анализа в режиме реального времени: Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TagMan HIV-1Test (основанный на амплификации таргетных генов капсидных белков) и Abbot 2000 System HIV-1 ПЦР) анализ в режиме реального времени (основанный на амплификации *pol* (интеграза) мишени). Эти системы должны облегчить процесс обработки больших количеств клинических образцов при количественном анализе РНК ВИЧ-1. Хотя оба автоматизированных анализа обнаруживают и производят количественную оценку подтипов ВИЧ-1 среди широкого динамического диапазона РНК ВИЧ-1 (50–10 млн РНК копий/мл плазмы крови), мутации генов капсидных белков вызвали необходимость в изменении устройства целевых праймеров и анализов, дабы соответствовать данным мутациям и все возрастающему числу разновидностей ВИЧ-1 [35].

### Рекомендации к количественному анализу образцов РНК на ВИЧ-1

Для минимизации разнообразия результатов количественных анализов РНК на ВИЧ-1 образцы, собранные для определенного анали-

за, следует обрабатывать сразу после взятия крови, используя один и тот же тип пробирок с коагулянтом для взятия крови [54].

В целом предпочтительный антикоагулянт — это ЭДТА. По общим рекомендациям, взятым из работы Holodnyi et al., нужно выделить и хранить плазму в течении шести часов после сбора при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Подобная быстрая обработка образца может значительно осложнить работу лаборатории. Более того, условие шестичасовой обработки может быть слишком строгим, и недавнее исследование это подтверждает [55]. В случае анализа при помощи Amplicor HIV-1 Monitor™ число копий вирусных РНК составляло  $10^{0.5}$  (утроенное значение) в образцах крови и плазмы, образцы содержались при температуре окружающей среды или при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение трех дней и оставались стабильными, несмотря на лимитированную заморозку и разморозку [56].

Использование фильтровальной бумаги для сбора и хранения цельной крови для последующего анализа вирусной нуклеиновой кислоты является привлекательной альтернативой флеботомии и, похоже, подходит и для количественной оценки, и для секвенирования ВИЧ-образцов, полученных в полевых условиях [57–61].

## Обнаружение подтипов ВИЧ-1

Поскольку подтипы ВИЧ-1 распространены в разных географических зонах, пары праймеров и зонды, используемые при обнаружении нуклеиновых кислот ВИЧ и в количественном анализе, были модифицированы для обнаружения подтипов, отличных от группы В.

Например, сообщается, что тест-система APTIMA HIV-1 RNA Qualitative Assay (Gen-Probe, San-Diego CA) с точностью обнаруживает все главные группы ВИЧ-1 подтипа М, а также некоторые вирусы из групп N и O [62]. Модификации пар праймеров были введены в тест-системы Roche Amplicor HIV-1 DNA и Monitor и HIV-1 RNA (версия 1.5), COBAS AP/™ ПЦР-анализ в режиме реального времени Abbott m2000. Из-за большого числа *pol*-специфических олигонуклеотидных целевых проб, которые используются в анализе вДНК (VERSANT HIV-1 RNA 3.0, Bayer Corporation, Norwood, MA), обнаружение вирусов группы O и различных подтипов не из группы В не является для данного анализа особо сложной задачей [63].

## Обнаружение ВИЧ-2

Для детекции нуклеиновых кислот ВИЧ-2 необходимы специфические праймеры и зонды [64]. Из-за значительного генетического разнообразия вирусов ВИЧ-2 вирусы разделяют на пять генетических подтипов, от А до Е, с превалирующим подтипом А. Аналогично ВИЧ-1 у ВИЧ-2 происходит рекомбинация филогенетически разных вирусов, однако о генетической рекомбинации ВИЧ-1 и ВИЧ-2 не сообщалось [65]. По сравнению с ВИЧ-1 уровни РНК ВИЧ-2 в плазме крови и сперме значительно ниже, вследствие чего имму-

нологическое расстройство наступает медленнее и шансы передачи заболевания меньше. Из-за нежелательного увеличения числа ВИЧ-2-инфекций в США возникла необходимость в разработке количественных анализов РНК на ВИЧ-2, которые бы облегчили ведение больных ВИЧ-2.

## ГЕНОТИП И ФЕНОТИП ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Неполное подавление репликации ВИЧ-1 *in vivo* может возникнуть из-за плохой усвояемости лекарства, несоблюдения режима терапии со стороны больного, различной фармакокинетики антиретровирусных лекарств и компартментализации инфекции, с формированием штамма вируса, резистентного к лекарствам (также первичная лекарственная резистентность). Такое неполное подавление может стать результатом форм ВИЧ-1, резистентных к лекарствам (вторичная лекарственная резистентность), что оказывается одним из важных факторов безуспешности терапии. При подборе антиретровирусной терапии может быть полезна оценка лекарственной резистентности, однако это не было с точностью доказано [67]. Тем не менее доступны коммерческие тест-системы для определения антиретровирусной лекарственной резистентности. Клинические исследования показали, что лекарственная резистентность зачастую связана с плохой реакцией вирусов на терапию. Учитывая сложность результатов и ограничения тест-систем, рекомендуется консультация специалиста [68]. Особенно полезный алгоритм для данной цели доступен на сайте <http://hivdb.stanford.edu>, от 10/01/09.

Антиретровирусная лекарственная чувствительность определяется либо генотипически посредством оценки мутаций, которые проявляют резистентность, либо фенотипически, посредством оценки лекарственной чувствительности вируса, изолированного (или *pol-рекомбинантного*) *ex vivo*. Генотипические методы обнаружения ВИЧ-резистентности включают в себя секвенирование ДНК всей популяции или клонов или ПЦР-анализ, определение точечных мутаций, гибридизацию дифференцированных проб, модификацию ферментного иммуноанализа, тест на реакцию обнаружения олиголигазы и коммерчески доступную тест-систему обратной линии транскрипции ВИЧ-1 [69]. Существует несколько коммерчески доступных наборов для тестирования генотипической резистентности. Тест-системы HIV-1 Trugen (Visible Genetics/Bayer Healthcare, Сувани, шт. Джорджия, США) и Viroseq (Celera/Abbott Laboratories, Роквилль, шт. Джорджия и Сан-Франциско, шт. Калифорния) одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами. Однако генотипические изменения могут не всегда соответствовать изменениям лекарственной чувствительности у клинической культуры [70]. Консультативные группы рекомендуют ввести тест на лекарственную чувствитель-

ность в стандартную клиническую практику, однако многие лечащие врачи продолжают выносить решения о начале или изменении терапии, основываясь на данных об уровнях вирусных РНК, количестве клеток CD4+, а также о предыдущем лекарственном анамнезе, обращая особое внимание на соблюдение пациентом предписанного режима терапии [1, 68].

Для определения фенотипа лекарственной чувствительности из плазмы крови или из связанного сывороткой вируса (вРНК) или из провируса, связанного с клеткой (вДНК), получают ПЦР-амплифицированные ампликоны *pol*-гена, содержащие обратную транскриптазу и протеазу. Эти ампликоны вводятся в ДНК лабораторного клона ВИЧ с делецией генов обратной транскриптазы и протеазы. Эту инфекционную ДНК клона ВИЧ затем вводят в перmissive клеточную линию для создания пула инфекционного рекомбинантного вируса. Данный рекомбинантный вирус используется для определения лекарственной чувствительности к отдельным антиретровирусным лекарствам. Модификация данного подхода использует рекомбинантный тестовый вектор (РТВ) ДНК ВИЧ, который содержит вирусный *pol*-ген больного и индикаторный ген (люцифераза), который введен в *env*-ген, тем самым предотвращая экспрессию белка оболочки ВИЧ-1. При котрансфекции перmissive клеток с ДНК РТВ и плазмидой, которая экспрессирует белок оболочки амфотропного вируса лейкоза мышей (MuLV), образуется псевдовиром. Способность частиц псевдовиром завершать репликацию за один раз оценивается посредством измерения уровня производства люциферазы в чувствительных клетках-мишенях. К примеру, антивирусная активность ингибитора протеазы (ИП) измеряется путем добавления ИП в котрансфицированные клетки, что выливается в производство неинфекционных псевдовиромов, неспособных к заражению новых клеток-мишеней. Антивирусная активность ингибитора обратной транскриптазы (ИОТ) измеряется путем добавления ИОТ к клеткам-мишеням, что предотвращает инфицирование данных клеток псевдовиромом, который берет начало из изначально котрансфицированных вирусом [70].

Следует заметить, что первичная резистентность к ВИЧ-1 может быть обнаружена у вирусом, выделенных от значительного числа людей с недавно диагностированным заболеванием. Это называется «передающаяся лекарственная резистентность». Передающаяся лекарственная резистентность — наглядный пример неудачных мер по профилактике ВИЧ-1. И хотя преобладание передающейся лекарственной резистентности практически сведено на нет из-за улучшенных мер вирусной супрессии, достигнутых с помощью более качественного медицинского обслуживания и более эффективной антиретровирусной терапии, риск подобной резистентности, препятствующей устойчивой вирусной супрессии, обязывает практикующих врачей определять лекарственную чувствительность больного ВИЧ-1 перед началом терапии [71].

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РНК ВИЧ-1 ДЛЯ МОНИТОРИНГА ИНФЕКЦИИ

### Уровень РНК ВИЧ-1 у зараженных взрослых людей

Оценка иммунной дисфункции с помощью подсчета Т-клеток CD4 и уровня сдерживания распространения вируса при помощи оценки уровня РНК ВИЧ-1 в плазме дает больным ВИЧ-1 прогностическую информацию. Одной из наиболее ценных концепций при понимании патогенеза ВИЧ-1 является тот факт, что интенсивность репликации ВИЧ-1 напрямую связана со скоростью развития заболевания [72–74]. Уровень РНК ВИЧ в плазме отражает способность организма больного сохранять репликацию вируса на таком уровне, что она достигает квази-стабильного состояния с клиренсом вируса, это позволяет частично определить дальнейшую скорость развития заболевания [75, 76]. Такое квази-стабильное состояние называют вирусной «контрольной точкой», и ее развитие происходит в период 3–6 мес. после первичной инфекции. В этот период развивается ВИЧ-специфическая гуморальная и цитотоксическая реакция лимфоцитов. Вирусный гомеостаз представляет низший предел сдерживания вирусного распространения, после которого уровни РНК плазмы могут начать медленно расти, увеличивая риск развития СПИДа. Однако у некоторых пациентов может наблюдаться сохранение гомеостаза вирусной РНК в плазме, что представляет собой дополнительный клинический успех.

В целом пациенты с большим шансом развития заболевания имеют более высокий уровень гомеостаза вирусной РНК по сравнению с пациентами с более медленным развитием заболевания [77]. Однако со временем прогностические значения высоких уровней вирусных РНК плазмы падают, в то время как прогностическое значение низкого количества клеток CD4+ и клеточной функции CD4+ со временем растет. Поэтому на поздних стадиях инфекции, иммунная недостаточность (т. е. число клеток CD4) является самым точным способом прогноза развития заболевания [78].

Это важно, так как имеется непрерывная шкала риска развития заболевания, связанного со стабильным уровнем вирусных РНК. Одной из целей антиретровирусной терапии является «возврат» стабильного уровня вирусных РНК плазмы к уровню с наиболее низким риском развития заболевания. Результаты пробной терапии ВИЧ-1 показывают, что подавление репликации ВИЧ-1 (рассчитанное по уровню РНК ВИЧ-1 в плазме) связано с задержкой клинической прогрессии заболевания.

Проведенные ранее широкомасштабные рандомизированные клинические исследования с участием пациентов, прошедших первичную терапию нуклеозидом Marschner et al., показали, что уровень вирусной РНК в плазме снизился в 10 раз за период от «контрольной точки» до 24 недели, что сократило риск развития заболевания



на 72% (95% CI, 61–81%  $p < 0,001$ ) и показало отличные результаты по значительному уменьшению уровня вирусных РНК плазмы [79]. Важно, что любое избыточное уменьшение естественной изменчивости уровня ВИЧ-1 РНК плазмы (приблизительно в три раза, или  $10^{0,5}$ ) связано с задержкой в развитии заболевания. Однако в этом и других исследованиях прогностическая интерпретация любых значений вирусных РНК плазмы также зависит от уменьшения числа клеток CD4+. И хотя изменение уровня вирусных РНК плазмы является лучшим показателем клинической прогрессии, чем реакция клеток CD4+, совместное использование этих методов дает более полную картину риска развития заболевания, чем использование каждого из методов по отдельности [80]. Испытательные данные этих ранних клинических исследований указывают на то, что более полная оценка развития болезни достигается посредством использования методов подсчета уровня вирусных РНК плазмы и клеток CD4+, тем самым определяя на сегодняшний день основную цель лабораторного наблюдения за ВИЧ-1-инфекцией.

### **Наблюдение за уровнями РНК ВИЧ-1 у беременных**

Наблюдение за уровнями вирусной РНК ВИЧ-1 у беременных женщин ничем не отличается от наблюдения за остальными людьми [1, 81]. И хотя уровни вирусных РНК плазмы и клеток CD4+ имеют независимое прогностическое значения риска вертикальной передачи, изменения в уровне вирусной РНК в плазме в лучшем случае объясняют лишь 50% пользы использования терапии зидовудином [82]. Данная информация указывает на существование профилактической пользы антиретровирусной терапии при вертикальной передаче. Сильная связь между вертикальной передачей и уровнем вирусной РНК в материнской плазме указывает на то, что, для того чтобы уменьшить риск вертикальной передачи во время беременности менее чем до <1%, уровень вирусной РНК должен быть подавлен до уровня <1000 копий/мл или полностью [81].

Вследствие того, что передача может произойти, когда уровень РНК ВИЧ-1 в плазме не определяется, уровень РНК в плазме не должен являться определяющим фактором при принятии решения об использовании антиретровирусной профилактики. Поэтому, чтобы предотвратить передачу заболевания от матери ребенку, антиретровирусную терапию советуют проводить всем беременным вне зависимости от вирусологических, иммунологических или клинических параметров [81].

### **Использование вирусной РНК в плазме для определения причин неудачи антиретровирусной терапии**

Точное определение неудачи противовирусной терапии на основе уровня вирусной РНК недостаточно развито и различается в зависимости от данных клинических испытаний, которые рассматривают

это определение в качестве критической точки. В подобном определении должны учитываться клинический статус больного, количество клеток CD4+ и уровень вирусной РНК в плазме. Снижение вирусной РНК в плазме по крайней мере в 30 раз ( $10^{1,5}$ ) или более по отношению к исходному уровню через 4–8 нед. терапии обычно рассматривается как близкая к оптимальной реакция на терапию. К тому же многие практикующие врачи считают, что невозможность свести уровень вирусной РНК в плазме до значений ниже определяемого на 12–24 нед. терапии — свидетельство неудачной терапии [1]. Положение о нулевом уровне вирусных РНК в качестве критерия оценки успеха терапии основано на том факте, что репликация вируса в присутствии селективного противоретровирусного препарата может привести к развитию лекарственной резистентности. Однако во многих случаях попытка свести уровень вирусных РНК к нулю проваливается или же у больных происходит восстановление уровня вирусной РНК после начала антиретровирусной терапии [83].

### Вирусная резистентность

Было сделано произвольное предположение, что любое стабильное повышение уровня вирусной РНК в плазме на  $10^{0,5}$  (в три раза) выше низшего порогового уровня, которое не связано с интеркуррентной инфекцией, вакцинацией, несоблюдением предписанной антиретровирусной терапии, пониженным усвоением антиретровирусных препаратов, взаимодействием лекарств или методологией тестирования, скорее всего, означает неудачную терапию, обусловленную резистентной формой ВИЧ или потенциальной суперинфекцией — новым резистентным штаммом ВИЧ, устойчивым к действию лекарств [84]. Хотя генотипические и фенотипические изменения, связанные с лекарственной резистентностью *in vitro*, не всегда означают безуспешность лекарственной терапии, ретроспективные и проспективные клинические испытания по прогностическим значениям данных тестов играют дополнительную роль при выборе другой антиретровирусной терапии [1].

### Неопределенность при измерении уровня РНК ВИЧ-1

Существует вероятность неопределенного результата при единичном измерении вирусных РНК плазмы, и клиническим врачам и лаборантам полезно учитывать данную неопределенность измерений [85]. Подобная неопределенность возникает из-за транспортировки образца, эффективных характеристик анализа, технической вариантности анализа, которая выражается в тестировании разных образцов серий опытов или в режиме реального времени, а также различных уровней вируса у человека [86, 87]. В итоге при единичном измерении РНК данные факторы определяют с 95% -й уверенностью вариативность количества копий вирусных РНК в плазме при, по крайней мере, их пятикратном количестве ( $10^{0,7}$ ). Вследствие этого единичное измерение

вирусных РНК плазмы связано с определенным рядом значений ниже или выше опытных значений, занимающих 95% времени (2,5% временных значений могут быть меньше или больше данного пятикратного диапазона). К примеру, результаты показали, что у больного с 5000 копиями/мл вирусных РНК в плазме, полученными из единичного образца плазмы, при повторном тестировании крови, взятой через несколько дней или недель, опытное значение вирусной РНК может составлять от 1000 до 25 000 копий/мл, попадая в данный временной 95%-й диапазон.

С лабораторной и клинической точек зрения точная программа оценки качества вирусологии жизненно необходима. С помощью данной программы была установлена норма девиации количественных ВИЧ-1 РНК анализов, которая варьирует от менее чем  $10^{0,1}$  до  $10^{0,2}$  ВИЧ-1 РНК копий/мл в плазме [88].

При подобной точности анализов можно определять от трех- до восьмикратных изменений уровня вирусных РНК плазмы при серии опытов и от четырех- до 19-кратных изменений при тестировании в режиме реального времени. Очевидно, что невозможность точно определить уровень вирусной РНК в плазме вносит неопределенность и при смене антиретровирусной терапии, основанной на одном значении вирусной РНК в плазме.

В дополнение к вышесказанному вариативность при интерпретации абсолютного уровня вирусной РНК в плазме возникает вследствие различных клинических исследований популяции больных, использования сыворотки или плазмы крови для оценки уровня вирусной РНК, различных методов анализов вирусных РНК, а также различных антикоагулянтов и условий хранения.

К примеру, уровень вирусной РНК обычно составляет на  $10^{0,5}$  меньше для сыворотки по сравнению со значением для плазмы крови и зависит от использованного метода анализа; значения вДНК обычно вдвое меньше значений для ОТ-ПЦР; гепарин мешает обнаружению вирусных РНК как в вДНК, так и в ОТ-ПЦР, но не влияет на результаты в NASBA [55, 85].

Таким образом, некоторым пациентам на основании уровня вирусной РНК в плазме удачный вариант терапии могут сменить на неверный, поскольку часто возникает сильная неопределенность вследствие как сложности их измерения, так и клинического значения вирусной РНК, особенно когда результаты определения вирусной РНК в плазме и клеток CD4+ не совпадают. Это является особой проблемой при агрессивной терапии, когда решения о смене терапии определяются количественным анализом вирусных РНК, число которых должно приблизительно равняться определенному предельному содержанию, достаточному для анализа.

Оценка уровня вирусных РНК плазмы при вДНК и ОТ-ПЦР для большинства пациентов обычно совпадает. Однако результаты данных анализов будут не совпадать приблизительно в 20% случаев, и решение о продолжении или замене противовирусной терапии, основан-

ное на предельном значении количественного анализа, будет зависеть от выбора анализа на вирусные РНК [89].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика ВИЧ-1-инфекции посредством обнаружения и подтверждения присутствия ВИЧ-1/2-специфических антител в настоящее время улучшается благодаря простым/быстрым тестам на антитела. Такие быстрые тесты используются в клиниках венерических заболеваний, в КВД, при срочных анализах, в клиниках для сотрудников и во время родов беременных женщин без предварительного ВИЧ-тестирования. Предлагая быструю оценку статуса инфекции, практикующие врачи могут обеспечить лучшее консультирование больных ВИЧ-1.

Применение методов молекулярной диагностики, таких как ПЦР и другие технологии амплификации нуклеиновых кислот, предоставляет более раннее дополнительное подтверждение серологического статуса инфекции ВИЧ-1 и, в частности, более определенное и своевременное разрешение неопределенных результатов иммуноблотов. [10]. При повторном сборе образцов и их тестировании технологии амплификации нуклеиновых кислот играют определенную роль при диагностике ВИЧ-инфекции в отсутствие антител (т. е. острой инфекции) или в присутствии аллогенных антител (например, неонатальная инфекция) [8].

Непосредственный количественный анализ РНК ВИЧ-1 в плазме стал вехой в клинической борьбе с ВИЧ-1 за прошедшие несколько лет. Однако существуют и другие факторы, такие как иммунный статус хозяина, гаплотип антигена HLA и вирусный генотип и фенотип, предоставляющие важную прогностическую информацию касательно развития заболевания, что отражается в результатах значений вирусных РНК. Тест на лекарственную резистентность ВИЧ-1 стал стандартным при оценке риска неудачи вирусологической диагностики и ведении антиретровирусной терапии.

В дополнение ко всему вышесказанному, вариативность при интерпретации абсолютного уровня вирусной РНК в плазме возникает вследствие различных клинических исследований популяции больных, использования сыворотки или плазмы крови для оценки уровня вирусной РНК, различных методов анализов вирусной РНК, а также различных антикоагулянтов и условий хранения.

Таким образом, некоторым пациентам удачный вариант терапии могут сменить на неверный на основании уровней вирусных РНК плазмы, которые часто вызывают сильную неопределенность вследствие как сложности их измерения, так и клинического значения вирусных РНК плазмы, особенно когда результаты вирусных РНК плазмы и клеток CD4+ не совпадают. Это является особой проблемой при методе агрессивной терапии, в которой решения о смене терапии определяются количественным анализом вирусных РНК, число кото-

рых должно приблизительно равняться определенному предельному содержанию, достаточному для анализа. Оценка уровня вирусных РНК плазмы при вДНК и ОТ-ПЦР для большинства пациентов обычно совпадает. Однако результаты данных анализов будут не совпадать приблизительно в 20% случаев, и решение о продолжении или замене противовирусной терапии, основанное на предельном значении количественного анализа, будет зависеть от выбора анализа на вирусные РНК [89].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Грантовая поддержка: Университет Вашингтона, Центр исследования СПИДа AI-27757, AI-38858.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-infected Adults and Adolescents. Washington, D. C.: U.S. Public Health Service, 2008:1–139.
2. Coombs R. Clinical laboratory diagnosis of HIV-1 and use of viral RNA to monitor infection. In: Holmes K, Sparling PF, Lemon SM, et al., eds. Sexually Transmitted Diseases, 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2008:1329–1347.
3. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 2003; 17:1871–1879.
4. Schneider E, Whitmore S, Glynn KM, et al. Revised surveillance case definitions for HIV infection among adults, adolescents, and children aged <18 months and for HIV infection and AIDS among children aged 18 months to <13 years — United States, 2008. *MMWR Recomm Rep* 2008; 57:1–12.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised recommendations for testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55 (No RR-14):1–17.
6. Mellors JW, Margolick JB, Phair JP, et al. Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection. *JAMA* 2007; 297:2349–2350.
7. Stekler J, Sycks BJ, Holte S, et al. HIV dynamics in seminal plasma during primary HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24:1269–1274.
8. Stekler J, Maenza J, Stevens CE, et al. Screening for acute HIV infection: lessons learned. *Clin Infect Dis* 2007; 44:459–461.
9. Pilcher CD, Fiscus SA, Nguyen TQ, et al. Detection of acute infections during HIV testing in North Carolina. *N Engl J Med* 2005; 352:1873–1883.
10. Stekler J, Swenson PD, Wood RW, et al. Targeted screening for primary HIV infection through pooled HIV-RNA testing in men who have sex with men. *AIDS* 2005; 19:1323–1325.
11. Busch MP, Satten GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med* 1997; 102:117–124; discussion 125–126.
12. Zhang ZQ, Wietgreffe SW, Li Q, et al. Roles of substrate availability and infection of resting and activated CD4+ T cells in transmission and acute

- simian immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:5640–5645.
13. Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, et al. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2623–2628.
  14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Model performance evaluation program: testing for human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection. Washington, D. C.: Department of Health and Human Services, 1991.
  15. MacDonald KL, Jackson JB, Bowman RJ, et al. Performance characteristics of serologic tests of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) antibody among Minnesota blood donors. *Ann Intern Med* 1989; 110:617–621.
  16. Celum CL, Coombs RW. Indeterminate HIV-1 Western blots: implications and considerations for widespread HIV testing. *J Gen Intern Med* 1992; 7:640–645.
  17. Fonseca K, Anand CM. Predicting human immunodeficiency virus type 1-positive sera by using two enzyme immunoassay kits in a parallel testing format. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2507–2512.
  18. Nair BC, Ford G, Kalyanaraman VS, et al. Enzyme immunoassay using native envelope glycoprotein (gp160) for detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1449–1456.
  19. Ng VL, Chiang CS, Debouck C, et al. Reliable confirmation of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) with an enzyme-linked immunoassay using recombinant antigens derived from the HIV-1 gag, pol, and env genes. *J Clin Microbiol* 1989; 27:977–982.
  20. Sato PA, Maskill WJ, Tamashiro H, et al. Strategies for laboratory HIV testing: an examination of alternative approaches not requiring Western blot. *Bull World Health Organ* 1994; 72:129–134.
  21. Celum CL, Coombs RW, Lafferty W, et al. Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation. *J Infect Dis* 1991; 164:656–664.
  22. O'Brien TR, George JR, Epstein JS, et al. Testing for antibodies to human immunodeficiency virus type 2 in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41 (No RR-12):1–9.
  23. Burke DS, Brundage JF, Redfield RR, et al. Measurement of the false positive rate in a screening program for human immunodeficiency virus infections. *N Engl J Med* 1988; 319:961–964.
  24. Celum CL, Coombs RW, Jones M, et al. Risk factors for repeatedly reactive HIV-1 EIA and indeterminate Western blots. A population-based case-control study. *Arch Intern Med* 1994; 154:1129–1137.
  25. Greenwald JL, Burstein GR, Pincus J, et al. A rapid review of rapid HIV antibody tests. *Curr Infect Dis Rep* 2006;8:125–131.
  26. Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, et al. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis* 2009; 49:444–453.
  27. Irwin K, Olivo N, Schable CA, et al. Performance characteristics of a rapid HIV antibody assay in a hospital with a high prevalence of HIV infection. CDC-Bronx-Lebanon HIV Serosurvey Team. *Ann Intern Med* 1996; 125:471–475.

28. Malamud D. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med* 1997; 102 (suppl 4A):9-14.
29. Emmons WW. Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1997; 102 (suppl 4A):15-20.
30. Marks G, Crepaz N, Janssen RS. Estimating sexual transmission of HIV from persons aware and unaware that they are infected with the virus in the USA. *AIDS* 2006; 20:1447-1450.
31. Gray RH, Makumbi F, Serwadda D, et al. Limitations of rapid HIV-1 tests during screening for trials in Uganda: diagnostic test accuracy study. *BMJ* 2007; 335(7612):188-190.
32. Korber B, Hoelscher M. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics — Workshop report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and the joint United Nations programme on HIV/AIDS. *AIDS* 1997; 11:UNAIDS17-UNAIDS36.
33. Cartwright CP. The changing epidemiology of HIV/AIDS at a Minnesota hospital: impact of demographic change and viral diversity. *J Med Virol* 2006; 78 (suppl 1):S19-S21.
34. Elbeik T, Alvord WG, Trichavaroj R, et al. Comparative analysis of HIV-1 viral load assays on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:330-339.
35. Korn K, Weissbrich B, Henke-Gendo C, et al. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the CobasTaqMan HIV-1 real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1238-1240.
36. Onorato IM, O'Brien TR, Schable CA, et al. Sentinel surveillance for HIV-2 infection in high-risk US populations. *Am J Public Health* 1993; 83:515-519.
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Testing for antibodies to human immunodeficiency virus type 2 in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41 (R-12):1-8.
38. Busch MP, Petersen L, Schable C, et al. Monitoring blood donors for HIV-2 infection by testing anti-HIV-1 reactive sera. *Transfusion* 1990; 30:184-187.
39. Coombs RW, Collier AC, Allain JP, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989; 321:1626-1631.
40. Nicholson JK, Spira TJ, Aloisio CH, et al. Serial determinations of HIV-1 titers in HIV-infected homosexual men: association of rising titers with CD4 T cell depletion and progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989; 5:205-215.
41. Demeter LM, Bosch RJ, Coombs RW, et al. Detection of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in cultures from patients with levels of HIV-1 RNA in plasma suppressed to less than 500 or 50 copies per milliliter. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2089-2094.
42. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278:1295-1300.
43. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278:1291-1295.

44. Bollinger RC Jr., Kline RL, Francis HL, et al. Acid dissociation increases the sensitivity of p24 antigen detection for the evaluation of antiviral therapy and disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1992; 165:913–916.
45. Alter HJ, Epstein JS, Swenson SG, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen in U. S. blood donors: an assessment of the efficacy of testing in donor screening. *N Engl J Med* 1990; 323:1312–1317.
46. Mariotti M, Rouger P, Thauvin M, et al. Failure to detect evidence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection by polymerase chain reaction assay in blood donors with isolated core antibodies (anti-p24 or -p17) to HIV-1. *Transfusion* 1990; 30:704–706.
47. Phair JP, Margolick JB, Jacobson LP, et al. Detection of infection with human immunodeficiency virus type 1 before seroconversion: correlation with clinical symptoms and outcome. *J Infect Dis* 1997; 175:959–962.
48. Shearer WT, Quinn TC, La Russa P, et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336:1337–1342.
49. Owens DK, Holodniy M, McDonald TW, et al. A meta-analytic evaluation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV infection in infants. *JAMA* 1996; 275:1342–1348.
50. Lambert JS, Harris DR, Stiehm ER, et al. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34:512–519.
51. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93:125–128.
52. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 1995; 69:5087–5094.
53. Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trials Group virology laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2695–2701.
54. Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, et al. Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1562–1566.
55. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, et al. Determinations of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. TUBE Meeting Workshop Attendees. *Technology Utilization for HIV-1 Blood Evaluation and Standardization in Pediatrics. J Clin Microbiol* 1998; 36:1471–1479.
56. Sebire K, McGavin K, Land S, et al. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36:493–498.
57. Cassol S, Salas T, Gill MJ, et al. Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3039–3042.
58. Cassol S, Weniger BG, Babu PG, et al. Detection of HIV type 1 env subtypes A, B, C, and E in Asia using dried blood spots: a new surveillance tool for molecular epidemiology. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1435–1441.



59. Comeau AM, Pitt J, Hillyer GV, et al. Early detection of human immunodeficiency virus on dried blood spot specimens: sensitivity across serial specimens. *J Pediatr* 1996; 129:111-118.
60. Fiscus SA, Brambilla D, Grosso L, et al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by using blood dried on filter paper. *J Clin Microbiol* 1998; 36:258-260.
61. Mitchell C, Jennings C, Brambilla D, et al. Diminished yield of human immunodeficiency virus type 1 DNA from dried blood spots after storage in a humid incubator at 37 degrees C compared to -20 degrees C. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2945-2949.
62. Linnen JM, Gilker JM, Menez A, et al. Sensitive detection of genetic variants of HIV-1 and HCV with an HIV-1/HCV assay based on transcription-mediated amplification. *J Virol Methods* 2002; 102: 139-155.
63. Coste J, Montes B, Reynes J, et al. Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Med Virol* 1996; 50:293-302.
64. Schutten M, van den Hoogen B, van der Ende ME, et al. Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *J Virol Methods* 2000; 88:81-87.
65. Curlin ME, Gottlieb GS, Hawes SE, et al. No evidence for recombination between HIV type 1 and HIV type 2 within the envelope region in dually seropositive individuals from Senegal. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:958-963.
66. Gottlieb GS, Hawes SE, Agne HD, et al. Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. *AIDS* 2006; 20:895-900.
67. Panidou ET, Trikalinos TA, Ioannidis JP. Limited benefit of antiretroviral resistance testing in treatment-experienced patients: a meta-analysis. *AIDS* 2004; 18:2153-2161.
68. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis* 2008; 47:266-285.
69. Schuurman R. State of the art of genotypic HIV-1 drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 1997; 10:480-484.
70. Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:920-928.
71. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, et al. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 2009; 200:1503-1508.
72. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA* 1995; 274:554-558.
73. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122:573-579.
74. O'Brien TR, Blattner WA, Waters D, et al. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA* 1996; 276:105-110.
75. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-126.
76. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.

77. Ioannidis JP, Cappelleri JC, Lau J, et al. Predictive value of viral load measurements in asymptomatic untreated HIV-1 infection: a mathematical model. *AIDS* 1996; 10:255–262.
78. de Wolf F, Spijkerman I, Schellekens PT, et al. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *AIDS* 1997; 11:1799–1806.
79. Marschner IC, Collier AC, Coombs RW, et al. Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to assess the clinical benefit of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1998; 177:40–47.
80. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med* 1997; 126:929–938.
81. Perinatal HIV Guidelines Working Group. Public Health Service Task Force Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-infected Women for Maternal Health and Intervention to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. Washington, D. C.: U.S. Public Health Service, 2009:1–90.
82. Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, et al. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *N Engl J Med* 1996; 335:1621–1629.
83. Egger M, May M, Chene G, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002; 360:119–129.
84. Saag MS. Use of virologic markers in clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16 (suppl 1):S3-S13.
85. Brambilla D, Leung S, Lew J, et al. Absolute copy number and relative change in determinations of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: effect of an external standard on kit comparisons. *J Clin Microbiol* 1998; 36:311–314.
86. Paxton WB, Coombs RW, McElrath MJ, et al. Longitudinal analysis of quantitative virologic measures in human immunodeficiency virus-infected subjects with  $>$  or  $=$  400 CD4 lymphocytes: implications for applying measurements to individual patients. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis* 1997; 175:247–254.
87. Raboud JM, Montaner JSG, RAE S, et al. Issues in the design of trials of therapies for subjects with human immunodeficiency virus infection that use plasma RNA level as an outcome. *J Infect Dis* 1997; 175:576–582.
88. Lin HJ, Myers LE, Yen-Lieberman B, et al. Multicenter evaluation of methods for the quantitation of plasma HIV-1 RNA. *J Infect Dis* 1994; 170:553–562.
89. Yerkovich M, Sampoleo R, Dragavon J, et al. Low HIV-1 RNA copy number assessed by bDNA and RT-PCR assays: implications for managing patients above or below the viral RNA quantitation limit. In: Fifth National Conference on Human Retroviruses; February 1–5, 1998; Chicago. Abstract 303.

## 24 ПОЛИОМАВИРУС. ДИАГНОСТИКА, РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА И ХОД БОЛЕЗНИ

### П. Синк

Paola Cinque, Clinic of Infectious Diseases, San Raffaele Hospital, Milan, Italy

### А. Дюмулен

Alexis Dumoulin, Transplantation Virology and Division of Diagnostics, Institute for Medical Microbiology, Department of Biomedicine, University of Basel, Basel, Switzerland

### Х.Х. Хирш

Hans H. Hirsch, Transplantation Virology and Division of Diagnostics, Institute for Medical Microbiology, Department of Biomedicine, University of Basel, and Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital of Basel, Basel, Switzerland

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие полиомавируса (PvV) относят к 1950-м гг., когда было сообщено о заражении препаратом вируса мышинной лейкемии, который вызвал многочисленные опухоли (от греч. *polyoma* — множественные опухоли) у новорожденных мышей [1, 2]. В 1960-х гг. был открыт вирус SV40 (сокращение от *Simian vacuolating virus 40*), обнаруженный в культуре клеток почки макаки резус, которые использовали при производстве вакцины от полиомиелита и аденовирусной инфекции. Трансформирующие свойства в непермиссивных клетках хозяина и экспериментальных опухолевых моделях могли быть приписаны раннему продукту экспрессии вирусного генома, который получил название большого Т (*tumor* — опухоль)-антигена. SV40 стал не только основой для парадигмы ДНК-опухолевых вирусов, но и важной моделью взаимодействия хозяин—вирус. Несмотря на периодические сообщения об обнаружении SV40 в образцах от человека, роль вируса в заболеваниях человека достоверно не доказана.

В 1970-х гг. в образцах от человека были впервые обнаружены полиомавирусы ВК (BKV) и JC (JCV). BKV был выделен из мочи больного с инициалами В. К. с уретрическим стренозом и выделением с мочой «клеток-ловушек» (*«decoy-cells»*) после трансплантации почки [3]. Их патогенетический потенциал первоначально оставался определенным менее достоверно, хотя отмечалась повышенная восприимчивость больных после трансплантации почки. JC-вирус был выделен из ткани мозга больного с инициалами J. С. с прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатией (ПМЛ) с последующей визуализацией его при электронной микроскопии в 1965 г. [4, 5]. В 1950-х гг.

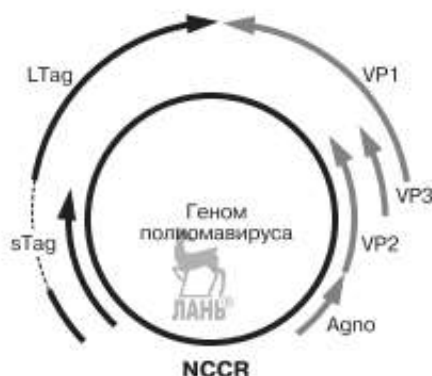
ПМЛ рассматривалась как редкое, главным образом, летальное заболевание центральной нервной системы больных с злокачественным процессом системы крови. Большинство случаев этого заболевания было зарегистрировано в эпоху СПИД/ВИЧ-инфекции до применения комбинированной противовирусной терапии. Начиная с 2005 г. ПМЛ вновь заявила о себе у больных после лечения иммуномодуляторами и лимфоцит-истоцитающими моноклональными антителами при борьбе с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, таких как воспалительное заболевание толстого кишечника, ревматоидный артрит и рассеянный склероз [6–8].

В 1980-х гг. ВКВ был связан с РvV-ассоциированным геморрагическим циститом, (РvНС), который имеет место у 5–15% больных — реципиентов аллогенных гематопозитических стволовых клеток [9–11]. Несмотря на высокую вирусную нагрузку ВКВ в моче, РvНС не может быть целиком объяснено высоким уровнем репликации вируса. Для клинического проявления нефропатии также, видимо, требуются уроотоксический и иммунологический кофакторы. В 1990-х гг. ВКВ был идентифицирован как ключевой этиологический агент полиомавирус-ассоциированной нефропатии (РvАН) — осложнения, которое все чаще встречается у больных после трансплантации почки, получающих мощные иммуносупрессоры [12–16]. К настоящему времени от 1 до 10% больных после трансплантации почки имеют риск отторжения в результате РvАН. В последнее время сообщалось о случаях РvV — ВКВ- [17] и JCV-ассоциированной прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии [18, 19], которые уничтожают сложившееся представление о моноэтиологической природе полиомавирусных инфекций («один вирус — одна болезнь»).

В 2006 и 2008 гг. в пробах респираторного секрета человека при скрининге методами молекулярного клонирования были обнаружены вирусы Каролинского института (KIV) [20] и Университета Вашингтона (WUY) [21]. Клиническое значение обоих вирусов в заболеваниях человека пока изучается. В 2008 г. на основании транскриптомного анализа был обнаружен вирус клеток Меркеля (MCV). Рак Меркеля представляет собой редкий агрессивный рак кожи пожилых людей и лиц с нарушениями иммунитета [22, 23]. Таким образом, перед клиническими специалистами и научными исследователями в настоящее время постоянно встает вопрос об этиологической роли все новых полиомавирусов, которые обнаруживаются во все возрастающих популяциях людей с глубокими нарушениями иммунитета.

## **ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

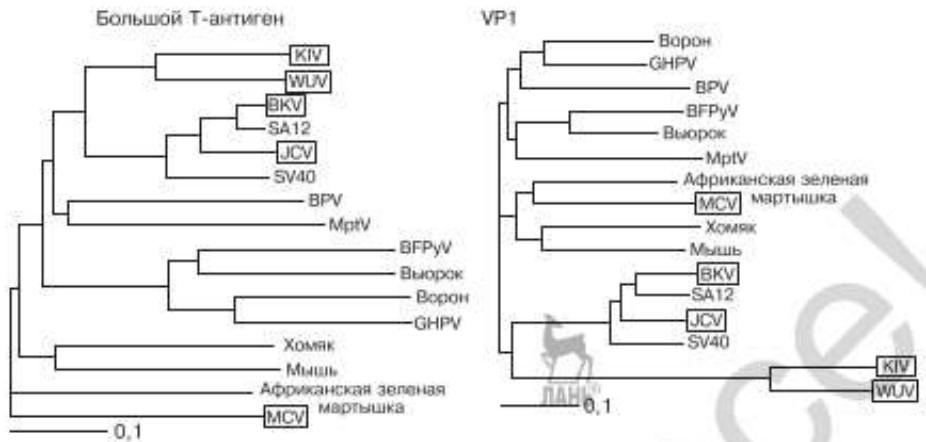
Вирусы РvV представляют собой безоболочечные икосаэдрические частицы размером от 40 до 45 нм в диаметре [2], достаточно устойчивые к инактивирующему действию окружающей среды: действию кислоты, эфира, прогрева до 50 °С в течение 1 ч [1, 2, 24]. Геном вириона содержит кольцевую двухцепочечную ДНК длиной при-



**Рис. 24.1.** Генетическая организация полиомавирусного генома. Размеры генома составляет примерно 5100 п. н. Ранние гены вируса (большой и малый Т-антиген) показаны черными стрелками, вирусные гены (VP1, VP2, VP3 и Agно) показаны серыми стрелками

мерно 5100 пар оснований, связанных с гистонами [1]. Совокупная структура генома консервативна и состоит из трех частей (рис. 24.1): (1) некодирующий контролирующий регион (NCCR), имеющий отношение к началу репликации ДНК, а также выступающий как энхансерный/промоторный элемент, координирующий экспрессию ранних и поздних генов вируса; (2) ранние гены вируса на одной цепочке ДНК, кодирующие большой и малый Т-антигены; (3) поздние гены вируса на второй цепочке ДНК, кодирующие капсидные белки VP1, VP2, VP3 и регуляторный агнопротеин. В человеческих образцах были обнаружены шесть PuV, которые обладают высокой степенью гомологии (50–80%) на уровне нуклеиновых кислот и аминокислот [22]. BKV, JCV, SV40 образуют общий кластер, так же как KIV и WUV, в то время как MCV проявляют более близкую родственность к PuV грызунов и обезьян (рис. 24.2). В настоящее время существует шесть подтипов BKV (Ia, Ib, Ic, II, III, IV), которые имеют отношение, по крайней мере, к четырем различным серотипам VP1 [25, 26].

PuV характеризуется узким диапазоном клеток-хозяев, который определяется не только наличием рецепторов на поверхности клеток, но и способностью рестрикции экспрессии вирусных генов региона NCCR. BKV, захватывается кавеолой мембраны после взаимодействия с рецепторами  $\alpha$  (2,3)-сиаловой кислоты и ганглиозидными (GD1b и GT1b)-рецепторами и активации сигнальных последовательностей [27,28]. JCV связывается в окаймленной клатрином ямке с последующим взаимодействием с  $\alpha$  (2,6) — сиаловокислотными структурами поверхности и связыванием со специфическими рецепторами, такими как 5HT<sub>2A</sub>-серотониновый рецептор [27]. Рецепторы к KIV и WUV еще не известны. Жизненный цикл вируса PuV человека хорошо описан для SV40, BKV и JCV *in vitro* в специфических клетках хозяина. Считается, что для BKV самой лучшей моделью естественной



**Рис. 24.2.** Филогенетические деревья полиомавирусов, построенные на основе аминокислотной последовательности большого Т-антигена и VP1. Источник: из [22] с изм.

клетки-мишени хозяина является первичная культура канальцевого эпителия человека (RPTECs). Экспрессия ранних генов продолжается от 12 до 36 ч после инфицирования. Большой Т-антиген — многофункциональный белок, который опосредует активацию клеток хозяина и ингибирование апоптоза путем инактивации белков pRB и p53, репликацию вирусного генома путем активации геликазы и рекрутинга клеточной ДНК-полимеразы, а также активирует экспрессию поздних вирусных генов. Экспрессия поздних генов происходит через 24–72 ч после инфицирования, затем следует сборка вирионов в ядре и высвобождение инфицирующего потомства [29]. Недавние исследования тканей PyVAN позволили описать похожую кинетику жизненного цикла BKV в тканях *in vivo* [30]. Тропизм к клеткам хозяина на уровне NCCR опосредуется синергией активации клеток хозяина и сигнальными событиями, которые могут включать цитокины, факторы роста и гормоны. Разработка прототипа NCCR вирусов BKV и JCV почти невозможна без использования адаптированных трансформированных клеточных линий. Более того, последующее распространение вирусных вариантов клеточной культуры с реконструированным регионом NCCR генома вируса также было обнаружено *in vivo* в геномах JCV от PyVML [32] и относительно недавно в геномах BKV из PyVAN [33]. Из этого квазивида с реконструированным NCCR были выделены варианты BKV с повышенной экспрессией ранних генов, более высоким уровнем репликации вирусов и ускоренным цитопатическим эффектом [33].

Онкогенный потенциал PyV был связан с экспрессией ранних вирусных генов, в частности с большим Т-антигеном. Разобщение экспрессии большого Т-антигена поздней стадии вирусного жизненного цикла и сборки вирионов от лизиса клеток-хозяев — характерная

черта онкогенной трансформации [34, 35]. Нарушение активации экспрессии поздних генов вируса может быть результатом реконструкции NCCR или хромосомной интеграции или мутации. Известно, что экспрессия большого Т-антигена может вызвать генетическую нестабильность. Обнаружение ДНК РvV или экспрессии большого Т-антигена в опухолевых тканях может быть важным диагностическим индикатором, но само по себе недостаточно, чтобы решить вопрос о том, является РvV ведущим фактором онкогенеза или невиным сопутствующим фактором, который лишь преимущественно инфицирует и персистирует в онкологически измененных клетках. Таким образом, потенциальная роль BKV, JCV и SV40 в злокачественных новообразованиях в организме человека, таких как мезотелиома, нейробластома и карциномы мочевого пузыря, толстой кишки и простаты остаются на стадии изучения. Однако для MCV получены убедительные свидетельства генетической разобщенности экспрессии ранних и поздних генов, что делает РvV сопоставимыми с HHV-8 и саркомой Капоши.

### **ПОЛИОМАВИРУС. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА И ТЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ**

Частота доминирования серотипа РvV у здоровых взрослых людей определена для BKV (80–90%), JCV (35–58%), KIV (55%), WUV (69%), MCV (25–42%) и SV40 (2–9%) [36–38]. Замечено, что между BKV и SV40 имеется значительная перекрестная реактивность. Таким образом, хотя в человеческих образцах обнаружено шесть РvV, тем не менее в человеческой популяции SV40, по-видимому, не циркулирует с достаточной эффективностью, несмотря на документально подтвержденное воздействие через вакцины, оборудование для обезьян и зоопарки с бесклеточным содержанием зверей.

Путь передачи BKV и JCV в естественных условиях пока не достаточно изучен и может быть оральным или респираторным. Первичное инфицирование BKV происходит в раннем детстве, так что >90% молодых взрослых людей инфицированы. Первичное JCV — инфицирование происходит позже и частота доминирования серотипа постоянно возрастает в течение всей жизни, достигая примерно 60% [36–38]. Как BKV, так и JCV переживают в латентном состоянии нереплицирующейся инфекции в нефроуринарной системе и, вероятно, в других тканях. Таким образом, BKV и JCV-сероположительные лица должны рассматриваться как инфицированные даже в отсутствие определяемого уровня репликации вируса. Популяционные исследования 2345 сывороток из Англии в 1991 г. с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) показали преимущественную сероположительность проб, составившую 81% для BKV и 35% для JCV [36]. Подобная частота приводится в других сообщениях, в которых использовались вирусоподобные частицы (VLP), полученные путем рекомбинантной экспрессии капсидного белка VP1 [38].

В глобальном исследовании 400 здоровых иммунокомпетентных доноров крови с применением иммуноферментного анализа в Швейцарии IgG BKV был обнаружен в 81% случаев, а IgG JCV — в 58% случаев, в качестве антигенов использовали VLP на основе VP1 вирусов BKV и JCV [37]. Бессимптомная репликация с выделением вирусов BKV и JCV с мочой была обнаружена в 7% и 19% при средней вирусной нагрузке в моче  $10^{3,5}$  и  $10^{4,6}$  геномных экв./мл соответственно [37]. Все, у кого отмечалось выделение вируса BKV и/или JCV, были IgG-сероположительны. BKV- или JCV-специфичные IgM обнаруживались менее чем в 1% и отмечались только у IgG-положительных лиц. В плазме крови в этих условиях исследования не была обнаружена ДНК ни BKV, ни JCV. Таким образом, качественное обнаружение ДНК BKV или JCV в моче не может считаться достаточным для постановки диагноза нарушения иммунитета и даже заболевания. Недавние публикации сообщают об обнаружении ДНК BKV в пробах фекалий и ректальных мазках госпитализированных детей, в этом исследовании также сообщается, что частота ДНК-положительных анализов на SV40 составила 8% [39].

У иммунодефицитных больных частота выделения BKV с мочой повышается более чем на 50%, вирусная нагрузка в моче превышает  $10^7$  геномных экв./мл. Уровень вирусной нагрузки и частота выделения JCV, по-видимому, менее связана с нарушением иммунитета. При трансплантации костного мозга у реципиентов BKV может быть обнаружен в 60–80% образцов мочи и 40% образцов фекалий, последние чаще поступают от больных с документально подтвержденным выделением вируса в моче. В то время как эти данные подчеркивают важность Т-клеточного контроля у BKV- и JCV-сероположительных лиц [15, 37], они также свидетельствуют о том, что количественный ПЦР-анализ более подходит для распознавания корреляции с PуV-заболеванием. Детекция ДНК BKV в сыворотке крови или ДНК JCV в цереброспинальной жидкости обычно рассматривается как суррогатный маркер заболевания для распознавания больных с предполагаемым PуVAN и лабораторно подтвержденным PуVML соответственно [40].



## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВКV

### Серология ВКV

Обнаружение ВКV-специфичных антител позволяет выявить людей, ранее подвергавшихся воздействию ВКV. В целом повышенные титры обозначают недавнее инфицирование, но не позволяет различить экзогенный и эндогенный ВКV. Титры ВКV-специфичных IgM — результат первичного антигенного воздействия на naive В-клетки и обычно обнаруживаются в ходе первичной ВКV-инфекции. ВКV-специфические IgM также могут быть обнаружены у IgG-положительных лиц после вторичного контакта с антигеном,



его уровень превышает активность соответствующего IgG. Такой серологический ответ также происходит у иммунодефицитных больных, но может быть по срокам сдвинут на более позднее время.

Для определения ВКВ-специфических антител используются пробы ингибирования гемагглютинации, иммуноферментного анализа, метод непрямой иммунофлуоресценции и реакция нейтрализации. Традиционным форматом являются пробы ингибирования гемагглютинации, которые основаны на том, что вирионы ВКВ, так же как и JCV, агглютинируют с человеческими эритроцитами I группы крови (0). Титры анти-ВКВ определяются как наибольшее из серийных разведений сыворотки, способное ингибировать положительную реакцию между фиксированным отношением вирионов и отмытыми красными клетками крови. Хотя пробы ингибирования гемагглютинации очень специфичны, их титры имеют ограниченную чувствительность и не позволяют различить классы антител: IgG, IgA и IgM. Принцип анализа верен, но реактивы не стандартизованы, в частности вирионы ВКВ, которые необходимы для теста, должны быть приготовлены из культуры тканей в специальных лабораториях.

Непрямая иммунофлуоресценция ВКВ-антител описана различными исследователями [41, 42] и использует ВКВ-инфицированные клеточные линии. Данные, полученные на почках инфицированных больных и реципиентах костного мозга, говорят о повышении титра антител после реактивации ВКВ. Метод непрямой иммунофлуоресценции стандартный для диагностических лабораторий, но получение ВКВ-инфицированных клеток для диагностических целей требует значительного опыта работы. Кроме того, экспрессия VP1 и сборка вирионов сопряжены с ярко выраженным цитопатическим действием, сопровождающимся отслоением клеток от подложки и их лизисом. Это повреждает качество образцов и может потребовать использования цитоцентрифугирования отслоившихся клеток, что приведет к их значительной морфологической гетерогенности [42]. Вследствие ядерной локализации VP1 и большого T-антигена может быть затруднительным отличить активность анти-ядерных антител. Стандартное начальное разведение сыворотки обычно составляет 1:10. В недавних исследованиях сообщалось, что больные — реципиенты аллогенных стволовых клеток с титрами выше 1:10 до трансплантации были более склонны к развитию последующей посттрансплантационной реактивации вируса с высоким уровнем вирусной нагрузки в моче, но эти данные требуют подтверждения [42].

Было обнаружено, что метод иммуноферментного анализа с использованием VLP, полученных из рекомбинантного ВКВ VP1, более чувствителен, чем пробы ингибирования гемагглютинации, но по специфичности совпадает с ними [43–45] и позволяет дифференцировать ответ антител IgG, IgA и IgM. Технически должна быть реконструирована трехмерная конформация капсида, которую затем предоставляют для взаимодействия с антителами для полуколичественного анализа. Соответственно для скрининга обычно используют 75–150 нг рекон-

струированного VP1 (подтвержденного электронной микроскопией) на лунку и разведение сыворотки 1:400. Недавние исследования позволяют предположить, что больные после пересадки почек с низким или неопределяемым уровнем антител BKV до трансплантации могут находиться в группе более высокого риска развития посттрансплантационной BKV-виремии и PyVAN, чем сероположительные реципиенты с более высокими титрами [46–49]. Сообщалось также о более высоком риске у реципиентов, у которых не развивается BKV-специфический IgA ответ на первой неделе после трансплантации [50]. В то время как при пересадке почки наличие у доноров высокого уровня BKVLP, а у реципиентов низкого уровня анти-BKVLP может быть маркером повышенного риска посттрансплантационной репликации BKV, продолжные исследования реципиентов после трансплантации показали, что повышение уровня IgG и IgM часто сопутствует вирурии и виремии, без развития распознаваемой иммунной защиты. Аналогичным образом IgA-антитела к BKVLP после трансплантации могут быть маркерами недавнего инфицирования, происшедшего до трансплантации [44]. Все вышесказанное позволяет предположить, что активность BKV-специфических антител может быть суррогатным маркером BKV-специфического клеточного иммунитета.

Рекомбинантный BKV VP1 без формирования VLP также был использован для обнаружения повышенного титра IgG и IgM у больных после трансплантации почек с репликацией BKV и PyVAN [51]. Однако не образовавшие агрегатов VP1-антигены были менее чувствительны, чем VLP, что выражалось в повышении доли ложнонегативных результатов серологического анализа BKV среди диализных больных [45]. Эксперименты по денатурации VLP *in vitro* показали, что антитела против VP1 и против VLP действительно составляют различные популяции антител с низкой перекрестной реактивностью [45]. Эти наблюдения также следует держать в уме при рассмотрении сообщений о доминировании серотипа к KIV, WUV и MCV, поскольку в этих исследованиях не использовались реконструированные частицы VLP в качестве антигенов [38]. Результаты иммуноферментного анализа на другие белки BKV неоднозначны. Агнопротеин BKV, распространённый цитоплазматический белок, экспрессирующийся в поздней фазе жизненного цикла вируса в тканевой культуре, так же как и в биопсийном материале PVAN, не вызывает значительного антительного ответа [51, 52]. Таким образом, анти-агно-ответ, видимо, не может рассматриваться в качестве полезного маркера одновременного или недавнего инфицирования BKV или уровня иммунного ответа на вирус. У больных после трансплантации почек часто исследуется антительный ответ против большого Т-антигена BKV, при этом он составляет от 10 до 40% людей с анти-BKVLP-иммунным ответом. Антительный ответ против N-концевого домена большого Т-антигена был специфически повышен после трансплантации у больных, у которых после отмены иммуносупрессорной терапии происходит очищение плазмы от вирусной BKV-нагрузки [45]. Таким образом, антитела

к большому Т-антигену BKV могут быть индикатором восстанавливающегося иммунного контроля, подобно антителам к ядерному антигену вируса Эпштейна—Барр [45].

### **BKV-специфический клеточный иммунитет**

В последние пять лет активно исследуется BKV-специфический клеточный иммунитет в связи с его потенциалом снижения риска репликации BKV и заболевания почек у больных после трансплантации [53–55]. Наиболее часто в качестве считывания дальнейшей реакции на стимуляцию Т-клеток препаратами BKV-антигена или BKV-пептидами используется интерферон  $\gamma$  [53, 54]. Для клинической диагностической лаборатории следует заметить, что частота BKV-специфического иммунного ответа с участием интерферона  $\gamma$  в периферической крови была на 1–2 порядка ниже по сравнению с ответом, развивавшимся при действии CMV-антигенов. Это затрудняет использование проточной цитометрии и прямого окрашивания внутриклеточных цитокинов мононуклеарных клеток периферической крови. Для решения этой проблемы Т-клетки периферической крови в культуре подвергались последующей стимуляции BKV-специфическими антигенами, что позволяло идентифицировать специфический HLA-I-антиген ограниченный BKV-эпитопами в тетрамерном анализе. Интересно, что идентифицированы консервативные эпитопы между VP1 и большим Т-антигеном вирусов BKV и JCV, что позволяет предположить высокую степень перекрестного иммунитета. При использовании ELISPOT-теста на основе интерферона  $\gamma$  было затруднительно найти значительные различия между реципиентами после трансплантации почек, у которых затем развилась BKV-виремия и у которых был достаточный уровень иммунной защиты. Напротив, у больных, у которых имелась выраженная виремия, и у тех, у которых происходило очищение крови от вируса, различия обнаружены [55–58]. Таким образом, метод ELISPOT может быть полезным для клинического анализа степени подавления иммунитета [59]. Тем не менее было показано, что ключевым параметром, определяющим развитие интерферон- $\gamma$ -ответа, является концентрация ингибитора кальциневрина, ингибирующая сигнальную молекулу-1 Т-клеточной активации; в то же время сиролimus, микофенолат или лефлуномид не оказывали прямого действия [59]. Необходимо проведение дальнейших исследований для установления ценности BKV-специфического клеточного иммунного ответа для клинического ведения больных.

### **Культура BKV-клеток**

*In vitro* BKV реплицируется в первичной культуре почечного канальцевого эпителия, эндотелиальных клетках пупочного канатика человека, клеточных линиях эмбриональных почечных клеток человека и культуре клеток WI-38, но в ранних исследованиях диагностических лабораторий использовали клетки почек зеленой африканской

мартышки, например клеток Vero. Важным препятствием для культуры тканей является наличие вирусных вариантов с перегруппированным NCCR. Клеточная культура была важным инструментом в выделении PuV в первоначальных лабораторных исследованиях, но для диагностических целей выделение BKV на культуре клеток в значительной степени вытеснено молекулярными исследованиями.

## Выявление BKV-антигенов

Выявление BKV-антигенов методами иммуногистохимии стало основным методом при диагностике PuVAN. Успешно разработаны перекрестно реагирующие антитела против большого антигена SV40 [60–62], после чего было рекомендовано использовать их для дополнительного подтверждающего теста при диагностике PuVAN [40]. Нельзя отличить антитела к большому Т-антигену, выделенному из SV40, BKV или JCV. Для тканевой диагностики это может быть, в действительности, большим преимуществом в редких случаях JCV-ассоциированной нефропатии при трансплантации почек и ВИЧ/СПИД инфекции [15]. В некоторых центрах для постановки специфического тканевого диагноза используется метод гибридизации *in situ*, который дает возможность различить JCV, BKV и SV40, если зонды обладают достаточной специфичностью в последовательности и при строго определенных условиях. Обнаружение агнопротеина или VP1BKV может представлять собой альтернативу [30, 51, 63], но, поскольку экспрессия поздних генов ассоциирована со значительной степенью лизиса клеток, фоновое окрашивание клеток может быть повышенным.

## Микроскопия BKV в моче

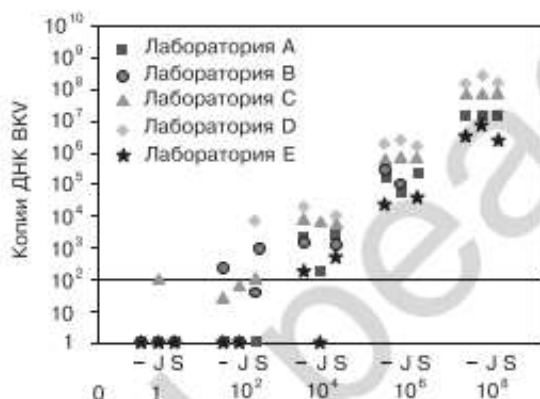
Цитология мочи для обнаружения измененных клеток с внутриядерными включениями является инструментальным методом для идентификации BKV [3]. Присутствие так называемых «клеток-ловушек» при фазово-контрастной микроскопии или в мазке с окрашиванием по Папаниколау является признаком высокой степени репликации BKV в уротелиальном и/или тубулярном эпителии и должно дифференцироваться с неоплазией. В опытных цитологических лабораториях отсутствие клеток-ловушек рассматривается как отрицательный предиктивный фактор с высокой ценностью >95% для исключения PuVAN у больных с трансплантацией почки. У больных с исходным нормальным уровнем почечной функции наличие клеток-ловушек является положительным прогностическим фактором <20%, уровень значимости этого фактора может достигать 50–60% — когда обнаруживается более высокое их количество (>10) при цитоцентрифугировании [64] или при высоком разрешении в поле зрения [65], когда выход вируса продолжается более двух месяцев или когда есть признаки воспаления, сопровождающегося наличием клеток-ловушек. Был разработан метод окрашивания стекла после цитоцентрифугирования мочи на предмет обнаружения

экспрессии большого Т-антигена для дифференцировки от других измененных клеток. Электронная микроскопия препарата нативной мочи может обнаружить вирионы РyV диаметром  $40 \times 40$  нм и обычно требует присутствия  $>10^7$  частиц/мл. Отрицательная прогностическая ценность электронной микроскопии ниже, чем цитология мочи или ПЦР-анализ мочи, положительная прогностическая ценность составляет около 50%. Недавно было предложено считать, что РyV-агрегаты являются специфическим признаком при РyVAN [66]. В качестве важного предостережения упомянем, что ни цитология, ни электронная микроскопия не дают возможности различить репликацию ВKV и JCV, которые могут быть связаны с РyVAN. Роль микроскопии осадка мочи не может считаться окончательно решенной для больных с риском развития ВKV-заболевания.

### Молекулярно-генетическое исследование ВKV

ДНК ВKV может быть обнаружена в различных образцах, включая мочу, плазму крови, фекалии, биопсийный материал из почек, цереброспинальную жидкость, ткань мозга и водянистые пробы из разных органов. Диагностическое значение анализа зависит от характеристик больного, типа образца и уровня вирусной нагрузки. Анализ на ДНК ВKV в моче и крови становится общепринятым лабораторным методом при ведении больных при трансплантации почки. Отрицательный результат ПЦР-анализа на ВKV позволяет исключить РyVAN с большой вероятностью, отрицательная предиктивная ценность составляет более 95%, в то время как вирусная нагрузка в плазме с ВKV  $>10^4$  в течение более трех недель имеет положительную прогностическую ценность 50–80% [40, 67]. Опубликован ряд протоколов ПЦР для детекции ДНК ВKV. Способы обнаружения и селекции разных РyV представлены в табл. 24.1. В многоцентровом исследовании большое количество лабораторий проводило слепое тестирование рутинными тестами образцов плазмы и мочи больных после трансплантации почки, а также параллельное исследование проб, полученных культивированием тканей с ВKV, содержащих ВKV-геном плазмид [68]. Хотя была получена хорошая суммарная чувствительность и специфичность, результаты от лаборатории к лаборатории имели различия, иногда достигая в десять раз больших значений. Более того, при низкой вирусной нагрузке, близкой к пределу детекции, ДНК конкурентного вируса JCV снижает чувствительность некоторых тестов (рис. 24.3). Систематическое одноцентровое исследование провело сравнение четырех опубликованных и трех недавно разработанных методов определения вирусной нагрузки ВKV, имеющих мишенью различные последовательности Т-антигена и гена VP1. Отмеченная выше вариабельность также была установлена, при этом она была, в частности, ассоциирована с полиморфизмом менее распространенных подтипов ВKV III и ВKV IV. Сложносоставное исследование, одновременно имеющее мишенью последовательности генов как боль-

шого Т-антигена, так и VP1 дает лучшие результаты, определяя примерно 10% от прежде смешанных подтипов [69]. Суммируя, можно сказать, что представленные данные показывают, что внешний контроль качества и, в частности, внешний анализ количественных показателей необходимы для того, чтобы объяснить результаты оценки вирусной нагрузки, полученные в разных лабораториях, определить режим ведения больных и данные многоцентровых исследований. Недавно были опубликованы результаты международного внешнего контроля качества выявления ВКВ и JCВ, который был проведен как первый этап для решения этих вопросов [70].



**Рис. 24.3.** Слепое сравнительное исследование количественной ВКВ-нагрузки с использованием 5 различных методов количественного ПЦР-анализа ВКВ в центрах трансплантации от А до Е. По оси X обозначено количество определяемых геномов ВКВ: 0 — отсутствуют; 10<sup>2</sup> = 100; 10<sup>4</sup> = 10 000; 10<sup>6</sup> = 1 000 000; (-) нет конкурирующих вирусов; (J) дополнительно 10<sup>6</sup> геномных экв. JCВ, (S) дополнительно 10<sup>10</sup> геномных экв. SV40. Источник [68]

Протокол, который использовался для общепринятого анализа ДНК ВКВ в Базеле (Швейцария), описан ранее [14, 19, 33, 71]. Суммарный результат анализа был надежный, но недавно опубликованные данные о полиморфизме последовательности генов указывают на неопределяемое количество возможных редких вариантов (рис. 24.4). Для прямого праймера были идентифицированы 137 последовательностей; одиночные несопряженные мутации в центральном положении отмечались в 60 и 11 последовательностях, которые вряд ли могли повлиять на результаты анализа. В других 12 последовательностях (5%) были обнаружены две точечные мутации в центре и на 5'-конце праймера. Последовательность зонда была идентифицирована для 33 последовательностей базы данных NCBI. Тем не менее единичные точечные мутации в центре или на 3'-конце зонда были обнаружены в 183 последовательностях, что составляет 83% всех доступных последовательностей.

Входящий номер	Положение первого нуклеотида	Выравнивание	Количество идентичных последовательностей	% от общего числа
Прямой праймер				
			Всего 220	100
EU681739	107	.....A.....	137	67
EU681749	107	.....B.....	60	22
EU681746	47	.....C.....	12	5
AB301092	4198	.....D.....	11	5
JCV				
SV40				
Зонд				
			Всего 221	100
EU681746	140	.....E.....	33	15
EU681775	183	.....F.....	181	82
AB263924	4291	.....G.....	4	1,8
EU681743	108	.....H.....	1	0,4
AB263926	4291	.....I.....	1	0,4
AB269864	4294	.....J.....	1	0,4
JCV				
SV40				
Обратный праймер				
			Всего 105	100
V01109	2630	.....K.....	138	67
EU681749	260	.....L.....	48	23
EU681746	200	.....M.....	12	6
AB269839	4343	.....N.....	6	3
AB269825	4354	.....O.....	1	0,5
JCV				
SV40				

**Рис. 24.4.** Корректировка олигонуклеотидов, использованных для TaqMan ПЦР в Базеле. Входящий номер входа в репрезентативную базу данных для каждой последовательности различен, положение первого нуклеотида установлено для изучаемых последовательностей, обозначены количество входов в базы данных с идентичными последовательностями и процент общего количества вариантов последовательностей. Точки обозначают нуклеотиды, соответствующие заявленному, большие буквы обозначают варианты. Ряды построены при помощи алгоритма BLAST, поиск нуклеотидных последовательностей проводился в базе данных NCBI с использованием стандартных параметров в сентябре 2008 г.

Таблица 24.1

## ПЦР-методы определения вирусов ВК и JC

Ссылка	Метод	Целевой участок	Специфичность	Масштабы исследования
[126]	Каскадная ПЦР	VP1/LT	JC	Контроль качества исследования, включающий 7 лабораторий
[87]	Каскадная ПЦР	LT	JC	26 ВИЧ-больных с очаговыми поражениями
[127]	Количественная сравнительная ПЦР	VP2	JC	11 больных с полиморфно-ядерным лейкоцитозом (ПМЛ)
[128]	Taqman	LT-ag	ВК и JC	103 реципиента костного мозга и 11 здоровых добровольцев
[129]	Taqman	LT-ag	ВК	20 больных после трансплантации почки, включая 4 с PyVAN
[71]	Taqman	LT-ag	ВК	Один больной после трансплантации почки с PyVAN, на протяжении времени
[130]	Taqman	LT-ag	ВК и JC	46 детей — реципиентов почек
[131]	LightCycler FRET	VP2	ВК, JC и SV40	11 биопсий мозга от больных ПМЛ
[91]	Taqman	LT	JC	61 ВИЧ-больной с GVK
[132]	Taqman MGB	LT-ag	ВК	Не указано
[133]	LightCycler SybrGreen	LT-ag	ВК	Не указано
[134]	Taqman	LT-ag	ВК	855 взрослых больных после трансплантации почки
[135]	Стандартная ПЦР, RFLP	LT	ВК и JC	56 ВИЧ-больных с GVK
[69]	Taqman	VP1/LT	ВК	230 случайных клинических проб мочи и сыворотки
[94]	Каскадная ПЦР	VP2	ВК и JC	42 СПИД-больных и 55 контрольных человек

Учитывая длину зонда и положение мутации, маловероятно, чтобы они оказывали действие на результат анализа. Тем не менее в случае пяти последовательностей (2%) с двойными мутациями дегенерация нуклеотидов, возможно, должна быть учтена. Для обратного праймера единичные точечные мутации были обнаружены в 12 последовательностях, двойные точечные мутации — в 48 последовательностях (30%). Были обнаружены шесть последовательностей, претерпевших четвертую мутацию. Поскольку предыдущие три мутации были об-



наружены примерно в одной трети последовательностей, дегенерация оснований в положениях 3 и 6 (оба пуриновые) и 21 (пиримидиновое) должна учитываться. Таким образом, в клинических лабораториях рекомендуются постоянный анализ и адаптация метода.

В тестах, проводимых в Базеле, стандартный метод анализа исследует в четырех копиях проб по 5 мкл элюата с удвоенной концентрацией ДНК, полученной экстракцией из 200 мкл плазмы крови или мочи с использованием реагентов Magnapure™ и роботизированной системы (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) или реагентов Corbett X-tractor Gene and Corbett VX (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland). Образцы ЦСЖ экстрагировались вручную при помощи наборов Qiaamp Blood Kit (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland). Обычно в одной из четырех одинаковых проб обнаруживался резкий максимум в присутствии 1000 геномных экв. референсной плазмиды для мониторинга ингибирования ПЦР. Мы использовали концентрацию обоих праймеров 300 нМ и 200 нМ FAM-меченного зонда, в 12,5 мкл амплификационной смеси двукратной концентрации (Eurogenic, Seraing, Belgium), содержащей полимеразу, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, dNTP (включая dUTP) и урацил-N-гликозилазу (общий объем 25 мкл). Количественная оценка производилась путем использования стандартной кривой, полученной при трех концентрациях (10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup> и 10<sup>8</sup> геномных экв./мл) референсной плазмиды, а также одним количественным контролем 3000 геномных экв./мл. Температурный режим состоял из этапа предварительной инкубации при 50° С в течение 2 мин для ферментативной деконтаминации потенциальных урацил-содержащих ампликонов, с последующим повышением температуры до 95° С в течение 15 мин для горячего старта ампли-Тақ-активации и 45 циклов при 95° С в течение 15 с; 60° С в течение 60 с. Пороговое значение ПЦР-анализа определяется самым низким разведением, позволяющим получить 50% положительных результатов в 10 репликах (копиях), что соответствует 3 геномным экв. на одно исследование, или 300 G геномным экв. экстрагирующей жидкости. Для повышения чувствительности метода для образцов СМЖ экстрагировался общий объем 400 мкл и элюировался до 100 мкл, 10 мкл элюата использовалось в 50 мкл ПЦР. Это позволило снизить предел обнаружения до 75 геномных экв./мл. В случае ингибирования или противоречивых результатов мы повторяли экстракцию ДНК. Каждое ПЦР-исследование сопровождалось одним контролем контаминации, состоящим из воды, которая проходила все этапы, соответствующие экстракции ДНК, для обнаружения контаминации на этом этапе, а также контролями для идентификации контаминации на уровне амплификации — в трех повторах каждый.

## **ДИАГНОСТИКА ПОЛИОМАВИРУС-АССОЦИИРОВАННОЙ НЕФРОПАТИИ**

Ключевой болезнью почек, ассоциированной с ВКV, является РvVAN. ВКV-опосредованные РvVAN периодически встречаются

в собственных почках больных с наследственным, приобретенным или фармакологически индуцированным иммунодефицитом, но, как правило, группу риска составляют реципиенты почек — до 10% от общего числа реципиентов [15]. Патогенез PyVAN обусловлен персистенцией вируса в клетках канальцевого эпителия почек при высоком уровне его репликации. В соответствии с динамикой репликации BKV репликация начинается в аллотрансплантате и затем амплифицируется в уротелиальном компартменте с движением вирусов обратно в аллотрансплантат, вызывающим цитопатическое ежедневное отмирание  $10^6$ – $10^7$  эпителиальных клеток канальцев. Цитопатическое действие проявляется в увеличении клеток и изменении их формы до шарообразной, нарушении межклеточных контактов с обнажением базальной мембраны. Этот процесс, постепенно захватывающий почечные канальцы, приводит к развитию гранулоцитарного ответа с гранулоцитарным и лимфоцитарным инфильтратом, все более накапливающимся в интерстициальном пространстве. При накоплении инфицированных вирусом клеток и распространении воспаления происходит атрофия канальцев; развивающийся в результате фиброз вызывает необратимое повреждение трансплантата [62].

Естественное течение BKV-опосредованного PyVAN в пересаженной почке реципиента характеризуется образцовым развитием высокой вирусной нагрузки более  $10^7$  геномных экв./мл с последующим повышением вирусной нагрузки в плазме крови более  $10^4$  геномных экв./мл, гистологически подтверждающейся PyVAN в биопсии аллотрансплантата [14]. Время между этапами развития PyVAN может варьировать, но, как правило, в большом количестве проспективных и ретроспективных исследований в среднем эмпирически установлена продолжительность 6 нед. [19, 67, 72–74]. Выход вируса BKV в мочу (клетки-ловушки, высокая вирусная нагрузка, мРНК VP1 BKV), а также детекция ДНК BKV в плазме были приняты как специфичные и чувствительные суррогатные маркеры PyVAN в том порядке, как указано [13, 14, 19, 75].

Предлагаются следующие формулировки диагноза PyVAN у реципиентов пересаженных почек:

1) вероятный диагноз PyVAN: вирусная нагрузка в почках более  $10^7$ /мл и BKV в плазме не определяется;

2) предположительный PyVAN; вирусная нагрузка в плазме более  $10^4$ /мл, гистопатологически PyVAN не определяется или гистологически отрицательный ответ;

3) подтвержденный PyVAN: PyVAN определяется гистопатологически и иммуногистохимически (экспрессия большого Т-антигена) или методом гибридизации *in situ*. Гистологические проявления должны быть классифицированы как PyVAN типа А (преимущественно цитопатические), тип В (преимущественно воспалительно-цитопатические) или тип С (преимущественно тубулярно-атрофические фиброзные изменения), как это описано в литературе [40].

У больных после пересадки почек обычный скрининг уровня репликации ВКВ должен проводиться, по крайней мере, каждые три месяца в течение первых двух лет после трансплантации, и затем ежегодно, пока не пройдет пять лет после трансплантации [40]. Анализ мочи на репликацию ВКВ рекомендуется для исключения РvVАН, и может быть проведен цитологическим методом или ПЦР реального времени. Больные с высоким уровнем репликации ВКВ в моче должны быть проверены на нагрузку ДНК вируса в плазме крови. Больным с уровнем ДНК вируса в плазме крови более  $10^4$  геномных экв./мл в течение более 3 нед. ставится диагноз предположительной РvVАН, для постановки диагноза подтвержденного РvVАН требуется проведение биопсии с гистопатологическим исследованием [40]. Рекомендуется также делать анализ мочи и/или плазмы на ДНК-нагрузку, когда обнаруживается дисфункция трансплантата или при проведении биопсии трансплантата по каким-то иным причинам или при протокольной биопсии [40]. Наличие высокого уровня вирусии также обнаруживается у больных с трансплантацией сердца, печени и легких с частотой от 5 до 25% случаев, но РvVАН в этих случаях — редкое осложнение. Обычный скрининг на ВКВ реципиентов после трансплантации прочих органов (не почек) в настоящее время не рекомендуется, но при диагностическом клиническом исследовании случаев нарастающей почечной недостаточности следует рассматривать анализ на ДНК ВКВ в плазме. Это исследование также может быть показано в случае больных с иммунодефицитами других типов. Подобные подходы в настоящее время применяются для исследований на РvVАН больных после трансплантации аллогенных стволовых клеток [42], но в настоящее время недостаточно данных для того, чтобы рекомендовать общий скрининг и упреждающее вмешательство [76].

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ НА JCV

### Серология JCV

В клинических исследовательских работах используются реакция антителозависимого торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющие обнаружить капсидные антигены JCV, однако в настоящее время эти методы не являются доступными для вирусологических лабораторий. Обычно считается, что серологические исследования сыворотки имеют ограниченную ценность для постановки диагноза РvVМL, поскольку это заболевание преимущественно поражает больных с острым иммунодефицитом, которые, как известно, имеют пониженный первичный и вторичный антителный ответ. Тем не менее недавние исследования показали, что ВИЧ-инфицированные больные, перенесшие РvVМL, имеют значительно более высокий титр антител, чем не перенесшие РvVМL или ВИЧ-инфицированные больные контрольной группы [77]. Выработка межболоочечных антител на JCV может иметь независимую

ценность для диагностики РvVML в случаях, когда ДНК JCV находится ниже определяемого уровня. Антитела в СМЖ против VP1 были обнаружены в 76% случаев РvVML по сравнению с 11% у ВИЧ-инфицированных больных без РvVML, а показатель специфических антител в межоболочечном пространстве был положительным [78]. Также показатель JCV-специфических антител в межоболочечном пространстве был повышен у больных с ВИЧ-ассоциированным РvVML, которые перенесли ремиссию болезни с последующим проведением высокоактивной антиретровирусной терапии (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART), параллельно отмечалось снижение ДНК JCV в ЦСЖ [79]. Однако обнаружение ДНК JCV в СМЖ методом ПЦР представляет собой основной диагностический метод.

### JCV-специфический клеточный иммунитет

JCV-специфический Т-клеточный иммунитет исследовался у больных с РvVML методами, позволяющими измерять JCV-специфический CD4+ или CD8+ Т-клеточный ответ с использованием методов исследования лимфопролиферации, ELISpot и внутриклеточного окрашивания цитокинов. Кроме того, цитотоксические Т-клетки были охарактеризованы методом высвобождения хрома и проточной цитометрии с аннексином V. Большинство охарактеризованных эпитопов JCV были выделены из JCV капсидного белка VP-1 [80]. В результате низкой частоты JCV-специфических Т-клеток в периферической крови их культивируют *in vitro* в течение одной — трех недель с последующей стимуляцией моноцитами или дендритными клетками, нагруженными JCV-пептидами. Хотя Т-клеточная активация, развивающаяся после таких манипуляций не может быть напрямую перенесена на процессы, происходящие в периферической крови больных РvVML, JCV-специфичные CD8+ клетки были связаны с повышением выживаемости [80–82]. В другом исследовании JCV-специфичные цитотоксические Т-клетки могли быть определены в СМЖ примерно у половины больных РvVML с благоприятным исходом [83]. В исследовании Swiss HIV Cohort, проведенном методом «случай — контроль», у больных, благополучно перенесших РvVML, чаще уровень продукции  $\gamma$ -интерферона Т-клетками был выше, чем у невыживших [77]. Ясно, что значение рутинного исследования JCV-специфичного клеточно-опосредованного иммунного ответа в клинических условиях нуждается в более тщательном исследовании.

### Выделение JCV в клеточной культуре

JCV имеет очень узкий диапазон клеток-хозяев, который, по-видимому, зависит от нескольких факторов, включая наличие специфических клеточных рецепторов, а также присутствие в этих клетках типоспецифичных белков, которые регулируют репликацию и транскрипцию ДНК JCV и пространственную структуру регуляторного региона [84,

85]. Только небольшое число клеточных систем полностью восприимчивы (пермиссивны) к литическому росту JCV. Первичная культура фетальных глиальных клеток человека и первичная культура астроцитов — производных глии — наиболее восприимчивые системы для распространения JCV в клеточной культуре. Некоторые клеточные линии допускают репликацию JCV: такие как клетки SVG — производные фетальных глиальных клеток человека, трансформированных SV40 T-Ag, а также клетки KG-1 или COS-7, полученные из клеток обезьян, трансформированных при помощи T-антигена SV40. В результате длительного времени, необходимого для демонстрации роста вирусов и низкой чувствительности, использование клеточных культур для изучения инфекции JCV ограничено исследовательскими целями.

### Молекулярно-генетическое исследование JCV

Детекция ДНК JCV в СМЖ при помощи технологии амплификации нуклеиновых кислот, преимущественно путем полимеразной цепной реакции (ПЦР), в настоящее время рекомендуется как диагностический тест первой линии при предполагаемом диагнозе РvVML. Диагностическая чувствительность качественного ПЦР-анализа ДНК (часто гнездовой ПЦР) JCV в СМЖ находится в диапазоне от 70 до 90%, специфичность составляет от 80 до почти 100% [86]. В последние годы эти методы прогрессирующими темпами замещаются количественным анализом, который также обеспечивает оценку уровня ДНК JCV в СМЖ. Тем не менее примерно одна четверть больных с РvVML-инфекцией на самом деле будут иметь отрицательный результат молекулярно-генетического исследования во время первого анализа СМЖ [87]. Возможность обнаружения ДНК JCV в СМЖ может возрасти при развитии РvVML, что отражает повышенную репликацию в зонах повреждения мозга. Таким образом, повторная люмбальная пункция должна рассматриваться для уточнения диагноза при первоначальном отрицательном анализе на ДНК JCV с постоянной клиникой, позволяющей подозревать РvVML. У больных ВИЧ-1/СПИДом с РML, получающих комбинированную противовирусную терапию, вероятность обнаружения JCV в СМЖ может резко уменьшаться с течением времени, что отражает сокращение репликации JCV за счет восстановления иммунной системы [88, 89]. Вероятность обнаружения ДНК JCV может быть выше в свежевыделенной нецентрифугированной СМЖ по сравнению с супернатантом СМЖ, из которого удалены клетки [87]. При определенной таким образом главной роли анализа СМЖ при установлении диагноза РvVML возникает проблема контроля качества в отношении этапа выделения ДНК. Также для вирусологической диагностической лаборатории существенным становится вопрос характеристик метода ПЦР-анализа JCV. Чтобы обнаружить необходимость адаптации методов, рекомендуется своевременная контрольная проверка опубликованных целевых последовательностей ПЦР-праймеров и зондов, поскольку в настоящее время постоянно

публикуются все новые варианты этих последовательностей. Как показано на рис. 24.5, праймеры, используемые в лабораториях Базеля для рутинных анализов на ДНК JCV, связаны с высоко консервативными сайтами большого Т-гена. Праймеры и зонды, которые используются в Милане, обладают похожими характеристиками (рис. 24.6).

Измерение нагрузки ДНК JCV в СМЖ количественными методами может обеспечить дополнительной информацией. Более высокое количество копий JCV у больных ВИЧ-1/СПИДом в отсутствие лечения является предиктивным признаком более короткой продолжительности жизни [90, 91]. Больше количество копий также было отмечено у больных с более низким количеством клеток CD4. Эти связи позволяют предположить, что степень иммунодефицита может влиять на уровень репликации JCV в СМЖ, а она, в свою очередь, может коррелировать с развитием заболевания. После начала применения комбинированной антиретровирусной терапии примерно у половины больных ВИЧ-1/СПИДом с PyVML отмечается ремиссия [92, 93], которая ассоциирована с клиренсом вируса из СМЖ [91]. В противоположность этому персистенция ДНК JCV в СМЖ даже при его низком постоянном уровне ассоциировано с клиническим развитием PyVML.

Изучение последовательности ДНК JCV проводилось для региона NCCR и большого вирусного капсидного белка VP-1. Архетипичная форма JCV NCCR постоянно присутствует в моче здоровых людей и у лиц с нарушенным иммунитетом, в то время как перекомпонованная последовательность, несущая участки делеций и инсерций, большая часть которых представляет собой частичную дупликацию участков, обычно обнаруживается в ЦСЖ и ткани мозга больных с PyVML. В некоторых случаях измененный JCV NCCR может обнаруживаться в крови больных с PyVML. Определение последовательности NCCR может помочь в подтверждении исключительности перестроек генома, обозначающих истинно положительные результаты в противоположность контаминации, которая могла случайно произойти в более ранних исследованиях, особенно при использовании каскадной ПЦР. Более того, определение последовательности вариантов вирусов в различных участках организма в течение времени может помочь выявить этапы патогенеза PyVML и их отношение к репликации JCV в ЦНС. Капсидный белок VP-1, видимо, является основной мишенью как для гуморального, так и для клеточно-опосредованного иммунного ответа. Секвенирование гена VP1 вирусов, выделенных из мочи здоровых людей, привело к идентификации, по крайней мере, 12 различных подтипов JCV, которые были выделены в различных географических регионах. Вариабельность последовательности генов JCV может воздействовать на мишени праймеров и, таким образом, должна учитываться при разработке и проведении ПЦР-анализа.

ДНК JCV также может быть обнаружена в других образцах, включая кровь, мононуклеарные клетки, плазму, мочу, мозг и респираторный секрет [94]. Тем не менее вероятность обнаружения, по различным опубликованным данным, очень широко варьирует. У больных







с ВИЧ-ассоциированным РvVML ДНК JCV обнаруживается в 10–60% мононуклеаров периферической крови и в 15–40% плазмы. ДНК JCV также была обнаружена у значительной доли пациентов с нарушением иммунитета без проявлений болезни. Эти данные позволяют предположить, что обнаружение ДНК JCV в крови не является чувствительным и специфическим диагностическим признаком для постановки диагноза РvVML, хотя может быть полезным для генетической характеристики экстрацеребрального вируса. ДНК JCV выявляется в моче примерно у трети здоровых людей на уровне, который не позволяет отличить больных РvVML от здоровых людей. Ни обнаружение ДНК JCV в моче, ни измерение уровня вируса не является релевантным признаком для постановки диагноза РvVML [95–101]. Были опубликованы данные об обнаружении ДНК JCV как в ткани мозга больных РvVML, так и в ткани мозга людей, не больных РvVML, так же как и в ряде проб из других органов — почек, печени, лимфатических узлов, селезенки, сердца и ЖКТ, — путем блот-гибридизации [102] и методами амплификации нуклеиновых кислот [103, 104]. Клиническое значение этих находок неясно, особенно в отсутствие тканевых повреждений или признаков продукции вируса. Следовательно, биопсия или аутопсия должна быть в первую очередь использована для проведения гистологических, иммуногистохимических исследований или гибридации *in situ* для оценки экспрессии Т-антигена.

## **ДИАГНОСТИКА ПОЛИОМАВИРУС-АССОЦИИРОВАННОЙ МНОГООЧАГОВОЙ ЛЕЙКОЭНЦЕФАЛОПАТИИ**

Основной болезнью, которая вызвана полиомавирусами, является РvVML. Патогенез заболевания характеризуется неконтролируемой репликацией РvVML в олигодендритах белого вещества мозга, например субкортикальной зоны ЦНС. Общее наименование заболеваний, к которым по международной классификации болезней относится РvVML, — глубокая и продолжительная дисфункция иммунной системы, с которой сталкиваются при озлокачествлении ВИЧ-инфекции, химиотерапии, трансплантации и действии моноклональных антител, имеющих целью поверхностные маркеры лимфоцитов. Тем не менее развитие процесса РvVML представляет собой достаточно редкое явление, позволяющее предположить, что для этого необходимо действие неких дополнительных факторов риска.

При подозрении на РvVML, при котором результаты ПЦР, имеющие целью обнаружить ДНК вируса в СМЖ, отрицательны, для постановки точного диагноза РvVML требуется биопсия мозга. РvVML может быть диагностирована по наличию типичных гистопатологических изменений, таких как увеличенные олигодендрциты с внутриядерными включениями, астроциты необычной формы и нагруженные липидами макрофаги. Поражения мозга, вызванные РvVML, классически описываются как лишенные воспалительных клеток, хотя в последнее время все чаще описываются «воспалительные» формы

заболевания. Эти формы характеризуются периваскулярной и паренхиматозной мононуклеарной инфильтрацией, главным образом CD8+ Т-лимфоцитами и моноцитами/макрофагами, и обычно с этими случаями сталкиваются у больных с менее острой формой иммунодефицита, например с ВИЧ-ассоциированным РvVML в начале проведения HAART. Необходимо подтвердить присутствие JCV методами иммуногистохимии или гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* либо электронной микроскопии. Исследование олигодендроцитов при помощи электронной микроскопии позволяет увидеть вирусные частицы диаметром около 40–50 нм, обычно располагающиеся скоплениями в виде филаментов или кристаллоподобной структуры. В повреждениях, характеризующихся высокой вирусной нагрузкой, вирионы могут находиться в других типах клеток, включая астроциты и, иногда, нейроны, так же как в вакуолях макрофагов, что, видимо, происходит в результате фагоцитоза. Хотя инфекция обычно не затрагивает нейроны, JCV может иногда инициировать нервные клетки гранулярного слоя мозжечка [105]. Эти находки отмечались как в случае типичных РvVML поражений [106] так и ВИЧ-инфицированных больных без классических поражений, вызванных полиомавирусом [105, 107]. В настоящее время не существует неинвазивных скрининг-тестов, которые позволили бы выявить больных группы риска по РvVML. Ограниченные описанные случаи показывают, что обнаружение ДНК JCV в крови обладает низкой чувствительностью даже у больных с подтвержденной формой РvVML, поскольку вирусная нагрузка в крови низка и находится на нижней границе или даже ниже определяемого уровня. Таким образом, диагностика РvVML зависит от преимущественно с ранней идентификации неврологических нарушений у иммунодефицитного больного с последующим подтверждением на основе резонансных методов томографии мозга и люмбальной пункции с получением образцов СМЖ, которую исследуют на наличие ДНК JCV методами ПЦР.

Согласно недавно разработанному согласительному документу [108], диагноз РvVML может быть разделен на следующие категории:

1. Диагноз «Возможная РvVML» ставится в случае, если у больных имеются типичные неврологические нарушения и сочетающиеся с ними признаки на МРТ-снимках.
2. Диагноз «Лабораторно подтвержденная РvVML» ставится в случаях обнаружения JCV в ЦСЖ методами ПЦР.
3. «Доказанная РvVML» ставится в случае гистологического подтверждения при исследовании биопсийного или аутопсийного образца ткани мозга.

## ДИАГНОСТИКА ПОЛИОМАВИРУС-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Дыхательные пути участвуют в передаче ВКV, но в настоящее время не известно, является ли ВКV релевантной причиной развития инфек-

ции дыхательных путей. Тем не менее ВКВ обнаруживается в дыхательных путях ВИЧ/СПИД-инфицированных лиц с глубоким поражением иммунной системы, у которых отмечается резко выраженный уровень системной репликации ВКВ и мультиорганные поражения. ВКВ также был выделен из респираторного тракта детей, больных острой лейкемией и подвергшихся трансплантации стволовых гематопоэтических клеток (*Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT*) [15]. ВКВ не был идентифицирован ни в одном из 727 образцов респираторного секрета от 499 больных, в то время как JCV был найден в 5 (1%) случаях, МСВ — в 1 (0,2%), КIV и WUV в 8 (1,6%) случаях каждый [94]. При использовании КIV VP1-специфической ПЦР были получены положительные результаты в 1% (6 из 637) носоглоточных аспириатов больных с заболеваниями дыхательного тракта и 0,5% (1 из 192) образцов фекалий больных с гастроэнтеритом [20]. КIV не выделяется из образцов мочи, сыворотки, цельной крови или выделенных лейкоцитов. КIV-положительными больными были главным образом дети, и во всех случаях кроме одного, в КIV-положительных образцах были обнаружены также и другие вирусы [109]. WUV был идентифицирован в 43 образцах из полученных от 2135 больных с острыми инфекциями респираторного тракта. Из этих 43 образцов 31 были положительны в отношении других респираторных вирусов [21]. В ретроспективном исследовании Norja et al. сообщают, что превалирование КIV и WUV было незначительным у больных с острыми респираторными инфекциями по сравнению с контрольной группой здоровых людей [94]. Таким образом, несмотря на несколько проведенных пилотных исследований, клиническое значение КIV и WUV остается неясным.

### Молекулярно-диагностическое исследование КIV и WUV

Диагностика КIV- и WUV-инфекций в настоящее время проводится исключительно на основе амплификации и детекции ДНК. Была разработана ПЦР-система в реальном времени, позволяющая обнаружить ДНК КIV и WUV в респираторных образцах [110]. Наборы для ПЦР-анализа КIV-A и WUV-B представляются наиболее подходящими для рутинной диагностики. Экстракция ДНК проводится при помощи набора для экстракции нуклеиновых кислот High Pure Nucleic Acid Kit (Riche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) согласно инструкции производителя. Для выявления КIV использовались праймеры KI-A-141-F и KI-A-200-R, а для определения WUV — праймеры WU-B-2729-A и WU-B-2808-R в конечных концентрациях 400 нМ (табл. 24.2). FAM-меченые зонды KI-A-182-TM и WU-B-2997-TM использовались в конечных концентрациях. При анализе использовалось 2 мкл экстрагированной ДНК в общем объеме 25 мкл. Для проведения КIV и WUV ПЦР-анализа использовалась двукратная концентрация амплификационной смеси Quantitect Probe Master Mix (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland). Температурный профиль состоит из периода инкубации при 95 °С, 15 мин горячего старта для

активации и 55 циклов при 95 °С по 15 с; 60 °С, 60 с. Предел обнаружения обоих анализов, который определяется как минимальная концентрация, позволяющая выявить 100% реплик, составил 10 геномных экв. на реакцию. Альтернатива этому протоколу описана Sharp с сотр. [94]. Авторы использовали каскадную ПЦР для выявления KIV и WUV, используя внутренние праймеры, позволяющие провести специфическую детекцию вирусов (табл. 24.2). Хотя этот протокол позволяет полуколичественно оценить уровень вирусной нагрузки путем определения лимитирующего разведения экстракта ДНК, сложность метода может обусловить неприемлемость его для рутинных диагностических исследований.

Таблица 24.2

## Праймеры и зонды для амплификации и детекции KIV и WUV

Описание	Последовательность	Мишень	Ссылка
KI-A-141-F	ACC TGA TAC CGG AAC T	KI NCCR, прямой праймер	[110]
KI-A-200-R	CGC AGG AAG CTG GCT CAC	KI NCCR, обратный праймер	[110]
KI-A-182-TM	FAM CCA CAC AAT AGC TTT CAC TCT TGG CGT GA-TAMRA	KI NCCR, зонд	[110]
WU-B-2729-F	CTA CTG TAA ATT GAT CTA TTG CAA CTC CTA	WU большой Т-антиген, прямой праймер	[110]
WU-B-2808-R	GGG CCT ATA AAC AGT GGT AAA ACA ACT	WU большой Т-антиген, обратный праймер	[110]
WU-B-2997-TM	FAM-CCT TTC CTC CAC AAA GGT CAA GTA AA-TAMRA	WU большой Т-антиген, зонд	[110]
WUKI_OS	ATC TRT AGC TGG AGG AGC AGA G	WU и KI VP2, внешняя ПЦР, прямой праймер	[94]
WUKI_OAS	CCY TGG GGA TTG TAT CCT GMG G	WU и KI VP2, внешняя ПЦР, обратный праймер	[94]
WUKI_IS	RTC AAT TGC WCT TGG AGC TGC	WU и KI VP2, внутренняя ПЦР, прямой праймер	[94]
WUKI_IAS	TCC ACT TGS ACT TCC TGT TGG G	WU и KI VP2, внутренняя ПЦР, обратный праймер	[94]
WU-IAS	CTG TTA CAC CTT GTG TTA CAG TT	WU VP2, внутренняя ПЦР, обратный праймер	[94]
KI-IAS	GTT ACA GCT TGG GTA GCT TGA	KI VP2, внутренняя ПЦР, обратный праймер	[94]

### **Диагностика MCV-ассоциированных заболеваний**

ДНК полиомавируса клеток Меркеля (MCV) была амплифицирована в 8 из 10 образцов опухолей Меркеля (MCC) с использованием MCV-специфической ПЦР и Саузерн-гибридизации. В контрольной группе только 5 из 59 образцов были положительны, что показывает положительную связь метода выявления с ДНК MCV и MCC [22]. В недавнем исследовании аутопсийных образцов, взятых от 42 больных СПИДом, только один исследованный образец был положительным на MCV, показав вероятное отсутствие реактивации MCV в условиях иммуносупрессии или низкой общей распространенности MCV [94]. Связь между MCV и карциномой Меркеля была подтверждена в других независимых исследованиях. До настоящего времени не было сообщений о связи MCV с другими злокачественными опухолями, такими как немеланомный рак кожи или рак простаты [111, 112]. Выявление ДНК ВКВ в прошлом было ассоциировано с рядом злокачественных образований, и самое недавнее упоминание касалось связи ВКВ с предраковым состоянием простаты; в настоящее время проводятся решающие исследования связи ВКВ с раковыми заболеваниями.

### **Молекулярно-диагностические исследования MCV**

Диагностические исследования MCV в настоящее время основываются исключительно на молекулярных методах. Протокол Feng et al. используется в большинстве опубликованных работ [22]. Этот протокол состоит из трех ПЦР-реакций (LT1, LT2 и VP1), проводимых параллельно (табл. 24.3). ДНК из опухолевых тканей выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, для ПЦР-анализа использовали 100 нг. Геномную ДНК амплифицировали с использованием Taq ДНК-полимеразы (Invitrogen). Этап денатурации ДНК проводился при 94 °С в течение 3 мин, за этим следовал 31 цикл по 45 с при 94 °С, затем 58 °С, 30 с, 72 °С, 45 с и затем 15 мин при 72 °С. Чувствительность детекции может быть повышена путем Саузерн-блот-гибридизации с использованием специфических внутренних зондов. Метод исследования, недавно опубликованный Sharp et al., имеющий мишенью малый Т-антиген MCV, может составить интересную альтернативу [94].

### **Диагностика SV40-ассоциированных заболеваний**

Хотя в настоящее время общепринято считать, что в человеческой популяции SV40-ассоциированные заболевания развиваются в результате контаминации полиомиелитных и аденовирусных вакцин вирусом SV40, представления о его потенциальной роли как человеческого возбудителя до настоящего времени противоречивы. Несколько исследований показали, что SV40 может вызывать различные опухоли у грызунов. Также SV40 может вызвать PуVМL-подобный энцефалит

Таблица 24.3

## Праймеры для амплификации и детекции ДНК МСV

Описание	Последовательность	Мишень	Ссылка
LT1 прямой	TAC AAG CAC TCC ACC AAA GC	МСV большой Т-антиген, прямой праймер	[22]
LT1 обратный	TCC AAT TAC AGC TGG CCT CT	МСV большой Т-антиген, обратный праймер	[22]
LT3 прямой	TTG TCT CGC CAG CAT TGT AG	МСV большой Т-антиген, прямой праймер	[22]
LT3 обратный	ATA TAG GGG CCT CGT CAA CC	МСV большой Т-антиген, обратный праймер	[22]
VP1 прямой	TTT GCC ACG TTA CAG TCT GG	МСV VP1, прямой праймер	[22]
VP1 обратный	TGG ATC TAG GCC CTG ATT TTT	МСV VP1, обратный праймер	[22]
MCPyV_OS	GGC AAC ATC CCT CTG ATG AAA GC	МСV малый Т-антиген, внешняя ПЦР, прямой праймер	[94]
MCPyV_OAS	CCA CCA GTC AAA ACT TTC CCA AGT AGG	МСV малый Т-антиген, внешняя ПЦР, обратный праймер	[94]
MCPyV_IS	CTT AAA GCA TCA CCC TGA TAA AGG	МСV малый Т-антиген, внутренняя ПЦР, прямой праймер	[94]
MCPyV_IAS	AAA CCA AAG AAT AAA GCA CTG ATA GCA	МСV малый Т-антиген, внутренняя ПЦР, обратный праймер	[94]

при внутриболоечном введении его макакам резус [113, 114]. Детекция ДНК SV40 методом ПЦР в образцах мезотелиомы человека с высокой частотой, видимо, подтверждает роль SV40 в развитии этой злокачественной опухоли у человека [115]. Однако это заключение наталкивается на тот факт, что положительный результат в значительной доле образцов может обуславливать лабораторная плазмидная контаминация вирусной ДНК [116]. Противоречивость результатов исследования роли SV40 в патогенезе опухолей еще не разрешена до настоящего времени [117]. Помимо неоднозначно решенной роли в развитии злокачественных опухолей, сообщалось об обнаружении ДНК SV40 в 9% образцов миндалин иммунокомпетентных детей [118], 16% образцов крови здоровых доноров [119], 3% образцов мочи

здоровых детей [120], 8% образцов фекалий госпитализированных детей [39] и 6% образцов мочи реципиентов после трансплантации легких [121]. Рядом авторов SV40 был также связан с его потенциальной ролью в развитии болезней почек, включая PyVAN и очаговый сегментарный гломерулосклероз [122–124]. В результате разработки экспериментальных систем стали доступны диагностические методы исследования SV40, включая перекрестно-реагирующие антитела против большого Т-антигена, который используется для диагностики PyVAN. Был также создан метод антительного анализа с использованием VLP SV40. Однако в нескольких статьях эти методы были комбинированы убедительным образом. Очевидно, что требуются независимые доказательства, предпочтительно с использованием новых диагностических подходов, чтобы пролить свет на клиническую роль SV40.

### Молекулярно-диагностические исследования SV40

Многие методы детекции ДНК SV40 используют в качестве мишени большой Т-антиген. Широко используемый метод был описан Bergsadel [125] (табл. 24.4). Однако присутствие Т-антигена в большом количестве экспрессирующихся плазмид повышает риск лабораторной контаминации, как это описано Lopez-Rios [116]. При выполнении любых диагностических процедур, включающих работу с плазмидами в высоких концентрациях, должна соблюдаться величайшая аккуратность. Рекомендуется использовать пары праймеров, прямо направленных на регион, менее подверженный контаминации, такие как праймеры SVINTfor и SVINTrev, которые связываются с интронной последовательностью большого Т-антигена (см. табл. 24.4).

Таблица 24.4

Праймеры для амплификации и детекции ДНК SV40

Описание	Последовательность	Мишень	Ссылка
SVINTfor	AAG TAA GGT TCC TTC ACA AAG	SV40 большой Т-антиген, интрон	[116]
SVINTrev	AAG TGA GGT ATT TGC TTC TTC	SV40 большой Т-антиген, интрон	[116]
SV. for3	TGA GGC TAC TGC TGA CTC TCA ACA	SV40 большой Т-антиген, интрон	[116]
SV. rev	GCA TGA CTC AAA AAA CTT AGC AAT TCT G	SV40 большой Т-антиген, интрон	[116]

ДНК из тканей опухолей была выделена с использованием Trizol, для ПЦР-анализа использовали 1 мкг в 50 мкл ПЦР-смеси. Праймеры применялись в концентрации 400 нМ. ДНК амплифицировали при помощи HotStar Taq ДНК-полимеразы (Qiagen), реакционная смесь включала 10 мМ каждой dNTP, 25 мМ MgCl<sub>2</sub> и ПЦР-буфер. Темпера-

турный профиль состоял из этапа денатурации ДНК, проводился при 95 °С в течение 15 мин, за этим следовало 44 цикла по 60 с при 94 °С, потом температура отжига, 30 с, затем 72 °С в течение 60 с и затем 10 мин при 72 °С. Температура отжига была 62 °С для циклов 1 и 2, 60 °С для циклов 3 и 4 и 58 °С в течение циклов от 5 до 44.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клиническое значение РvV-инфекций у человека все более возрастает с момента открытия вирусов ВК и JC более 25 лет назад. С одной стороны, очевидно, что риск инфекций РvV у человека увеличивается пропорционально распространению применения мощных иммуносупрессивных и иммуномодулирующих методов терапии. С другой стороны, были обнаружены новые РvV, однако их клиническое значение окончательно не определено. Это бремя перекладывается на клинические вирусологические лаборатории. Наиболее важные диагностические тесты основаны на ПЦР, но, несмотря на высокую чувствительность и специфичность ПЦР, эти методы сталкиваются с ограниченным знанием природных вариантов вируса и вопросами контроля качества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cole CN, Polyomavirinae: The Viruses and Their Replication, in *Fundamental Virology*, DMK Bernard N. Fields, Peter M. Howley, Editor. 1996, Lippincott-Raven PublГибридизация in situ, p. 917–945.
2. Buchen-Osmond C, International Committee on Taxonomy of Viruses Database (ICTVdB), 2008. [www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/).
3. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B, New human papovavirus (B. K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1971.1(7712): p. 1253–57.
4. Zurhein G, Chou SM, Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. *Science*, 1965.148: p. 1477–9.
5. Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, et al., Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, 1971.1(7712): p. 1257–60.
6. Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL, Progressive multifocal leucoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2005. 353(4): p. 369–74.
7. Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, et al., Progressive multifocal leucoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*, 2005. 353(4): p. 375–81.
8. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, et al., Progressive multifocal leucoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med*, 2005. 353(4): p. 362–8.
9. Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, et al., Association of BK viraemia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med*, 1986. 315(4): p. 230–234.



10. Apperley JF, Rice SJ, Bishop JA, et al., Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. *Transplantation*, 1987. 43(1): p. 108-12.
11. Bedi A, Miller CB, Hanson JL, et al., Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 1995.13(5): p. 1103-1109.
12. Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, et al., Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*, 1999. 67(6): p. 918-922.
13. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, et al., Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med*, 2000. 342(18): p. 1309-15.
14. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al., Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 2002. 347(7): p. 488-496.
15. Hirsch HH, Steiger J, Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*, 2003. 3(10): p. 611-623.
16. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al., Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation*, 1999. 67(1): p. 103-109.
17. Hix JK, Braun WE, Isada CM, Delirium in a renal transplant recipient associated with BK virus in the cerebrospinal fluid. *Transplantation*, 2004. 78(9): p. 1407-1408.
18. Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, et al., The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation*, 2003. 76(11): p. 1653-1655.
19. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, et al., Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*, 2007. 84(3): p. 323-30.
20. Allander T, Andreasson K, Gupta S, et al., Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*, 2007. 81(8): p. 4130-6.
21. Gaynor AM, Nissen MD, Whitley DM, et al., Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*, 2007. 3(5): p. e 64.
22. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS, Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 2008. 319(5866): p. 1096-100.
23. Becker JC, Houben R, Ugurel S, et al., MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(1): p. 248-50.
24. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, et al., Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol*, 2001. 75(21): p. 10290-9.
25. Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P, Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *J Med Virol*, 2008. 80(10): p. 1850-7.
26. Luo C, Bueno M, Kant J, et al., Genotyping Schemes for Polyomavirus BK using Gene Specific Phylogenetic Trees and SNP Analysis. *J Virol*, 2008,24: p. 24.
27. Dugan AS, Eash S, Arwood WJ, Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis*, 2006. 8(2): p. 62-7.
28. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ, Identification of gangliosides-GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol*, 2006. 80(3): p. 1361-6.

29. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, et al., Cidofovir Inhibits Polyomavirus BK Replication in Human Renal Tubular Cells Downstream of Viral Early Gene Expression. *Am J Transplant*, 2008. 8: p. 1413-1422.
30. Seemayer CA, Seemayer NH, Durmuller U, et al., BK virus large T and VP-1 expression in infected human renal allografts. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(12): p. 3752-61.
31. Hanssen Rinaldo C, Hansen H, Traavik T, Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain—a tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. *Arch Virol*, 2005. 150(7): p. 1449-58.
32. Loeber G, Dorries K, DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. *J Virol*, 1988. 62(5): p. 1730-5.
33. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, et al., Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med*, 2008. 205(4): p. 841-52.
34. Rinaldo CH, Myhre MR, Alstad H, et al., Human polyomavirus BK (BKV) transiently transforms and persistently infects cultured osteosarcoma cells. *Virus Res*, 2003. 93(2): p. 181-7.
35. Hirsch HH, BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis*, 2005. 41(3): p. 354-60.
36. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, et al., Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol*, 2003. 71(1): p. 115-23.
37. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al., Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *J Infect Dis*, 2009. 199: p. 837-46.
38. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL, Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*, 2009. 5(3): p. e1000363.
39. Vanchiere JA, White ZS, Butel JS, Detection of BK virus and simian virus 40 in the urine of healthy children. *J Med Virol*, 2005. 75(3): p. 447-54.
40. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al., Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, 2005. 79(10): p. 1277-1286.
41. Nöes G, Human polyoma virus type BK infection and T antibody response in renal transplant recipients. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 1987. 266(3-4): p. 567-74.
42. Wong AS, Chan KH, Cheng VC, et al., Relationship of Pretransplantation Polyoma BK Virus Serologic Findings and BK Viral Reactivation after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*, 2007. 44(6): p. 830-7.
43. Hamilton RS, Gravell M, Major EO, Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK virus. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(1): p. 105-9.
44. Randhawa PS, Gupta G, Vats A, et al., Immunoglobulin G, A, and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin Vaccine Immunol*, 2006. 13(9): p. 1057-63.
45. Bodaghi S, Comoli P, Boesch R, Azzi A, Gosert R, Leuenberger D, Ginevri F, Hirsch H. H., Antibody Responses to Recombinant Polyomavirus BK Large T and VP1 Proteins in Pediatric Kidney Transplant Patients. *J Clin Micro*, 2009. (in press).

46. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, et al., Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant*, 2005. 5(9): p. 2213-21.
47. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al., Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation*, 2003. 75(8): p. 1266-1270.
48. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, et al., Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 2004. 4(12): p. 2109-17.
49. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, et al., BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol*, 2008. 43(2): p. 184-9.
50. Randhawa P, Bohl D, Brennan D, et al., Longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol*, 2008.15(10): p. 1564-71.
51. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, et al., Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007. 14(8): p. 959-68.
52. Rinaldo CH, Traavik T, Hey A, The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol*, 1998. 72(7): p. 6233-6.
53. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH, Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis*, 2006. 8(2): p. 86-94.
54. Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F, Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008.13(6): p. 569-74.
55. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al., Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*, 2007. 7(5): p. 1131-9.
56. Comoli P, Basso S, Azzi A, et al., Dendritic cells pulsed with polyomavirus BK antigen induce ex vivo polyoma BK virus-specific cytotoxic T-cell lines in seropositive healthy individuals and renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*, 2003.14(12): p. 3197-3204.
57. Chen Y, Trofe J, Gordon J, et al., BKV and JCV large T antigen-specific CD8 (+) T cell response in HLA A\*0201 (+) kidney transplant recipients with polyoinavirus nephropathy and patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Virol*, 2008. 42(2): p. 198-202.
58. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al., Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*, 2007. 7(12): p. 2727-35.
59. Egli A, Koehli S., Dickenmann M., Hirsch, H. H., Inhibition of Polyomavirus BK- and Cytomegalovirus-specific T-cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation*, 2009. in press.
60. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P, BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis*, 1995. 26(4): p. 671-3.
61. Nিকেleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al., Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol*, 1999.10(5): p. 1080-1089.
62. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al., Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant*, 2004. 4(12): p. 2082-92.

63. Jorgensen GE, Hammarin AL, Bratt G, et al., Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol*, 2003. 70(1): p. 14–9.
64. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, et al., Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol*, 1999. 30(8): p. 970–7.
65. Singh HK, Bubendorf L, Mihatsch MJ, et al., Urine cytology findings of polyomavirus infections. *AdvExp Med Biol*, 2006. 577: p. 201–12.
66. Singh HK, Andreoni KA, Madden V, et al., Presence of urinary haufen accurately predicts polyomavirus nephropathy. *J Am SocNephrol*, 2009. 20(2): p. 416–27.
67. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al., Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation*, 2007. 84(3): p. 340–5.
68. Gordon J, Brennan D., Limaye, A., Randhawa, P., Storeh, G., Trofe, J., Week, K., and ITirsch, H. H., Multicenter validation of polyomavirus BK quantification for screening and monitoring of renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 2005. 5 (Suppl. 11): p. S381-S382.
69. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, et al., Marked variability ofBK virus load measurement using quantitative real-time PCR among commonly used assays. *J ClinMicrobiol*, 2008. 46(8): p. 2671–80.
70. MacKay W, Paola C, Hirsch H, et al., Nucleic acid tests for JCV and BKV in the management of immunocompromised patients: results of an international external quality assessment study Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) (Abstract P5-03). ESCV 2008 — Clinical Virology Annual Meeting, Saariskla, Finnland, 2008: p. 39.
71. Hirsch HH, Mohaupt M, Klimkait T, Prospective monitoring ofBK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *J Infect Dis*, 2001. 184(11): p. 1494–5; author reply 1495–6.
72. Wu SW, Chang HR, Hsieh MC, et al., Early diagnosis of polyomavirus type BK infection in tailoring immunosuppression for kidney transplant patients: screening with urine qualitative polymerase chain reaction assay. *Transplant Proc*, 2008. 40(7): p. 2389–91.
73. Almeras C, Foulongne V, Garrigue V, et al., Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation*, 2008. 85(8): p. 1099–104.
74. Giraldi C, Noto A, Tenuta R, et al., Prospective study of BKV nephropathy in 117 renal transplant recipients. *New Microbiol*, 2007. 30(2): p. 127–30.
75. Ding R, Suthanthiran M, Noninvasive diagnosis ofBK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK VP1 virus in urine. *Transplantation*, 2003. 76(2): p. 446.
76. Dropulic LK, Jones RJ, Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 2008. 41(1): p. 11–8.
77. Khanna N, Wolbers, M., Mueller, N. J., Garzoni, C, DuPasquier, R. A., Fux, C. A., Vernazza, P., Bernasconi, E., Viscidi, R., Battegay, M., Flirsch, H. H., JCV-Specific Immune Responses in HIV-1 Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J Virol*, 2009. [Epub ahead of print].
78. Weber T, Trebet C, Frye S, et al., Analysis of the systemic and intrathecal-humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis*, 1997.176(1): p. 250–4.

79. Giudici B, Vaz B, Bossolasco S, et al., Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. *Clin Infect Dis*, 2000. 30(1): p. 95-9.
80. Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Zheng Y, et al., A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain*, 2004.127 (Pt 9): p. 1970-8.
81. Du Pasquier RA, Clark KW, Smith PS, et al., JCV-specific cellular immune response correlates with a favorable clinical outcome in HIV-infected individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*, 2001. 7(4): p. 318-22.
82. Koranik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, et al., Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *J Immunol*, 2002.168(1): p. 499-504.
83. Du Pasquier RA, Autissier P, Zheng Y, et al., Presence of JC virus-specific CTL in the cerebrospinal fluid of PML patients: rationale for immune-based therapeutic strategies. *Aids*, 2005. 19(18): p. 2069-76.
84. Sabath BF, Major EO, Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis*, 2002.186 Suppl 2: p. S180-6.
85. Sweet TM, Del Valle L, Khalili K, Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J Cell Physiol*, 2002.191(3): p. 249-56.
86. Cinque P, Scarpellini P, Vago L, et al., Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *Aids*, 1997.11(1): p. 1-17.
87. Hirsch HH, Meylan PR, Zimmerli W, et al., HIV-1-infected patients with focal neurologic signs: diagnostic role of PCR for *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus. *ClinMicrobiol Infect*, 1998. 4(10): p. 577-584.
88. Antinori A, Cingolani A, Lorenzini P, et al., Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *J Neurovirol*, 2003. 9 Suppl1: p. 47-53.
89. Marzocchetti A, Di Giambenedetto S, Cingolani A, et al., Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J ClinMicrobiol*, 2005. 43(8): p. 4175-7.
90. Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, et al., Relation of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in acquired immunodeficiency syndrome patients with biopsy-proven progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*, 1999. 45(6): p. 816-21.
91. Bossolasco S, Calori G, Moretti F, et al., Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis*, 2005.40(5): p. 738-444.
92. De Luca A, Pezzotti, P., Gasnault, J., Cinque, P., Berenguer, J., Di Giambenedetto, S., Cingolani, A., Taofik, Y., Pedale, R., Miralles, P., Larussa, D., Sinha, S., Cauda, R., Marra, C. M., Ammassari, A., and Antinori, A., Survival and neurological outcome with or without zidovudine (CDV) in

- AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) on HAART: A multicohort analysis. *J Neurovirol*, 2005. 11 ( S2): p. S16-S124.
93. Khanna N, Elzi L, Mueller, N. J., Garzoni, C, Cavassini, M., Fux, C. A., Vernazza, P., Bernasconi, E., Battegay, M., Hirsch, H. H., for the Swiss HIV Cohort Study, Incidence and Outcome of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in 20 years of the Swiss HIV Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, 2009. 48: p. 1459-66.
  94. Sharp CP, Norja P, Anthony I, et al., Reactivation and Mutation of Newly Discovered WU, KI, and Merkel Cell Carcinoma Polyomaviruses in Immunosuppressed Individuals. *J Infect Dis*, 2009.199(3): p. 398-404.
  95. Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, et al., Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol*, 1999. 59(4): p. 474-479.
  96. Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, et al., JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*, 1999. 52(2): p. 253-60.
  97. Lednicky JA, Vilchez RA, Keitel WA, et al., Polyomavirus JCV excretion and genotype analysis in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Aids*, 2003.17(6): p. 801-7.
  98. Markowitz RB, Thompson HC, Mueller JF, et al., Incidence of BK virus and JC virus viremia in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected subjects. *J Infect Dis*, 1993. 167(1): p. 13-20.
  99. Sundsfjord A, Flaegstad T, Flo R, et al., BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *J Infect Dis*, 1994. 169(3): p. 485-490.
  100. Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, et al., Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol*, 2004. 29(4): p. 224-229.
  101. Shah KV, Daniel RW, Strickler HD, Goedert JJ, Investigation of human urine for genomic sequences of the primate polyomaviruses simian virus 40, BK virus, and JC virus. *J Infect Dis*, 1997.176(6): p. 1618-21.
  102. Grinnell BW, Martin JD, Padgett BL, Walker DL, Naturally occurring and passage-induced variation in the genome of JC virus. *Prog Clin Biol Res*, 1983.105: p. 61-77.
  103. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Omodeo-Zorini E, et al., Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extramural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J Neurovirol*, 1999. 5(2): p. 125-33.
  104. Newman JT, Frisque RJ, Detection of archetype and rearranged variants of JC virus in multiple tissues from a pediatric PML patient. *J Med Virol*, 1997. 52(3): p. 243-52.
  105. Koralnik IJ, Wuthrich C, Dang X, et al., JC virus granule cell neuronopathy: A novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*, 2005. 57(4): p. 576-80.
  106. Richardson EP, Jr., Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 1961. 265: p. 815-23.
  107. Du Pasquier RA, Corey S, Margolin DH, et al., Productive infection of cerebellar granule cell neurons by JC virus in an HIV+ individual. *Neurology*, 2003. 61(6): p. 775-82.

108. Cinque P, Koralnik IJ, Clifford DB, The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: defining a consensus terminology. *J Neurovirol*, 2003. 9 Suppl 1: p. 88-92.
109. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, et al., A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children. *J Clin Virol*, 2007. 40(1): p. 15-8.
110. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, et al., Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol*, 2007. 40(1): p. 9-14.
111. Ridd K, Yu S, Bastian BC, The presence of polyomavirus in non-melanoma skin cancer in organ transplant recipients is rare. *J Invest Dermatol*, 2009. 129(1): p. 250-2.
112. Bluemn EG, Paulson KG, Higgins EE, et al., Merkel cell polyomavirus is not detected in prostate cancers, surrounding stroma, or benign prostate controls. *J Clin Virol*, 2009. 5: p. 5.
113. Dang X, Axthelm MK, Letvin NL, Koralnik IJ, Rearrangement of simian virus 40 regulatory region is not required for induction of progressive multifocal leukoencephalopathy in immunosuppressed rhesus monkeys. *J Virol*, 2005. 79(3): p. 1361-6.
114. Axthelm MK, Koralnik IJ, Dang X, et al., Meningoencephalitis and demyelination are pathologic manifestations of primary polyomavirus infection in immunosuppressed rhesus monkeys. *J NeuropatholExpNeurol*, 2004. 63(7): p. 750-8.
115. Strickler HD, Goedert JJ, Devesa SS, et al., Trends in U. S. pleural mesothelioma incidence rates following simian virus 40 contamination of early poliovirus vaccines. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(1): p. 38-45.
116. Lopez-Rios F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M, Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet*, 2004. 364(9440): p. 1157-66.
117. Rivera Z, Strianese O, Bertino P, et al., The relationship between simian virus 40 and mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med*, 2008. 14(4): p. 316-21.
118. Patel NC, Vilchez RA, Killen DE, et al., Detection of polyomavirus SV40 in tonsils from immunocompetent children. *J Clin Virol*, 2008. 43(1): p. 66-72.
119. Pancaldi C, Balatti V, Guaschino R, et al., Simian virus 40 sequences in blood specimens from healthy individuals of Casale Monferrato, an industrial town with a history of asbestos pollution. *J Infect*, 2008.
120. Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, et al., Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis*, 2005. 192(4): p. 658-64.
121. Thomas LD, Vilchez RA, White ZS, et al., A prospective longitudinal study of polyomavirus shedding in lung-transplant recipients. *J Infect Dis*, 2007. 195(3): p. 442-9.
122. Li RM, Branton MH, Tanawattanacharoen S, et al., Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002. 13(9): p. 2320-30.
123. Li RM, Mannon RB, Kleiner D, et al., BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation*, 2002. 74(11): p. 1497-504.
124. Chhajed PN, Bubendorf L, Hirsch H, et al., Mesothelioma after lung transplantation. *Thorax*, 2006. 61(10): p. 916-7.

125. Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS, et al., DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med*, 1992. 326(15): p. 988–93.
126. Weber T, Klapper PE, Cleator GM, et al., Polymerase chain reaction for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid: a quality control study. *European Union Concerted Action on Viral Meningitis and Encephalitis. J Virol Methods*, 1997. 69(1-2): p. 231–7.
127. Drews K, Bashir T, Dorries K, Quantification of human polyomavirus JC in brain tissue and cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by competitive PCR. *J Virol Methods*, 2000. 84(1): p. 23–36.
128. Biel SS, Held TK, Landt O, et al., Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(10): p. 3689–95.
129. Limaye AP, Jerome KR, Ruhr CS, et al., Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis*, 2001. 183(11): p. 1669–72.
130. Herman J, Van Ranst M, Snoeck R, et al., Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatr Transplant*, 2004. 8(5): p. 485–92.
131. Beck RC, Kohn DJ, Tuohy MJ, et al., Detection of polyoma virus in brain tissue of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by real-time PCR and pyrosequencing. *Diagn Mol Pathol*, 2004. 13(1): p. 15–21.
132. McNees AL, White ZS, Zanwar P, et al., Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol*, 2005. 34(1): p. 52–62.
133. Sehmani L, Kabamba-Mukadi B, Vandenbroucke AT, et al., Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by Light Cycler real-time PCR. *J Clin Virol*, 2006. 36(2): p. 159–62.
134. Si-Mohamed A, Goff JL, Desire N, et al., Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients. *J Virol Methods*, 2006. 131(1): p. 21–27.
135. Fink MC, Penalva de Oliveira AC, Milagres FA, et al., JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. *J Infect*, 2006. 52(1): p. 30–6.
136. Marzocchetti A, Sanguinetti M, Giambenedetto SD, et al., Characterization of JC virus in cerebrospinal fluid from HIV-1 infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: insights into viral pathogenesis and disease prognosis. *J Neurovirol*, 2007. 13(4): p. 338–46.





## 25 ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ГЛАЗ

Т. Дж. Лизеган

Thomas J. Liesegang, Mayo Clinic, Jacksonville, Florida, U.S.A.

Существует большое и все возрастающее количество вирусов, признанных вызывающими заболевания глаз как отдельную болезнь либо в сочетании с другими системными проявлениями инфекции. Некоторые инфекции незначительны, но многие угрожают потерей зрения или связаны с существенной заболеваемостью или смертностью. Основные вирусы, последовательно рассматриваемые в настоящей главе, перечислены в табл. 25.1.

Таблица 25.1

Некоторые вирусы, вызывающие инфекцию глаз

Вирусы	Семейство вирусов
<b>ДНК-вирусы (все двуцепочечные)</b>	
Аденовирус	Adenoviridae
Вирус простого герпеса 1 (HHV1)	Herpesviridae
Вирус простого герпеса 2 (HHV2)	Herpesviridae
Вирус ветряной оспы (HHV3)	Herpesviridae
Вирус Эпштейна—Барр (HHV4)	Herpesviridae
Цитомегаловирус (HHV5)	Herpesviridae
Вирус герпеса 8 (HHV8)	Herpesviridae
Папилломавирус	Papovaviridae
Вирус оспы человека (натуральная оспа)	Poxviridae
Вирус коревой оспы	Poxviridae
Вирус контактного моллюска	Poxviridae
<b>РНК-вирусы (все одноцепочечные)</b>	
Вирус эпидемического паротита	Paramyxoviridae
Вирус кори	Paramyxoviridae
Вирус иммунодефицита человека	Retroviridae
Энтеровирус (включает полио-, Коксаки, эхо- и энтеровирусы)	Picornaviridae
Вирус денге	Flaviviridae
Вирус лихорадки Западного Нила	Flaviviridae
Гепатит С	Flaviviridae
Вирус краснухи	Togaviridae
Вирус Чикунгунья	Togaviridae
Вирус бешенства	Rhabdoviridae

## АДЕНОВИРУС

Аденовирусы (ADV), которые относятся к семейству Adenoviridae и имеют более 50 серотипов, проявляют тенденцию к инфицированию эпителия, вызывая поражения верхних дыхательных путей. Аденовирусы становятся причиной инфекционных болезней во всем мире во всех возрастных группах, но наиболее часто у детей. При этом заболеваемость не имеет определенной сезонности, отмеченной в отношении других вирусов-возбудителей инфекций дыхательных путей. На конкретный симптомокомплекс влияет возраст и иммунный статус хозяина, а также зона расположения очага инфекции из-за индивидуального тканевого тропизма.

В связи с заболеванием дыхательных путей наиболее распространены серотипы 1, 2, 3, 5, 7, 8 и 21. Новобранцы в армии наиболее часто инфицируются серотипами 4 и 7. Аденовирусы передаются при тесном контакте с выделениями из дыхательных путей или глаз больного, через загрязненные предметы или в зараженных бассейнах. Передача может также осуществляться через инфицированные инструменты или глазные капли в медицинских кабинетах. Большинство аденовирусных заболеваний заканчивается благополучно без всякого лечения, хотя инфекции могут быть летальными.

### Глазные инфекции, вызванные аденовирусом

По крайней мере, 18 серотипов аденовирусов связаны с конъюнктивитом человека. Большинство аденовирусных болезней глаз клинически проявляется как определенный комплекс симптомов, включая простой фолликулярный конъюнктивит (многочисленные серотипы); фарингоконъюнктивальная лихорадка (PCF; чаще всего серотип 3 или 7) и эпидемический кератоконъюнктивит (ЕКК; обычно серотип 8, 19 или 37, подгруппа D). Простой аденовирусный фолликулярный конъюнктивит не нуждается в лечении, отсутствует системное заболевание организма и выраженность симптомов минимальна. Точечный эпителиальный кератит может быть выраженным и слабовыраженным. Фарингоконъюнктивальная лихорадка наблюдается преимущественно у детей с совокупностью конъюнктивита, высокой температуры, фарингита и шейной или преаурикулярной лимфаденопатии. PCF обычно возникает в местах массового скопления детей, таких как детские летние лагеря (конъюнктивит из бассейна), детские сады или учреждения здравоохранения и ассоциируется с типами 3 и 7. Фарингоконъюнктивальная лихорадка высококонтагиозна и через 5–8 дней инкубационного периода может распространяться через контакт с глазами и ртом в течение одной-двух недель после появления симптомов. Продолжительность фарингоконъюнктивальной лихорадки одна—две недели. Острый фолликулярный конъюнктивит развивается в одном глазу с переходом на второй глаз, который обычно затронут меньше (рис. 25.1). Другие симптомы включают в себя отек конъюнктивы, кровоизлияния под конъюнктиву, водянистые выделения, фотофобию и слабо выраженную периорбитальную боль.



**Рис. 25.1.** Аденовирусная фарингоконъюнктивальная лихорадка у взрослого с острым фолликулярным конъюнктивитом обоих глаз. У пациента отмечается инфекция конъюнктивы, хемоз, водянистые выделения и фотофобия, инфекция высококонтагиозна

Осложнения редки, хотя может развиваться слабо выраженный эпителиальный кератит или субэпителиальный инфильтрат, что отмечается реже, чем при кератоконъюнктивите. Аденовирусный кератоконъюнктивит, в основном вызываемый типами 8, 19 и 37, может вызвать более серьезное заболевание глаз, чем РСF, и обычно возникает у взрослых. Он обычно не сопровождается фарингитом, но возникает в виде эпидемии и является высококонтагиозным и сопряженным со значительными убытками для работодателя. Кератоконъюнктивит вызывается серотипом вируса 8, быстро распространившимся в 1941 г. от тихоокеанского фронта на западный берег США, прежде всего на судостроительных заводах (отсюда произошло старое название болезни «болезнь судостроительной верфи»), и потом по всем Соединенным Штатам. В последнее время эпидемии типичного кератоконъюнктивита вызывают серотипы аденовируса 19 и 37. Была также прослежена связь между вспышками конъюнктивита и посещением кабинетов офтальмологов, которые, предположительно, были вызваны инфицированными офтальмологическими растворами или диагностическим оборудованием.

После 5–14-дневного инкубационного периода эпидемический кератоконъюнктивит начинается в одном глазу и после этого переходит на второй глаз. Клинические симптомы включают в себя ощущение инородного тела, фотофобию, ослабленное зрение, отек конъюнктивы и век (хемоз), субконъюнктивальное кровоотечение, фолликулярный или папиллярный конъюнктивит и преаурикулярную аденопатию. У некоторых пациентов может быть выраженное субконъюнктивальное кровоизлияния, напоминающие энтеровирусный острый геморрагический конъюнктивит (АНС). У большинства пациентов при соответствующих условиях развивается кератит, который обычно диагностируется через неделю после начала заболевания. Диффузная инфекция эпителия роговицы может перейти в точечные эпителиальные повреждения, затем развивается воспаление стромы роговицы, которое может перейти в хроническое. Могут присутствовать псевдомембраны, прежде всего на тарзальной конъюнктиве. Выделение

вируса может продолжаться до двух недель. Репликация аденовируса происходит в корнеальном эпителии, но образование инфильтрата, скорее всего, вызывается иммунопатологической реакцией на вирусную инфекцию. В редких случаях при эпителиальном кератоконъюнктивите в результате субэпителиальной инфильтрации в течение нескольких месяцев и даже лет могут отмечаться светобоязнь и сниженное зрение, которые обычно в последствии излечиваются. Хронические осложнения могут включать в себя рубцевание конъюнктивы и сухость глаз.

## Диагностика и профилактика аденовирусной инфекции

Диагностика обычно осуществляется на основе клинической картины, если обнаружена эпидемия конъюнктивита. Клеточное культивирование вируса считается неопровержимым доказательством аденовирусной инфекции и также позволяет определить серотип последней. Культуры из конъюнктивальных мазков должны забираться на ранней стадии, хотя выделение из конъюнктивы может произойти за неделю при фарингоконъюнктивальной лихорадке и, вполне возможно, за 2 недели при эпителиальном кератоконъюнктивите. Стандартное культивирование может занять до 2 недель, техника монослойной культуры клеток обеспечивает более раннее выделение вируса в течение трех дней.

Типичные цитопатические эффекты включают округление и агрегацию набухших клеток. Гистологическое исследование ткани может выявить аденовирусные внутриядерные включения.

Определение титра антител к ADV возможно в слишком отдаленные сроки после инфицирования для его клинического применения, но может быть использовано для того, чтобы подтвердить диагноз при его четырехкратном повышении по сравнению с нормой. Коммерчески доступны быстрые тесты для выявления ADV в клинических образцах глаз, в том числе полимеразная цепная реакция (ПЦР), гибридизация, анализ фрагментов при расщеплении рестриктазой, антительный анализ при помощи флуоресцентной микроскопии, иммуоферментный анализ, иммуоэлектронная микроскопия, иммуофлюоресцентный анализ с временным разрешением и специфические типы иммуоферментного анализа, хотя эти методы не всегда применимы в клинике [1–4]. Наиболее часто используется метод прямой флуоресцентной детекции антитела, но более чувствительным и быстрым является ПЦР, хотя этот метод ограничивается доступностью и оборудования, и условий проведения. Для одновременной детекции известных вирусов и возбудителя хламидийной инфекции фолликулярного кератоконъюнктивита разработан мультиплексный ПЦР-анализ [5].

ADV-болезни очень заразны. Многие больные ЕКС являются носителями вируса на руках, ADV могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких недель на раковинах и полотенцах в качестве источников заражения. Обязательно соблюдение правил личной ги-

гиены, включая изоляцию человека от членов семьи и других людей. Целесообразно оформление временного освобождения от занятий в школе или работы, пока признаки болезни не исчезнут, что может продолжаться до двух недель. Офтальмологические кабинеты, сами офтальмологи и поликлиники часто становятся источниками распространения инфекции [6]; в случаях выявления эпидемии аденовирусной инфекции специальная комиссия должна провести проверку соблюдения санитарных правил.

Дезинфекция оборудования при помощи этилового спирта, моющих средств или хлоргексидина недостаточно, поэтому инструменты должны быть продезинфицированы путем погружения в 1%-й раствор гипохлорита натрия (хлорки) на 10 мин или автоклавированы. Мытье рук ненадежно удаляет аденовирусы с загрязненных пальцев. Для обследования пациентов с ЕКС необходимо использовать перчатки. Недостаточное хлорирование бассейна может привести к вспышкам аденовирусных инфекций. Аденовирусы вызывают развитие эффективного и длительного иммунитета против повторного заражения.

## ВИРУС ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Известно восемь вирусов герпеса человека, которые вызывают инфекции глаз: вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2 типов, вирус ветряной оспы (VZV), вирус Эпштейна—Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, который также называется вирусом герпеса человека 8 типа (KSHV). HSV-инфекции распространены во всем мире как в развитых, так и в развивающихся странах и передаются восприимчивым лицам при тесном контакте с поверхностью слизистой оболочки или поражениями кожи. HSV имеет два основных антигенных типа с различными моделями эпидемиологического распространения и инфицирования. HSV-1 чаще всего вызывает инфекцию «выше пояса» (поражение слизистой губ, полости рта и глаз), а HSV-2 — «ниже пояса» (поражение слизистой половых органов), но любой из двух вирусов может привести к инфекции любой локализации, более того, HSV-1 и HSV-2 могут одновременно инфицировать один нервный ганглий.

В большинстве развитых стран происходит изменение эпидемиологии вирусов герпеса. В настоящее время антитела против HSV-1 чаще приобретаются в подростковом возрасте, чем в детстве, в то же время высокая половая активность приводит к увеличению распространенности антител к HSV-2 [7]. Около трети людей страдают рецидивирующей HSV-инфекцией. Реактивация HSV в ганглиях (тройничного или крестцового нерва) может сопровождаться бессимптомным выделением вируса или развитием герпетических поражений слизистой оболочки. Герпесвирусная инфекция распространяется при тесном контакте с инфицированными больными или их выделениями, но чаще всего при бессимптомном выделении вирусов. HSV может передаваться новорожденным при прохождении через родовые пути

матери с генитальной инфекцией, у новорожденных вирусы герпеса могут вызвать местное поражение кожи и слизистую или системную инфекцию, включая энцефалит.

### Герпесвирусная болезнь глаз человека

Первичная HSV-1-инфекция у людей начинается в виде неспецифической инфекции верхних дыхательных путей и обычно не распознается как герпетическая. Заболевание проявляется в виде пузырьков на коже и границе век и одностороннего фолликулярного блефароконъюнктивита с выраженным увеличением преаурикулярного лимфатического узла. У пациента с первичной инфекцией глазного герпеса может развиваться эпителиальный кератит, но появление стромального кератита или же увеита при первичной инфекции глаз встречаются гораздо реже.

Периодически возникающие HSV-инфекции обусловлены реактивацией латентного вируса в сенсорных ганглиях, транспортом вируса вниз по нервному аксону до чувствительных нервных окончаний и последующей инфекцией эпителия поверхности глаз. Триггерные механизмы рецидивов HSV давно обсуждаются, хотя возможно увеличение повторения глазных инфекций, связанных с ВИЧ-инфекцией [8]. Частота рецидивов глазных инфекций в течение двух лет HSV составляет от 25 до 50%. Периодические HSV могут поражать практически любые ткани глаз, включая веки, конъюнктивы, роговицу, радужную оболочку, трабекулярную сеть и сетчатку.

Наиболее распространенные проявления клинически распознаваемых рецидивирующих инфекций глазного герпеса включают блефароконъюнктивит, инфекцию эпителия роговицы (эпителиальный кератит), инфекции стромы роговицы (стромальные кератиты) и иридоциклит (или увеит). HSV-блефароконъюнктивит проявляется пузырьками века иногда с вовлечением конъюнктивы. HSV-поражение эпителия роговицы вызывает ощущение инородного тела, чувствительность к свету, размытое зрение и покраснение.

Герпетическая инфекция эпителия роговицы человека проявляется в виде областей точечного эпителиального кератита, которые могут сливаться в один или несколько ветвящихся дендритных набухших клеток эпителия, что связано с ассоциированным изъязвлением клеток. Древовидный кератит может распространиться дальше и образовать географический рисунок изъязвления эпителия (рис. 25.2.) После HSV эпителиального кератита возможно очаговое или диффузное снижение чувствительности роговицы. Герпетический стромальный кератит можно разделить на некротический и не-некротический (интерстициальный или дисковидный), которые имеют различные клинические проявления. Некоторые из этих особенностей связаны с вирусной репликацией, но основные характеристические особенности двух типов клинического течения связаны с реакциями иммунной системы [9]. Характерные изменения вклю-

чают монофокальное или мультифокальное помутнение стромы, побеление, некроз и нагноение, отек, образование рубцов или утончение, а также неоваскуляризацию роговицы и воспаление передней камеры, которое проявляется гиперемией, преципитацией клеток и кератина (воспалительные клетки осаждаются в нижней части роговицы). HSV-иридоциклит проявляется в воспалительной реакции передней камеры, которая может сопровождать любую из форм стромального или эпителиального кератита либо может произойти независимо от заболевания роговицы. Могут быть обнаружены воспалительные клетки, гиперемия глаз, повышенное внутриглазное давление и дефекты светопропускания радужной оболочки. У некоторых пациентов HSV был выделен культивированием из передней камеры. Острый некроз сетчатки [10] является серьезным редким заболеванием, которое может быть вызвано инфекцией HSV или VZV и проявляется как ухудшение зрения в одном или обоих глазах у лиц с ослабленным иммунитетом [11]. Характерные особенности включают некротический ретинит, витрит и васкулит сетчатки, часто приводит к отслоению сетчатки. Примерно у трети пациентов развивается двустороннее поражение.

### Диагностика и профилактика герпетической инфекции

HSV-инфицирование глаз, как правило, является клиническим диагнозом. Вирусная культура полезна для диагностики, но хрупкость вирусной оболочки требует осторожного обращения. Чувствительность всех методов обнаружения зависит от стадии поражения (более высокой чувствительностью определяется раннее везикулярное поражение, по сравнению со старыми язвенными поражениями). Чувствительность также зависит от того, первый это эпизод или повторный эпизод заболевания (более высокая чувствительность при первом эпи-



**Рис 25.2.** HSV-инфекция эпителия роговицы с несколькими крупными дендритными ветвящимися поражениями эпителия у больных с предшествующей пересадкой роговицы (см. швы). Существует также глубокое снижение восприятия роговицы

зоде), а также от того, получен ли образец от больных с ослабленным иммунитетом или от иммунокомпетентных пациентов (у пациентов с ослабленным иммунитетом больше антигенов и ДНК). Везикулярная жидкость может быть аспирирована при помощи иглы или после удаления верхней корочки тампоном, смоченным этанолом. Стерильным ватным тампоном промакивают очаг поражения, а затем тампон помещают в питательную среду для культивирования вируса. Характерные цитопатические эффекты проявляются в выбранной линии клеток в пределах 24–48 ч. Эффективность первичного выделения вируса и скорость диагностики может быть улучшена с помощью культуры в мелких флаконах.

Мазок инфицированных клеток, в которых выражен цитопатический эффект, по методу Цанка может быть получен от соскобов из зоны поражения клеток и нанесением на предметное стекло мазков, которые фиксируются метанолом и окрашиваются красителем по Романовскому—Гимзе (краска Романовского—Райта). Наличие многоядерных гигантских клеток указывает на инфекцию HSV или VZV. Цервико-вагинальные отпечатки по Папаниколау также могут продемонстрировать внутриядерные включения. Вирус герпеса может быть обнаружен с помощью электронной микроскопии или прямого иммунофлуоресцентного окрашивания антител к антигену и иммунной электронной микроскопии с использованием вирус-специфических моноклональных антител, которые помогают выделить HSV 1, HSV 2 и VZV. Исследования подтвердили ценность диагностической системы Herpcheck для тестирования на HSV-антиген и ELVIS (вирусиндуцирующая система, связанная с ферментом (диагностическая система, основанная на быстром размножении HSV в генетически измененных клетках почек новорожденных хомячков линии ВНК с последующим иммунофлуоресцентным определением и типированием вируса. — *Прим. перев.*)), а также ПЦР [12]. Для рутинной диагностики все большее признание получает метод ПЦР [11, 13].

Серология путем нейтрализации вируса, связывания компонента, пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ, комплемент-опосредованный цитолитический анализ, антитело-зависимый клеточный лизис или радиоиммунологический анализ демонстрирует рост титра антител при первичной инфекции, но не имеет диагностической ценности во время рецидивов, так как большинство взрослых людей латентно инфицированы HSV и серологически положительны.

Ни одна из протестированных вакцин полностью не предотвращает инфекции и не приводит к увеличению латентного периода, и, следовательно, профилактика герпетической инфекции зависит от снижения риска передач и, возможно, реактивации. Было продемонстрировано профилактическое действие ацикловира, позволяющее снизить число рецидивов воспаления глаз в течение периода перорального приема препарата [14]. Вероятность передачи от человека к человеку может быть уменьшена для большинства человеческих герпесвирусов путем



соблюдения простой гигиены и избегания контактов с лицом, имеющим признаки повторной инфекции. Механическая передача, в том числе унитазы и полотенца, не важны как способы передачи, потому что инфекционный вирус часто выделяется до появления явных симптомов рецидива инфекции. Поскольку имеют место бессимптомные случаи выделения вируса, ни один метод не может быть полностью профилактическим. В частности, распространение инфекции путем контакта с выделениями из ротовой полости может обуславливать профессиональные вредности медицинских работников, обеспечивающих системы искусственного дыхания, и стоматологов, в связи с чем этим работникам рекомендуется использовать медицинские перчатки. Вирусы герпеса легко инактивируются различными физическими и химическими агентами, включая обычные дезинфицирующие средства. Стандартные методы стерилизации являются достаточными для обеззараживания медицинского оборудования.

## **ВИРУС ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ (ГЕРПЕС ЗОСТЕР)**

Вирус герпес зостер (VZV) относится к подсемейству альфа-герпесвирусов широко распространенных по всему миру, без географического распределения. Вирус является причиной двух различных синдромов: ветряной оспы и опоясывающего лишая. В то время как персистенция HSV происходит в ганглиях нейронов, VZV может переживать как в ганглионарных сателлитных клетках, так и в нейронах или в обоих типах клеток.

### **Ветряная оспа**

До лицензирования вакцины и введения в практику вакцинации против ветряной оспы среди восприимчивых детей весной в условиях умеренного климата имели место ежегодные эпидемии ветряной оспы с числом случаев, эквивалентным ежегодному числу новорожденных. Серологические тесты подтвердили, что почти все население имело признаки предварительной инфекции VZV, даже если они не помнят самого заболевания. Вакцины против ветряной оспы и опоясывающего герпеса изменяют протекание обеих болезней, вызванных VZV, хотя, возможно, комплексным образом [15, 16]. В детстве ветряная оспа обычно протекает как генерализованная везикулярная сыпь на коже и слизистых оболочках, которая сопровождается умеренными общими симптомами в виде лихорадки и общего недомогания. Ветряная оспа передается при непосредственном контакте с VZV-повреждениями кожи или воздушно-капельным путем при передаче секрета дыхательных путей и очень заразна для прежде не вакцинированных и не болевших ветрянкой людей. VZV-инфекция, как правило, является самоограничивающейся инфекцией детского возраста и редко бывает связана с долгосрочными последствиями. Инфицирование новорожденных, взрослых и лиц с нарушением иммунитета, однако, может быть связано с серьезными осложнениями.

## Болезни глаз, связанные с ветряной оспой

Вовлечение глаз, как правило, слабо выражено и самоограниченно. Могут возникать везикулярные поражения век и конъюнктивы или фолликулярный конъюнктивит, а также внутренняя офтальмоплегия. Роговица может быть вовлечена в процесс древовидного кератита, симптомы которого похожи на таковые при HVS, в том числе точечный эпителиальный кератит, или стромальное помутнение, или рубцовый кератит. Хотя субэпителиальные инфильтраты, стромальный кератит, дисковидный кератит, увеит и повышение внутриглазного давления редки, у некоторых пациентов ветряночный кератоувеит рекуррентного течения может привести к значительному проценту осложнений болезни.

## Синдром врожденной ветряной оспы

Ветряная оспа, приобретенная во время беременности, может иметь серьезные последствия как для матери, так и плода. Поскольку большинство взрослых, родившихся в США, имеют иммунитет от ранее перенесенной ветряной оспы или вакцинации против ветряной оспы, уровень материнской ветряной оспы в настоящее время низок. Наиболее яркими аномалиями синдрома врожденной ветряной оспы являются необычные кожные дефекты в виде рубцов на коже, атрофия конечностей, а также признаки повреждения вегетативной нервной системы. Многие пораженные дети имеют микроцефалию и атрофию коры головного мозга. В отношении глаз синдром врожденной ветряной оспы выражается в хориоретините, микрофтальмии и катаракте.

## Диагностика и профилактика ветряной оспы

Лабораторные исследования обычно не требуются. Окончательный диагноз инфекции VZV может быть сделан с использованием методов культуры тканей, но вирус очень лабилен, и пробы должны храниться при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , если культура не может быть добавлена к культуре клеток сразу. В идеале везикулярное содержимое должно быть собрано в гепаринизированные капилляры и перенесено непосредственно в культуру человеческих эмбриональных фибробластов легких. Вирус образует типичные очаговые внутриядерные тельца включения. Для обнаружения многоядерных гигантских клеток могут быть использованы цитологические методы по Цанку. Эти клетки часто содержат эозинофильные внутриядерные включения (Коудри типа А) в образцах из зоны поражения или срезах тканей. Быстрая диагностика кожных инфекций VZV может быть достигнута путем выявления антигена в эпителиальных клетках из основания пузырька с помощью иммуногистохимических методов, таких как метод иммуноферментного анализа или гибридизация. Наиболее чувствительными для выявления VZV являются ПЦР-методы. Антитела могут быть определены в низких концентрациях в момент начала ветряной

оспы, связанном с появлением сыпи. VZV IgG-антитела сохраняются в течение жизни после первичной инфекции, и анализы на наличие антител IgG к VZV ценны для определения иммунного статуса лиц, чьи истории болезни ветряной оспой неизвестны или сомнительны. Иммунный статус контактных лиц наиболее легко можно определить с помощью теста латекс-агглютинации. Поскольку уровень антител, связывающих комплемент, быстро падает после заражения, этот показатель не может быть использован для определения восприимчивости к вирусу.

Ветряная оспа очень контагиозна, и заболевшие люди выделяют вирусы из дыхательных путей еще до появления характерной сыпи. Таким образом не всегда возможно избежать контакта с инфицированными людьми. Механическая передача не является основным путем передачи инфекции. Один эпизод болезни обычно приводит к формированию пожизненного иммунитета к ветряной оспе. В США для профилактики ветряной оспы доступны две живые ослабленные вакцины: один антиген вакцины против ветряной оспы (Varivax) и комбинированная вакцина против кори, эпидемического паротита, краснухи и ветряной оспы (MMRV). В результате недавних случаев инфекций новые рекомендации включают в себя обычно двухразовую вакцинацию против ветряной оспы для детей и вторую дозу дополнительной вакцинации против ветряной оспы для тех, кто получил вакцину. Проводится также вакцинация всех здоровых лиц от 13 лет и старше, если у них нет признаков иммунитета против VZV. После внедрения вакцины против ветряной оспы в 1995 г. заболеваемость ветряной оспой уменьшилась на 90% и вакцина навсегда изменила эпидемиологию ветряной оспой в США. Вакцинация также должна снизить частоту рецидивов инфекции VZV.

### **Болезнь опоясывающего лишая**

Латентную форму VZV можно обнаружить в основном в ганглиях тройничного нерва, грудном и коленчатом. Вирус может активироваться позже в жизни, вызывая опоясывающий герпес (HZ), как в ответ на разнообразные воздействия, приводящие к изменению клеточного иммунитета, при старении или иммуносупрессии. HZ отмечается во всех возрастных группах, в том числе у здоровых людей, и в конечном итоге встречается у 10–20% населения. Рецидивирующий HZ чрезвычайно редок, кроме лиц с пониженным иммунитетом, особенно больных СПИДом. Люди моложе 50 лет, у которых диагностируется HZ, должны быть опрошены на предмет факторов риска ВИЧ или быть обследованы на ВИЧ. У больных с пониженным иммунитетом HZ, скорее всего, будет протекать в продолжительной и тяжелой форме, что может приводить к виремии и распространению заболевания. Болезнь в конечном итоге может привести к висцеральной или неврологической инфекции, с повышением заболеваемости и смертности. Постгерпетическая невралгия (ПН) развивается после HZ-инфекции

примерно у 50% пациентов старше 50 лет. Боль при ПГН может быть тяжелой и изнурительной и может сохраняться в течение месяцев или даже лет.

ЛАНЬ

### Заболевания глаз, ассоциированные с опоясывающим лишаем

Хотя большинство случаев HZ связаны с грудным отделом, около 15% связаны с глазной ветвью тройничного нерва (пятый черепно-мозговой нерв), а также может включать нижнечелюстной нерв и верхнечелюстной (скуловой) нерв.

Поражение глаз при инфицировании вирусом опоясывающего лишая (HZO) проявляется везикулярными высыпаниями с распределением по ходу ветви тройничного нерва (рис. 25.3). Новые проявления HZ возникают на том же месте в течение семи дней. Характерная для HZ макулопапулярная сыпь возникает на том же месте после везикул и пустул. При больших зонах поражения может развиваться HZ-дерматит, который иногда приводит к формированию больших струпов, которые разрешаются медленно и оставляют значительные рубцы. Хотя поражения, казалось бы, локализованы, они, как правило, сопровождаются вирусемией, подтвержденной ПЦР, связанной с каждым рецидивом. Как показано при взятии проб вдали от локализации пузырьков, инфекция HZ иногда распространяется значительно и приводит к висцеральным заболеваниям у практически здоровых лиц.



**Рис. 25.3.** Поражение глаз при инфицировании вирусом опоясывающего лишая (HZO, *herpes zoster ophthalmicus*): везикулярная сыпь и струпы по ходу первой ветви тройничного нерва. У больного выявляется симптом Хатчинсона (поражения кожи на кончике, на крыльях носа или у корня носа), это сильный прогностический фактор глазных воспалений и денервации роговицы при HZO. Возможные осложнения включают рубцевание век, трещины краев век, потерю ресниц, трихиаз и рубцовый заворот или выворот века

Симптом Хатчинсона, определяемый как герпесные поражения кожи на кончике, сбоку или у корня носа, является сильным прогностическим фактором воспалений глаз и денервации роговицы глаз и денервации при НЗО. Патофизиология диффузного и тяжелого осложнения воспаления глаз НЗО включает такие компоненты вирусной инфекции, как воспалительные и иммунные реакции, сосудистые и нервные воспаления и рубцевание тканей с сосудистым и нервным воспалением, которое хорошо развито еще до того, как появляется сыпь, и, конечно, может быть проверено перед противовирусной терапией [17].

Вовлечение век может привести к остаточному рубцеванию век, появлению трещин на веках, потере ресниц, трихиазу и рубцовому завороту или вывороту века. Инъекция конъюнктивы является очень распространенным явлением. Воспаление эписклеры (эписклерит) или склеры (склерит), связанные с опоясывающим лишаем, может быть узловым, зональным или диффузным. Осложнения в отношении роговицы выявлены у 65% лиц, в том числе древовидное повреждение эпителия, нейротрофический кератит (онемение роговицы), монетовидный инфильтрат роговицы, интерстициальный стромальный кератит и дисковидный кератит. Хроническое воспаление стромы роговицы может привести к васкуляризации роговицы, липидной кератопатии и помутнению роговицы.

Передний увеит с повышением внутриглазного давления, орбитальный отек, папиллит или ретробульбарных неврит зрительного нерва представляют собой прочие характерны признаки НЗО у некоторых пациентов. Общие неврологические осложнения НЗО включают острую невралгию и ПГН, редкие осложнения включают отдаленную контралатеральную гемиплегию, энцефалит и миелит.

Некротическая герпетическая ретинопатия представляет собой непрерывный процесс воспаления заднего сегмента, вызванный несколькими вирусами герпеса, наиболее часто — VZV [18]. Двумя наиболее часто определяемыми типами клинической картины являются острый некроз сетчатки (ARN) [10] и прогрессирующий некроз наружной сетчатки (PORN). Как правило, ARN развивается у здоровых людей и ВИЧ-больных только при слабой иммунной дисфункции и высоком уровне CD4, а PORN обычно обнаруживается у лиц с серьезно ослабленным иммунитетом. У больных с ARN обычно отмечается острая односторонняя потеря зрения, светобоязнь, плавающие мушки перед глазами и боль. Другой глаз может быть вовлечен в процесс примерно у трети случаев, как правило, в течение шести недель от начала заболевания. Основными клиническими признаками являются: окклюзия артериол сетчатки, витрит и мультифокальный желто-белый периферический ретинит [19]. PORN [20], по существу, является морфологическим вариантом острого некротического герпетического ретинита, появляющегося чаще всего у пациентов с далеко зашедшей стадией ВИЧ/СПИД или у пациентов с глубоким ослаблением иммунитета, вызванным иными причинами. Наиболее распространенной причиной

PORN является VZV, однако также был описан случай HSV — индуцированного PORN. Ретинит похож на ARN, за исключением того, что задний полюс может быть вовлечен в процесс развития болезни достаточно рано, воспалительные клетки стекловидного тела практически отсутствуют, ретинальные сосуды минимально вовлечены. У большинства больных присутствует предыдущая история болезни, в которой упоминается эпизод HZ.

### Диагностика и профилактика опоясывающего лишая

HZ-инфекция может быть подтверждена выделением вируса, методом прямой иммунофлуоресценции антигена в тканевом соскобе (например, четырехкратного повышения титра антител к вирусным антигенам [21]). Поскольку вирус опоясывающего лишая является сильным клеточно-ассоциированным членом группы HSV, VZV трудно обнаружить или выделить в бесклеточных образцах. Многоядерные гигантские клетки в мазках Цанка из соскоба области поражения могут быстро подтвердить наличие вируса, но чувствительность этого метода низка. Наиболее часто используют серологические способы для оценки иммунного ответа хозяина: иммунофлуоресцентное выявление антител к мембранным антигенам VZV, тест с использованием флуоресцентных антител к антигену мембраны (Fama), иммунную гемагглютинацию и иммуноферментный анализ (ИФА).

При герпетической ретинопатии диагноз, как правило, устанавливается клинически. В отдельных обстоятельствах проводится анализ внутриглазной жидкости, отбор проб жидкости или стекловидного тела [22]. Внутриглазную выработку антител в качестве иммунного ответа на VZV можно вычислить с помощью коэффициента Голдмана—Уитмера (GW): этот коэффициент рассчитывается как отношение специфических антител (водной фазы или стекловидного тела) к общему количеству IgG (водной фазы или стекловидного тела), деленное на отношение количества специфических антител в сыворотке к общему количеству IgG в сыворотке, измеренным с помощью ИФА и радиоиммунологического метода. Отношение больше четырех считается диагностическим для локальной продукции антител. ПЦР может повысить диагностическую эффективность, а количественная ПЦР может добавить дополнительную информацию в отношении вирусной нагрузки, активности процесса заболевания и ответа на терапию. Эндоретинальная биопсия также может быть диагностическим методом.

Специфические изменения клеточного иммунного ответа в отношении VZV являются основным фактором, определяющим риск и тяжесть HZ как у пожилых пациентов, так и у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию. Уровень антител к VZV только подтверждает прежде имевшуюся инфекцию, но не может быть использован в качестве маркера восприимчивости к HZ, хотя наличие антител может обеспечивать защиту от рецидива ветряной оспы. Определение

активности VZV-специфичных Т-клеток — сложная лабораторная процедура и не используется для клинических целей. В 2006 г. FDA на основе результатов крупных рандомизированных клинических исследований более чем 38 000 физических лиц подтвердили, что более высокая доза вакцины против VZV (Zostavax) защищает от НЗ. Это исследование, проведенное у лиц в возрасте 60 лет и старше, показало также, что вакцина снижает частоту НЗ на 51% по сравнению с плацебо. В тех случаях, когда НЗ все-таки развивается, несмотря на вакцинацию, количество случаев ПГН было ниже на 39%. В 2008 г. CDC также рекомендовал вакцинацию против НЗ.

## ВИРУС ЭПШТЕЙНА—БАРР

Вирус Эпштейна—Барр (EBV) был открыт в 1964 г. — выделен из образцов тканей пациента с лимфомой Беркитта; в 1968 г. была установлена причинно-следственная связь между EBV и инфекционным мононуклеозом.

В развивающихся странах большая часть населения инфицируется EBV в раннем возрасте, и это приводит к субклинической инфекции. Если инфицирование происходит в более старшем возрасте, это вызывает клинику инфекционного мононуклеоза с лихорадкой, фарингитом, воспалением миндалин и лимфатических узлов. Антитела к EBV обнаруживаются почти у всех взрослых. Как и в случае других вирусов герпеса, после заражения EBV персистирует на протяжении всей жизни в В-лимфоцитах и, возможно, эпителиальных клетках слизистой носоглотки. Многие инфицированные В-лимфоциты содержат ДНК EBV в ядре в кольцевой неинтегрированной форме. EBV дает зараженным лимфоцитам способность непрерывно расти в культуре клеток; этот процесс называют *иммортализацией*. EBV периодически бессимптомно выделяется и обнаруживается в секрете ротоглотки около 15% времени жизни у здоровых лиц, этот механизм способствует его передаче в человеческой популяции. Частота выделения вируса значительно увеличивается у пациентов с нарушением клеточного иммунитета, хотя этот вирус не очень контагиозен. Показано, что EBV участвует в развитии целого ряда других заболеваний, таких как лимфома Беркитта, рак носоглотки, волосатая лейкоплакия ротовой полости, а также различных В-клеточных и, возможно, Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Неврологические осложнения встречаются менее чем у 1% пациентов с инфекционным мононуклеозом и включают энцефалит, асептический менингит, поперечный миелит, синдром Гийена—Барре, неврит зрительного нерва, а также нарушения периферической нервной системы.

## Глазные болезни, вызванные вирусом Эпштейна—Барр

Вирус Эпштейна—Барр редко вызывает заболевания глаз, но является наиболее распространенной причиной острого дакриoadенита,

характеризующегося воспалительным увеличением одной или обеих слезных желез. У больных с острым инфекционным мононуклеозом были зарегистрированы острый фолликулярный конъюнктивит, глазожелезистый синдром Парино (*H. Parinaud*) и узелки на бульбарной конъюнктиве, что может быть результатом EBV-инфекции. Кератит, вызванный EBV, может развиваться в виде точечного эпителиального кератита, древовидного кератита или стромального кератита. Формы одностороннего или двустороннего стромального EBV-кератита включают мультифокальный субэпителиальный инфильтрат (напоминающий аденовирусный кератит), многоочаговые пятнистые плеоморфные инфильтраты с активным воспалением в передней камере до середины стромы или мультифокальный периферический инфильтрат, глубокий или до половины толщины, с васкуляризацией или без нее (напоминающий интерстициальный кератит при сифилисе) [23, 24].

### **Диагностика и профилактика болезни, вызванной вирусом Эпштейна—Барр**

Лабораторные исследования EBV затруднены из-за отсутствия полноценной перmissive клеточной системы, позволяющей культивировать вирус. В настоящее время для детекции первичной EBV-инфекции и диагностики инфекционного мононуклеоза существует высокочувствительная ПЦР в режиме реального времени [25]. Из-за трудностей в выделении вируса диагноз EBV мононуклеозной инфекции подтверждается выявлением антител к различным вирусным компонентам. Во время острой инфекции в начале появляются IgM, а затем IgG к антигенам вирусного капсида (VCAs). Антитела IgG к VCA могут персистировать в течение всей жизни пациента. Уровень антител к ранним антигенам (EAs) может повышаться в период острой фазы заболевания, а затем снижаться до низкого или неопределяемого уровня у большинства людей. Антитела к ядерным антигенам EBV (EBNAs) появляются через несколько недель или даже месяцев после инфицирования, обеспечивая серологические доказательства перенесенной инфекции [26].

Ни одна вакцина не является в настоящее время эффективной против EBV, но исследования продолжают в направлении разработки вакцин на основе цитотоксических Т-лимфоцитов.

### **ЦИТОМЕГАЛОВИРУС**

Цитомегаловирус (CMV) был первоначально выделен от больных с врожденной цитомегалией с характерными внутриклеточными включениями. Репликация вируса связана с образованием специфических крупных внутриядерных включений и меньших по размеру цитоплазматических включений. Как и другие вирусы герпеса, цитомегаловирус стремится поддерживать сложный баланс с хозяином и способен к формированию длительной латентной инфекции. Боль-



шая часть клинических симптомов заболевания возникает при реактивации латентного вируса у больных с нарушениями иммунной системы. Помимо тяжелых врожденных дефектов у новорожденных, CMV вызывает широкий спектр нарушений у детей старшего возраста и взрослых. Около 50% взрослых в развитых странах имеют антитела к CMV, которые, как правило, приобретаются в течение первых пяти лет жизни. Считается, что существует несколько основных механизмов передачи вируса от человека к человеку, в том числе вертикальный (внутриутробный, во время естественных родов и через грудное молоко) и горизонтальный контактный путь передачи (слюна, половые контакты, инфицированная моча). Вирус также переносится лейкоцитами. Фекально-оральный и воздушно-капельный пути передачи CMV, вероятно, доминируют, но встречаются также механизмы передачи, связанные с переливанием контаминированной крови и трансплантацией органов. Может происходить реинфицирование другим штаммом CMV уже инфицированных больных.

Большинство случаев CMV-инфекции у лиц без нарушений иммунной системы протекает бессимптомно. У некоторых больных заболевание напоминает инфекционный мононуклеоз: развивается лихорадка, миалгия, астения и лимфаденопатия. Хотя этот синдром встречается в любом возрасте, но чаще всего — у сексуально активных молодых людей. Осложнения возникают редко, может развиваться ретинит. В отличие от доброкачественного течения инфекции у здоровых лиц, CMV является одной из основных причин тяжелого состояния у пациентов с иммунодефицитом (с различными клиническими проявлениями в зависимости от причины и степени подавления иммунной системы). До введения высокоактивной антиретровирусной терапии (HAART) диссеминированная CMV-инфекция является наиболее распространенной оппортунистической инфекцией при СПИДе.

### **Врожденные и перинатальные инфекции, вызванные CMV**

CMV — самая частая врожденная инфекция в США и может привести к первичной или рецидивирующей CMV-инфекции у беременных женщин. Мать может заразить ребенка цитомегаловирусом во время родов при прохождении через родовые пути или послеродового контакта с инфицированным грудным молоком или другими выделениями. У большинства младенцев, инфицированных во время или вскоре после рождения, заболевание протекает бессимптомно. Инфицирование плода приводит к разным последствиям — от бессимптомной до тяжелой диссеминированной формы, которая проявляется задержкой развития, гепатоспленомегалией и тромбоцитопенической пурпурой, реже желтухой, микроцефалией и хориоретинитом [27]. Прогноз жизни у этих детей неблагоприятный. У некоторых новорожденных, не имеющих выраженных патологических симптомов при рождении,

могут развиваться отдаленные последствия, в частности умственная отсталость и нейросенсорная тугоухость.

### Глазные болезни, вызванные цитомегаловирусом у больных с ослабленным иммунитетом

CMV-ретинит наиболее распространенная оппортунистическая инфекция глаз у больных СПИДом и до введения HAART отмечался у трети больных СПИДом. Ретинит, вызванный CMV, бывает иногда первым заболеванием, ассоциированным со СПИДом, и наиболее часто встречается у людей, у которых количество CD4+ Т-лимфоцитов менее 50 клеток/мм<sup>3</sup>. CMV-ретинит развивается в результате гематогенного распространения CMV и обычно начинается нарушением резкости визуального восприятия, появлением плавающих мушек, снижением зрения, уменьшением полей зрения; слепота прогрессирует в отсутствие лечения, особенно в случае далеко зашедшего СПИДа. Ранние поражения сетчатки представлены небольшими, непрозрачными, белыми областями гранулярного некроза, которые распространяются центробежным образом и позже сопровождаются кровоизлияниями, околосоудистым отеком, а также отеком сетчатки (рис. 25.4). Желтовато-белые поражения сетчатки часто идут по ходу сосудов, так как вирус поражает сначала эндотелий кровеносных сосудов. При отсутствии лечения часто происходит вовлечение в процесс второго глаза. С момента появления HAART частота серьезных случаев CMV (например, ретинита) в США и Европе снизилась на 80% и в настоящее время обнаруживается только у пациентов с иммуносупрессией, которые либо не получали терапии, или у которых не развился ответ на анти-



**Рис. 25.4.** CMV-ретинит у больного СПИДом. Показаны непрозрачные, белые области гранулярного некроза сетчатки, которые распространяются центробежным образом, сопровождаясь кровоизлияниями, образованием околосоудистой муфты и отеком сетчатки. Желтовато-белые поражения сетчатки часто располагаются по ходу сосудов, в отсутствие лечения часто происходит вовлечение второго глаза

ретровирусную терапию [28, 29]. Применение HAART может привести к различным клиническим проявлениям симптоматической CMV-инфекции в условиях восстановления иммунитета. В течение первых нескольких недель после начала проведения HAART может наблюдаться острая вспышка CMV-ретинита, которая является вторичной по отношению к развитию воспалительного синдрома, обусловленного восстановлением иммунитета, в этом случае ретинит начинается с переднего увеита, витрита и цистозидного отека макулы [30]. В основе патогенеза этого процесса лежит процесс восстановления иммунных реакций, хотя до конца механизм не очень хорошо понят, но, видимо, связан с восстановлением Т-клеточного иммунитета к антигенам латентно персистирующего внутриглазного CMV.

### **Лабораторная диагностика и профилактика цитомегаловирусной болезни**

Для заболеваний иной локализации диагноз CMV-инфекции, как правило, не может быть надежно установлен на основании клинической картины, однако глазные симптомы при достоверно установленном факте иммуносупрессии являются характерными клиническими признаками, достаточными для постановки диагноза. Культура вируса считается золотым стандартом для выявления CMV-инфекции, но ложноотрицательные результаты культивирования и медленное выделение культуры снижает его ценность. Более быстро результаты культивирования могут быть получены в течение одного-двух дней при использовании метода культивирования в мелких флаконах с применением техники центрифугирования и иммуноцитохимического метода обнаружения, основанного на использовании моноклональных антител к ранним немедленным антигенам CMV. Моноклональные антитела могут быть использованы для выявления антигенов CMV непосредственно в лейкоцитах периферической крови (антигенемии), а также дают возможность количественного анализа. Анализ вирусной ДНК методом ПЦР позволяет обнаружить вирусную нагрузку. Метод ПЦР более чувствителен, чем культивирование, и, по крайней мере, сопоставим с анализом на антигенемии. Сероконверсия является отличным маркером при первичной CMV-инфекции, но повышение титра IgG, даже в четыре раза или больше, не является диагностическим и характерным для первичного инфицирования, потому что титры IgG могут появиться во время реактивации латентной формы CMV. Наличие антител IgG является чувствительным маркером перенесенной инфекции и используется для скрининговых исследований крови или пациентов при трансплантации. Обнаружение вирусных антител IgM указывает на текущую инфекцию. Микроскопическим признаком CMV-инфекции являются крупные (цитомегалия), 25–35 мкм клетки, содержащие большие центральные, базофильные внутриядерные включения, которые также называют «глаз совы».

Поскольку CMV передается путем обмена продуктами секреции или экскреции, инфицирование может быть уменьшено путем минимизации контакта с жидкостями, выделяемыми организмом, и выбором соответствующих доноров крови и органов. Фильтры, которые удаляют из лейкоцитов крови, также эффективны в снижении передачи CMV. Хотя живые ослабленные вакцины CMV способны вызывать образование антител и реакцию клеточного иммунного ответа, возможные онкогенные свойства ограничивают их применение, так что в настоящее время клинические испытания проходят только убитые вакцины.

## **ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ**

Вирус папилломы человека (или папилломавирус человека, HPV) широко распространен в природе и передается в основном при непосредственном контакте. Эти вирусы строго эпителиотропны и имеют высокую степень видовой и тканевой специфичности как для кожи, так и для слизистых оболочек. На сегодняшний день описано более 100 индивидуальных типов HPV. Хроническая инфекция HPV восприимчивых клеток эпителия вызывает пролиферацию клеток и может привести к злокачественной трансформации. HPV подтипов 6 и 11 сохраняются в латентном состоянии в базальных клетках эпителия в виде кольцевых эписом. Продукты раннего вирусного гена стимулируют рост клеток и способны привести к образованию бородавки на коже или папилломы конъюнктивы. Некоторые из клеток эпителия становятся полностью перmissивными для экспрессии вирусных генов и продукции инфицирующего вируса. Малигнизация в связи с HPV 6 или 11 очень редка. Подтипы HPV 16 и 18 способны стереотипно интегрировать вирусный геном в хромосомную ДНК хозяина, а также могут быть связаны со злокачественной трансформацией и плоскоклеточным раком. HPV тесно связана с образованием кондилом (генитальных бородавок), цервикальной интраэпителиальной неоплазией и раком шейки матки, конъюнктивальной интраэпителиальной неоплазией, несколькими случаями плоскоклеточного рака головы и шеи и, возможно, аденокарциномой легких. HPV является, пожалуй, одним из наиболее распространенных венерических вирусных агентов у человека. Инфицированные лица, как правило, болеют бессимптомно. Конечно, при ВИЧ-индуцированной иммуносупрессии клиника HPV-инфекции сильно меняется.

### **Заболевания глаз человека, вызванные вирусом папилломы**

HPV инициирует рост опухолевых клеток эпителия с сосудистой пролиферацией, что приводит к формированию обычных бородавок сероватого цвета (бородавка) на коже век или папилломы конъюнктивы на красноватой ножке (рис. 25.5). Частота выявления ДНК HPV в конъюнктивальной папилломе варьирует от 50 до 100% [31]. В конъюнктиве, как правило, обнаруживаются подтипы 6 или 11,



**Рис. 25.5.** Папилломы конъюнктивы, показанные в виде красноватого поражения на ножке с пальцеобразными отростками. Папилломавирус человека может быть обнаружен в большинстве случаев в таких очагах поражений, особенно подтипов 6 или 11, реже 18, 33 и 16. Поражения могут быть односторонними или двусторонними с множественными поражениями различного размера, обычно располагающимися на сводах

реже 18, 33 и 16. В пожилом возрасте папилломы, как правило, ассоциированы с подтипом 16 или они могут иметь не вирусное происхождение. Путь передачи вируса на конъюнктиву пока еще не известен. Папиллома конъюнктивы может быть односторонней или двусторонней с множественными поражениями различных размеров, как правило, располагающихся на сводах [32]. Поражения могут быть плотно прикрепленные или на ножке с несколькими пальцеобразными отростками, которые могут спонтанно регрессировать, но у лиц пожилого возраста папилломы могут подвергаться злокачественной трансформации.

Интраэпителиальные неоплазии конъюнктивы и сквамозноклеточная карцинома, ассоциированные с папилломавирусами, имеют много общих гистологических признаков с аналогичными поражениями шейки матки.

### **Диагностика и предупреждение заболеваний, вызванных папилломавирусом человека**

Большинство кожных и аногенитальных бородавок диагностируется на основе истории болезни и клинического обследования, но гистологическое исследование биопсийного образца является диагностическим. После окончания жизненного цикла ПВЧ в терминально дифференцированных эпителиальных клетках вирусы с трудом подвергаются культивированию в клеточной культуре. Присутствие HPV в тканях подтверждается типоспецифическим методом гибридизации нуклеиновых кислот и ПЦР — амплификацией [33]. Иммунологические методы анализа могут быть использованы для типоспецифической диагностики HPV.

## ВИРУС НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

Поксвирусы *Poxviridae* представляют собой одно из семейств оболочечных ДНК-вирусов, с характерной кирпичеобразной или яйцевидной формой и сложной структурой капсида. Поксвирусы — это крупные вирусы размером от 200 до 320 нм, реплицирующиеся в клеточной цитоплазме с формированием эозинофильных цитоплазматических телец включения. Поксвирусы, имеющие значение для глазных болезней, включают в себя вирус натуральной оспы, вирус коровьей оспы и вирус контактного моллюска. Вирус натуральной оспы считается элиминированным в результате широкомасштабной иммунизации вакцинным вирусом коровьей оспы и тщательным эпидемиологическим исследованием, позволившим обнаружить все очаги и случаи заболевания и вакцинировать инфицированных и всех лиц, находившихся в контакте с больными. Тем не менее существует постоянная возможность биотерроризма с применением вируса натуральной оспы. Натуральная оспа передается от человека к человеку воздушно-капельным путем при респираторных нарушениях, прямых контактах с кожей больного и через загрязненные предметы. При выдыхании вирус натуральной оспы внедряется в слизистую носоглотки или дыхательных путей, мигрирует в региональные лимфатические узлы и начинает размножаться. Первоначальные или продромальные симптомы аналогичны таковым при других вирусных заболеваниях, и, поскольку обычно вовлечен желудочно-кишечный тракт, имеется тошнота и рвота, часто боль в спине. Позже в процесс вовлекается кожа, при этом имеется несколько различных вариантов остроты протекания. Смертность среди невакцинированных людей составляет 20–35%.

### Заболевания глаз, вызванные натуральной оспой

Вирус как натуральной, так и коровьей оспы ассоциирован с серьезными осложнениями на органы зрения, при этом натуральная оспа, по сообщениям, до иммунизации составляла более одной трети причин развития слепоты в Европе, и даже в поздние 1960-е гг. натуральная оспа оставалась значительной причиной слепоты в Африке. Веки глаз обычно вовлечены в процесс формирования обширных поражений, состоящих из сливающихся пустул. Пустулы на конъюнктиве сопровождаются болью, светобоязнью, слезотечением, иногда фликтенулезным конъюнктивитом. Участие роговицы обычно имеет место при значительном распространении пустул с области на лимб. Изъязвления роговицы является наиболее распространенным серьезным осложнением и может привести к перфорации, пролапсу радужной оболочки, эндофтальмиту и поздним осложнениям со стороны роговицы, включающим вторичную глаукому, ретинит, хориоретинит, неврит глазного нерва, паралич аккомодации, паралич глазодвигательных мышц, ретробульбарные геморрагии с птозом и дакриоцистит.

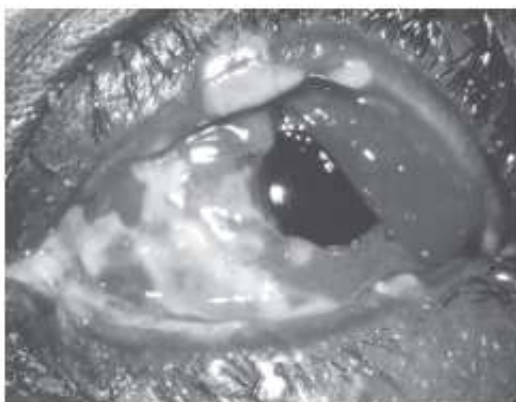
## ВИРУС КОРОВЬЕЙ ОСПЫ

Многоточечная вакцинальная болезнь — вирусное заболевание, передающееся через бифуркационную иглу при вакцинации против натуральной оспы, — в настоящее время входит в стандартный протокол вакцинации Вооруженных сил США, персонала системы здравоохранения и лабораторных сотрудников, работающих с ортопоксвирусами. Наиболее часто развитие инфекции проходит стандартные этапы от везикулы до пустулы. Из всех вакцин, используемых сегодня, вакцинный вирус коровьей оспы, который представляет собой пять живых репликативных вирусов, обладает одним из наиболее высоких неблагоприятных исходов. Наибольшее число осложнений включает прогрессирующую оспу, вакцинальную экзему, генерализованную форму коровьей оспы, поствакцинальный энцефалит и кардит [34].

### Заболевание глаз, вызванное вирусом коровьей оспы

Примерно у 10–20 человек на каждый миллион иммунизированных против коровьей оспы развиваются осложнения на органы зрения, обычно в результате аутоинокуляции вируса, хотя нарушение медицинским персоналом правил манипуляций с емкостью, содержащей живую вакцину, и иглами также является потенциальным источником инфекции.

Острота протекания инфекции варьирует в зависимости от уровня иммунитета нового хозяина. У больных с низким иммунитетом развивается офтальмологическая реакция, напоминающая барьерную реакцию кожи на первичную вакцинацию, включая высокую температуру, недомогание, сопровождающееся целлюлитом глазницы, блефаритом, конъюнктивитом и кератитом. Вакцинальный блефароконъюнктивит со сливающимися везикулами, сопровождающийся сильным болезненным предглазничным и глазничным целлюлитом — наиболее распространенная реакция (рис. 25.6). Везикулы образуются из пустул, которые имеют центральное углубление в виде пупка со струпами, что приводит к образованию красных неровных шрамов на веках и потере ресниц. Конъюнктивит, вызванный коровьей оспой, является фолликулярной реакцией с конъюнктивальными язвами, гнойными выделениями и воспалительными мембранами и последующим образованием рубцов на конъюнктиве. Вакцинальный кератит является следствием прямой вирусной инвазии роговицы, вызывающей точечный поверхностный кератит и последующее поражение стромы, которое может состоять либо в субэпителиальных помутнениях или более глубоких абсцессах в строме роговицы. Могут возникнуть отсроченный дисконидный и некротический стромальный кератит и, возможно, перфорация роговицы, опосредованная реакцией иммунной системы. Semba изучил большое количество международной литературы по офтальмологическим осложнениям вакцинальной болезни и обнаружил случаи ирита, окклюзии центральной артерии сетчатки, пигментной дегене-



**Рис. 25.6.** Блефароконъюнктивит, вызванный аутоинокуляцией у человека, недавно вакцинированного от оспы. Присутствует сильный болезненный преорбитальный целлюлит с язвами на веках и конъюнктиве и гнойными выделениями. Существует высокий риск поражения роговицы и стромы с абсцессами

рации сетчатки, хориоретинита, центральной серозной ретинопатии, экссудативного ретинита, неврита зрительного нерва, ретробульбарного неврита зрительного нерва с энцефаломиелитом и преходящим косоглазием [35, 36]

### Лабораторная диагностика и профилактика инфицирования вирусом коровьей оспы

Глазная вакцинальная болезнь — это клинический диагноз, основанный на истории болезни, расчете сроков и проявлениях. Диагноз может быть подтвержден путем получения соскобов и мазков зон поражений и глазных выделений. В мазках обнаруживаются многочисленные полиморфноядерные клетки с эпителиальными клетками, содержащими тельца Гварниери. Антигены могут быть обнаружены при помощи методов прямой и непрямой иммунофлуоресценции, ДНК может определяться ПЦР-методами, культура оспы может быть получена в чистом виде на хорионаллантоисной мембране цыпленка.

Вероятность инфицирования вирусом коровьей оспы может быть уменьшена при избегании контакта глаз с местом иммунизации и частом мытье рук.

### ВИРУС КОНТАГИОЗНОГО МОЛЛЮСКА

Вирус контагиозного моллюска (MCV) встречается повсеместно в мире, но обычно имеет генерализированный хронический характер и протекает более тяжело у больных СПИДом по сравнению с пациентами из других групп. Как правило, поражается лицо и верхняя часть тела. Инфицирование происходит через незначительные повреждения кожи, такие как царапины, при прямом контакте с пораженной ко-



жей больного, контаминированными предметами (например, общие полотенца) или передается половым путем.

Иногда возникают вспышки инфекции, но обычно заболевание появляется спорадически и характеризуется многочисленными гладкими и безболезненными перламутровыми узелками от 2 до 5 мм в диаметре с вдавлением в форме пупка в середине. Как правило, у больного бывает от 1 до 20 узелков, но иногда могут появляться сотни. Инкубационный период может варьировать от нескольких дней до нескольких недель, и узелки могут быстро исчезнуть или присутствовать до 18 месяцев. Самая высокая заболеваемость отмечается у детей младше 5 лет, особенно в жарком климате и условиях скученности. Более серьезная и затяжная инфекция обнаруживается у лиц с ослабленным клеточным иммунитетом, включая инфицированных ВИЧ.

### **Болезни глаз, вызванные вирусом контагиозного моллюска**

Узелки на веках с углублениями в центре выделяют вирусные частицы в слезную пленку, вызывая токсический фолликулярный конъюнктивит (рис. 25.7). Кроме того, могут возникнуть точечные эпителиальные эрозии и, в редких случаях, корнеальный паннус (фиброз), изъязвление или перфорация тканей [37]. Обширные поражения лица и век возникают при СПИДе [38]. Конъюнктивит после устранения поражений на коже может проходить в течение нескольких недель.



**Рис. 25.7.** Повреждения кожи, вызванные вирусом контагиозного моллюска, характеризуются многочисленными гладкими безболезненными перламутровыми узелками от 2 до 5 мм в диаметре с углублением в центре, напоминающим пупок. Узелки на веках с углублениями в центре выделяют вирусные частицы в слезную пленку, вызывая токсический фолликулярный конъюнктивит и точечные эпителиальные эрозии роговицы. При СПИДе могут возникнуть обширные поражения лица и век

### **Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом контагиозного моллюска**

Диагностика основывается на характерных поражениях кожи или век. MCV можно диагностировать при исследовании кожного соскоба или пунктата, выявляющего ограниченную эпидермальную псевдоопухоль с эпидермальной гиперплазией и характерными большими эозинофильными внутрицитоплазматическими вирусными включениями (тельца Гендерсона—Патерсона, также называемые «моллюсковыми тельцами»). Хотя другие поксвирусы человека могут быть выделены в чистом виде в культуре, MCV не культивируется стандартными методами. Серология обычно неэффективна. Определение ДНК с помощью гибридизации, рестрикционного анализа или ПЦР позволяет быстро провести идентификацию и дифференциацию.

Атипичные многочисленные сливные поражения, вызванные MCV, могут быть индикатором системной иммунной недостаточности и требуют уточнения на наличие ВИЧ-инфекции.

### **ВИРУС ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА**

Вирус эпидемического паротита высококонтагиозен и быстро распространяется среди восприимчивых людей при тесном контакте. Он обычно передается воздушно-капельным путем при прямом контакте или через зараженные предметы.

В связи с широким применением эффективной вакцины эпидемический паротит главным образом возникает у маленьких детей, часто сопровождается неспецифическими признаками начала заболевания: пониженной температурой, недомоганием, головной болью, миалгией и анорексией. Эти симптомы благополучно разрешаются без специфического лечения. Паротит развивается в течение 48 ч, что является классическим признаком. У некоторых пациентов развиваются эпидидимоорхит и поражение ЦНС. Инфекция у взрослых протекает тяжелее, чем у детей.

### **Инфекции глаз, вызванные паротитом**

Офтальмологические симптомы при паротите включают в себя фотофобию, острый мукоидный фолликулярный конъюнктивит и эпителиальный и стромальный кератит [39]. Воспаление слезной железы (дакриoadенит) иногда возникает одновременно с поражением околоушной железы. Реже в течение двух недель после появления паротита возникают ирит, трабекулит, склерит, глазной двигательный паралич, нейроретинит и неврит зрительного нерва [40].

### **Диагностика и профилактика заболеваний, связанных с вирусом эпидемического паротита**

У пациентов с классическими симптомами паротита лабораторного подтверждения не требуется. Вспомогательная лабораторная диагно-

стика включает определение IgM к паротиту, рост титров при сравнении парных сывороток, взятых во время острого периода заболевания и в процессе выздоровления, или определение нуклеиновой кислоты вируса методом ПЦР в клиническом образце. Методы выделения чистой культуры требуют больших затрат времени.

Несмотря на значительное снижение распространенности паротита в связи с введением живой аттенуированной вакцины «корь—краснуха—паротит», все еще случаются внезапные вспышки паротита. Предупреждение передачи инфекции зависит от ранней диагностики, изоляции инфицированного пациента и иммунизации восприимчивых людей, контактировавших с заболевшим.

## ВИРУС КОРИ

До введения иммунизации корь была широко распространенным детским заболеванием, считалось, что вирус кори — самый инвазивный из всех вирусов. У истощенных детей в бедных странах корь приводит к высокой смертности. До иммунизации в развивающихся странах эпидемия начиналась каждые два или три года. К 2004 г. охват вакцинацией против кори значительно снизил заболеваемость и смертность, за исключением части африканского континента к югу от Сахары и центральных частей Юго-Восточной Азии. Молекулярные эпидемиологические исследования подтвердили, что большинство случаев заболевания в США сейчас происходят вследствие завоза вируса. Корь распространяется воздушно-капельным путем при чихании и кашле. Входными воротами служат клетки дыхательных путей и, возможно, конъюнктивы. Заболевание может быть заразным за несколько дней до появления сыпи и до 5 дней после. Клинически корь проявляется высокой температурой, недомоганием, миалгией и головной болью. Классическая триада кори включает в себя кашель, насморк и фолликулярный конъюнктивит.

### Заболевания глаз, вызванные вирусом кори

В течение нескольких часов с момента появления симптомов, возникают светобоязнь и инфекция конъюнктивы. На пальпебральной и, в меньшей степени, бульбарной конъюнктиве развивается водянистый конъюнктивит [41]. Мелкие белые пятна (Коплика) могут появляться на пальпебральной конъюнктиве, кроме того, на конъюнктиве может развиваться папиллярный или фолликулярный конъюнктивит, легкий эпителиальный кератит. Корева кератопатия — основная причина слепоты в развивающихся странах, обычно присутствуют изъязвления или помутнения роговицы у истощенных детей с недостатком витамина А [42]. Реже возникают неврит зрительного нерва и окклюзия ретинальных сосудов. Корева ретинопатия приводит к глубокой потере зрения через одну-две недели после появления характерной экзантемы и характеризуется утонченными артериолами, диффузным отеком, формированием фигуры «макулярной звезды» в области пятна сетчатки, беспорядочными ретинальными кровоизлияниями, раз-

мытыми границами диска и прозрачной средой. При разрешении системных симптомов и острой ретинопатии могут появиться утончение артериол с отеком периваскулярных пространств или без отека, бледность диска зрительного нерва и вторичная пигментная ретинопатия либо с костными тельцами, либо с «солью с перцем». Она может осложняться энцефалитом.

### **Врожденные глазные заболевания, вызванные вирусом кори**

Офтальмологические проявления врожденной коревой инфекции включают в себя катаракту, друзы диска зрительного нерва и билатеральную диффузную пигментарную ретинопатию с вовлечением заднего полюса и ретинальной периферии. Ретинопатия может также быть связана либо с нормальными, либо с измененными сосудами сетчатки, ретинальной эдемой и образованием фигуры «звезды». Дифференциальный диагноз врожденной коревой ретинопатии включает в себя одну из составляющих синдрома TORCH (токсоплазмоз, корь, цитомегаловирусная инфекция, вирус герпеса, включая вирус Эпштейна—Барр и сифилис).

### **Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом кори**

Наблюдение характерной сыпи, высокой температуры, ринита и конъюнктивита в эпидемическом окружении достаточно для установления диагноза. В окрашенных мазках назального секрета часто могут обнаруживаться многоядерные гигантские клетки. Вирус может выделяться в чистом виде из носового секрета или конъюнктивы путем культивирования в монослоях клеток приматов, но это технически трудно. Антиген кори или РНК может быть обнаружен ОТ-ПЦР либо методом иммунофлуоресценции. Подъем уровня антител в реакции подавления гемагглютинации в течение двух-трех недель подтверждает диагноз. Возможно также подтверждение наличия специфических коревых антител при помощи иммуноферментного анализа.

Несмотря на существование безопасной, эффективной и недорогой вакцины, с 1963 г. корь остается основной причиной смертности по всему миру среди маленьких детей; как бы то ни было, в США корь в настоящее время встречается довольно редко. Противокоревая вакцина доступна в моновалентной форме, а также в комбинации с паротитом и краснухой. Корь без осложнений лечится симптоматически, но в тех странах, где может быть дефицит витамина А, стандартная доза для перорального приема витамина А может снизить заболеваемость и смертность от кори.

## **ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА**

Ретровирусы кодируют вирусный фермент обратную транскриптазу, помогающую в преобразовании однонитевого генома РНК в кольце-

вую двухнитевую молекулу ДНК, которая после этого интегрируется в хромосомную ДНК клетки организма-хозяина. Ретровирусом, являющимся наиболее важным с медицинской точки зрения, является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вызывающий спектр заболеваний, включая состояние бессимптомного носителя, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) и СПИД-ассоциированный комплекс.

ВИЧ инфицирует преимущественно Т-клетки, особенно Т-хелперные лимфоциты (CD4+), идентифицирующиеся моноклональными антителами ОКТ4 и Leu 3. ВИЧ попадает в организм носителя при сексуальном контакте на поверхности слизистой оболочки, при кормлении грудью или через иглы с зараженной кровью. Инфекция, передаваемая половым путем, продвигается с помощью захвата ВИЧ дендритными клетками на слизистых оболочках. Первичная вирусемия влечет за собой ВИЧ-продром, похожий на инфекционный мононуклеоз, с последующей диссеминацией периферических лимфоидных органов и развитием измеримого иммунного ответа. Инфицированные пациенты могут остаться бессимптомными носителями несколько лет, но Т-лимфоциты CD4+ постепенно истощаются. В конечном итоге развивается клинический иммунодефицит. Альтернативно у некоторых развивается острый ретровирусный синдром, типичные симптомы которого — высокая температура, усталость, потеря в весе, миалгия, головная боль, фарингит и тошнота.

### **Глазные заболевания, вызванные вирусом иммунодефицита человека**

Сам по себе ВИЧ изолирован от слез, конъюнктивы, роговицы, внутриглазной жидкости, радужки, склеры, стекловидного тела и сетчатки и может стать причиной внутриглазного воспаления при отсутствии других возбудителей у случайных пациентов. Описывались пациенты с передним или задним увеитом с ВИЧ, развившимся либо из внутриглазной жидкости, либо из жидкой части стекловидного тела, хотя ВИЧ как специфический источник остается под сомнением. Другое состояние воспаления, названное многоочаговым точечным ретинальным инфильтратом (также называемый ВИЧ-микроваскулопатия или ВИЧ-ретинопатия) может быть связано с воспалением соответствующего переднего сегмента и может быть прямым последствием ВИЧ-инфекции или результатом ишемии.

Большинство офтальмологических отклонений у пациентов, инфицированных ВИЧ, связаны с другими инфекциями, имеющими отношение к глубоко подавленному состоянию иммунореактивности, и отклонения, связанные с глазами, могут быть первым симптомом диссеминированной системной инфекции [43, 44]. Эти глазные заболевания, связанные с ВИЧ/СПИДом, включают нейропатию, опоясывающий герпес с поражением глаз, миелоцитоматоз, сухой кератоконъюнктивит, микроспорициальный кератоконъюн-

ктивит, ВИЧ-нейропатию, криптококковый неврит зрительного нерва, ретинальную микроваскулопатию, хориоидит и ретинит, вызванные множеством инфекций, включая сифилис, микобактерии, пневмоцистоз, токсоплазмоз, CMV, HSV и VZV [45, 46]. Некоторые из этих инфекций были хорошо изучены, но редко встречались до эпидемии ВИЧ, а некоторые имеют проявления, различающиеся у людей с ВИЧ-инфекцией и у общей иммунокомпетентной популяции. Лечение многих этих заболеваний представляет сложность в связи с иммунодефицитным состоянием хозяев. Увеличение продолжительности жизни пациентов с ВИЧ также привело к изменениям в проявлении некоторых болезней глаз, связанных с ВИЧ-инфекцией или их частоты. HAART изменяет проявления определенных заболеваний по сравнению с теми, которые были в более ранние времена, так как улучшение работы иммунитета может ограничить остроту инфекции, но позволяет усиление воспалительных реакций. Цитомегаловирусный ретинит остается наиболее распространенным нарушением, вызывающим слепоту у пациентов с ВИЧ. CMV передается через кровь, слюну, грудное молоко и слизистые оболочки, но у иммунокомпетентных лиц инфекция обычно бессимптомна или приводит к развитию благоприятно протекающей инфекции, похожей на мононуклеоз и завершающейся без лечения. Диссеминация CMV и разрушающая ткани инфекция ретины происходит вместе с сильной иммуносупрессией как при поздних проявлениях СПИДом. До появления HAART пациенты редко жили дольше одного-двух лет после диагностирования CMV-ретинита. Наиболее характерным признаком CMV-ретинита является сухая гранулярная граница с многочисленными сателлитными поражениями, похожими на точки, вызванные продвижением инфекции в обычную ретину в отсутствие значительных воспалительных реакций. Эпителиальный кератит или стромальный кератит, по имеющимся сведениям, возможно, связан с вирусом, персистирующим в слезной железе, конъюнктиве и роговице.

Заболевание CMV более распространено у людей со СПИДом, чем в основной популяции, и поражения век могут быть первоначальным клиническим проявлением заболевания ВИЧ. У ВИЧ-положительных пациентов заболевание CMV протекает более агрессивно, с обширным распространением поражений, особенно на веках и лице, хотя конъюнктивальные и корнеальные осложнения CMV, обнаруженные у пациентов без нарушений иммунитета, у больных СПИДом не развиваются, скорее всего, из-за невозможности развития воспалительной реакции. Восстановление иммунной функции при помощи HAART может привести к снижению и исчезновению симптомов CMV без терапии, специфически направленной непосредственно на вирус. HPV-инфекция очень распространена на всех стадиях ВИЧ-инфекции, и пациенты со значительным подавлением иммунной системы могут иметь особенно большое количество папиллом, не поддающихся стандартному лечению.

Опоясывающий герпес с поражением глаз более часто проявляется у ВИЧ-инфицированных людей, и возможность ВИЧ-инфекции должна рассматриваться у молодых людей с этим заболеванием, если у них отсутствуют другие известные факторы риска, способные вызвать подавление иммунитета. НЗО может быть первым клиническим проявлением ВИЧ-инфекции, и НЗО, связанный с ВИЧ-инфекцией может быть особенно серьезным. Хроническая НЗ-инфекция корнеального эпителия была описана при офтальмологическом проявлении НЗО у пациентов с ВИЧ. НЗО более часто может быть мультидерматическим, диссеминированным или иметь хроническую бородавчатую кожную форму пациентов с наиболее сильной иммуносупрессией. Инфекция у ВИЧ-положительных пациентов, видимо, не отличается от течения у неинфицированных пациентов, кроме повышенного риска повторного инфицирования и относительного недостатка стромального воспаления роговицы.

Острый некротизирующий герпетический ретинит имеет несколько вариантов течения [47]. Синдром прогрессирующего наружного некроза роговицы (PORN) — единственный вариант VZV-ретинита, наблюдаемого у больных СПИДом, и он отличается от синдрома острого ретинального некроза [10], форма VZV-ретинита обычно наблюдается у иммунокомпетентных пациентов. На ранних стадиях прогрессирующей наружный ретинальный некроз трудно дифференцировать с периферическим CMV-ретинитом. Как бы то ни было, для PORN характерно быстрое развитие процесса, а относительное отсутствие воспаления стекловидного тела обычно позволяет отличить эту инфекцию от CMV-ретинита и острого некроза сетчатки.

### Лабораторная диагностика и профилактика ВИЧ-инфекции

ВИЧ-инфекция определяется выделением вируса в культуре или детекцией специфических ВИЧ-антител, ВИЧ-антигенов или ВИЧ ДНК в сыворотке. ВИЧ может быть выделен и выращен в культуре из лимфоцитов периферической крови или, иногда, из образцов из других мест. Количество циркулирующих инфицированных клеток варьирует в зависимости от стадии заболевания. В продаже есть наборы для ИФА-измерения количества антител. При правильном проведении эти тесты могут иметь очень высокую чувствительность и специфичность. Для определения вирусной ДНК в клинических образцах широко используются амплификационные тесты, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), ДНК ПЦР и вДНК-анализы. Для скрининга используются ИФА, для подтверждения или опровержения ложноположительных и ложноотрицательных результатов в сомнительных случаях используются вестерн-блот, иммунофлуоресцентные исследования антител, определение р24-антигенов, количественная ПЦР ДНК, культивирование вируса и другие техники. Несмотря на то что ВИЧ был выявлен в слезах, эпителиоцитах конъюнктивы и рогови-

цы, воде, ретинальном васкулярном эндотелии и ретине, риск передачи ВИЧ во время большинства офтальмологических обследований и процедур чрезвычайно низок или не существует. Из-за возможности передачи вируса во время офтальмологических обследований или при трансплантации роговицы и других процедурах Центр по контролю и профилактике заболеваний тем не менее выпустил серию рекомендаций для предотвращения распространения ВИЧ, а также прочих возбудителей. Эти рекомендации включают тщательное мытье рук, использование перчаток и стерилизацию любого оборудования, вступающего в непосредственный контакт с тканями или жидкостями пациента, включая слезы. Так как ВИЧ-инфицированные пациенты могут не проявлять явных симптомов заболевания, при взаимодействии со всеми пациентами должны быть предприняты универсальные меры предосторожности. Инструменты, которые соприкасаются непосредственно с внешними поверхностями глаз, должны быть начисто протерты и дезинфицированы путем 5–10-минутного погружения в: (1) свежий 3% раствор пероксида водорода; (2) свежий раствор, содержащий 5000 частей на миллион (ppm) свободного активного хлора — простой домашний отбеливатель (гипохлорит натрия), разбавленный один к десяти; (3) 70%-й этиловый спирт или (4) 70%-й изопропанол. Перед использованием оборудование должно быть тщательно промыто проточной водой. Информация о передаче ВИЧ при трансплантации роговицы отсутствует, но потенциальные корнеальные доноры проверяются на антитела к ВИЧ; люди с положительным результатом ИФА и вестерн-блота или доказанным стилем поведения с высокой степенью риска ВИЧ-инфекции исключаются из списка доноров роговицы для трансплантации. Передача ВИЧ через комплекты контактных линз также вызывает опасение, поскольку ВИЧ выделяется в чистом виде из мягких контактных линз, которые носили люди со СПИДом, и простое промывание линз в стандартном дезинфицирующем растворе неэффективно для дезинфекции линз. Контактные линзы, используемые при обследованиях людей с целью подбора линз, должны обрабатываться между применением различными людьми при помощи коммерчески доступной системы дезинфекции контактных линз на основе пероксида водорода или при помощи стандартного режима термической дезинфекции 78–80 °С, 10 мин).

## ЭНТЕРОВИРУС

Энтеровирусы передаются от человека к человеку фекально-оральным путем. На основании различий между кругом хозяев и патогенным профилем энтеровирусы традиционно подразделяются на пять подвидов: полиовирусы, вирусы Коксаки группы А, вирусы Коксаки группы В, эховирусы и «новые» энтеровирусы. Важными с точки зрения офтальмологии являются вирусы Коксаки и энтеровирусы.



## **Глазные заболевания, вызванные энтеровирусом и вирусом Коксаки**

Вирусный острый геморрагический конъюнктивит (ОГК) чрезвычайно контагиозная, самоизлечивающаяся глазная инфекция, вспышки которой происходят в основном в многолюдных прибрежных районах тропических стран во время жаркого сезона дождей [48]. Инфекция передается через пальцы или загрязненные предметы непосредственно в глаза; распространение контактным путем стимулируется стесненными антисанитарными условиями проживания. Крупномасштабные эпидемии были вызваны энтеровирусом 70 и вирусом Коксаки А24, реже — аденовирусом типа 11. Энтеровирус 70, который впервые был обнаружен в 1969 г. и поэтому называется «Аполло11» [49], вызвал глобальную пандемию в начале 1970-х гг. Эти вирусы вызвали эпидемию в Юго-Восточной Азии и Индийском субконтиненте, в то время как заболевание на Западе ограничилось сезонными вспышками на Карибских островах, в Центральной Америке и южной Флориде.

Причины возникновения и исчезновения определенных серотипов неизвестны. Острый геморрагический конъюнктивит характеризуется бурным началом и быстрым нарастанием симптомов в течение 24 ч — жжением в глазах, ощущением инородного тела, фотофобией, опуханием век и водянистыми выделениями. Наиболее явным признаком является субъконъюнктивальное кровотечение, которое присутствует у почти 90% пациентов с энтеровирусом 70, но реже в случаях, вызванных вирусом Коксаки А24 [50]. Другие офтальмологические симптомы включают образование небольших фолликулов на тарзальной конъюнктиве в течение нескольких дней с начала заболевания и мелкий точечный эпителиальный кератит. Преаурикулярные лимфатические узлы часто мягкие и увеличенные. Восстановление обычно происходит быстро, но кератит может продолжаться в течение нескольких недель. Сообщалось о случае развития острого двигательного паралича, неотличимого от полиомиелита, ассоциированного с энтеровирусом 70.

## **Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных энтеровирусом или вирусом Коксаки**

Как энтеровирус 70, так и вирус Коксаки А24 легко выделяется из слез, но только изредка из других участков тела. Культивирование клеток из конъюнктивальных мазков или соскобов является трудоемким и дорогим, но позволяет типировать изолят для клинического и эпидемиологического исследования. Образцы должны быть доставлены в лабораторию в охлажденном виде и, если вирусные культуры не могут быть обработаны немедленно, образцы должны храниться при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Энтеровирусы оказывают характерное цитопатическое действие на культивируемые клетки. ПЦР более чувствительна при идентификации энтеровирусов, чем культивирование. Микронеутрализационный тест обычно используется для определения в сыворотке

антител к энтеровирусам как в остром состоянии, так и на этапе выздоровления.

Скученность и плохое санитарное состояние увеличивает риск распространения инфекции. Повторное использование воды для мытья и совместное пользование полотенцами способствуют распространению инфекции, поэтому должны соблюдаться простые гигиенические правила. В отличие от инфекции, вызываемой полиовирусами, активная иммунизация против неполио-энтеровирусов не применяется из-за большого числа серотипов.

## ВИРУС ДЕНГЕ

Вирус денге — антропонозный вирус, при этом лихорадка денге передается через укус инфицированной самки комара *Aedes aegypti/albopictus*. Он имеет большое географическое распространение, включая тропики и субтропики. С распространением авиаперелетов и развитием туризма частота распространения инфекции и географическое распределение лихорадки денге растет. Вирусная инфекция денге может быть разделена на 5 клинических проявлений: неспецифическое лихорадочное заболевание, классическая лихорадка денге, геморрагическая форма лихорадки денге, геморрагическая форма лихорадки денге с шоком и другие необычные симптомы, такие как энцефалопатия и гепатит. Геморрагическая лихорадка денге и шоковый синдром денге являются наиболее серьезными проявлениями, но они редки. Серьезность заболевания денге зависит от уровня и качества ответа со стороны вирусспецифичных Т-лимфоцитов. Виремия выявляется за 6–18 ч до появления симптомов и заканчивается при появлении лихорадки. Иммунопатологические механизмы, связанные с лихорадкой денге, видимо, представляют собой комплексный ряд иммунных реакций, инициированных инфицированием вирулентным вирусом денге, с последующим усилением иммунного ответа антителозависимой реакцией.

## Глазные заболевания, вызванные вирусом денге

Офтальмологические проявления лихорадки денге редки. Пациенты могут жаловаться на нечеткость зрения, центральные скотомы, плавающие частички, фотопсию и глаукоматозный ореол вокруг источника света [51]. Интервал между началом заболевания и появлением офтальмологических симптомов варьирует от нескольких дней до двух недель. Симптомы включают в себя нарушение эпителиального ретинального пигмента, локализованное поражение сетчатки и утолщение эпителия, макулярные и ретинальные кровотечения, перипапиллярное кровотечение, пятно Рота, диффузный отек сетчатки, гиалоциты, помутнение края диска зрительного нерва, серозное отслоение сетчатки, отек сосудистой оболочки, неспецифическую макулопатию. Прогноз для зрения варьирует в зависимости от степени ма-

кулярного поражения. Офтальмологические проявления, связанные с лихорадкой денге как с основным заболеванием, считаются скорее иммуно-опосредованным процессом, чем прямой вирусной инфекцией с интервалом, соответствующим времени начала производства антител, депонирования иммунных комплексов или синтеза аутоантител.

### **Диагностика и профилактика заболеваний глаз, вызванных вирусом денге**

Выделение вируса в чистом виде и определение вирусных геномов с помощью ПЦР в реальном времени имеют равную чувствительность при определении вируса денге в крови, взятой во время острой фазы заболевания. В большинстве случаев в течение семи дней от начала заболевания при помощи иммуноферментного анализа или при помощи дот-блот-наборов могут быть обнаружены специфичные IgM.

Обязательно проводить наблюдение за основными показателями жизнедеятельности и водно-солевого баланса больных с геморрагическим шоком денге. Живые аттенуированные вакцины денге находятся на стадии апробации.

### **ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА**

Вирус лихорадки Западного Нила (West Nile virus, WNV) сохраняется в энзоотическом цикле; природными носителями вируса являются птицы, вирус передается людям и прочим позвоночным при укусе инфицированного комара рода *Culex*. Вирус лихорадки Западного Нила был выделен в чистом виде в Уганде в районе Западного Нила в 1937 г. Он близок вирусам, вызывающим энцефалит и эндемичным для Европы, Австралии, Азии и Африки. Вирус впервые обнаружен в США во время вспышки в Нью-Йорке в 1999 г. и впоследствии распространился по всей стране. Клинические проявления инфекции: острое начало лихорадки с миалгией, артралгией, головной болью, конъюнктивитом и лимфоаденопатией. В некоторых случаях появляется макулопапулезная или розеолезная сыпь. Иногда вирус лихорадки Западного Нила может быть причиной менингита или энцефалита.

### **Глазные инфекции, вызванные вирусом лихорадки Западного Нила**

Недавно опубликовано сообщение о появлении офтальмологических симптомов после инфекции, вызванной WNV [52–54], хотя точная частота случаев поражения глаз неизвестна. Офтальмологические симптомы включают боль, светобоязнь, гиперемию конъюнктивы, ретробульбарную боль и нарушение фокусировки зрения. Характерный многоочаговый хориоретинит наблюдается у большинства пациентов в сочетании с негранулематозным передним увеитом и клеточной инфильтрацией стекловидного тела.

Хориоретинальные поражения наиболее часто располагаются на периферии сетчатки хаотично или в линейном порядке, следуя в на-

правлении хориоидальных кровеносных сосудов либо, реже, в заднем полюсе сетчатки. Другие поражения включают интравитреальные кровотечения, отек диска зрительного нерва и, менее часто, очаговые поражения сосудов сетчатки. Патогенез хориоретинальных поражений неизвестен, но может возникать путем распространения по сосудам в сетчатке. Многоочаговый гранулематозный хориоретинит, наблюдавшийся при синдроме гистоплазмоза глаз, очевидно, предполагает развитие синдрома гистоплазмоза и идиопатического мультиочагового хориоидита. У большинства пациентов заболевание проходит без лечения и без осложнений в течение нескольких месяцев.

### **Диагностика и профилактика инфекций, вызванных вирусом лихорадки Западного Нила**

Наиболее широко используется метод ИФА с захватом, позволяющий проводить выявление IgM к вирусу. Этот метод может быть подтвержден реакцией подавления бляшкообразования.

## **ВИРУС ГЕПАТИТА С**

Вирус гепатита С (HCV) — небольшой оболочечный РНК-вирус, самая распространенная причина хронического вирусного гепатита. Примерно 20–40% случаев острого вирусного гепатита в США не относятся к типу А или В; большинство из них вызваны гепатитом С. Из всех вирусов гепатита гепатит С приводит к наиболее обширному поражению печени больных без нарушений иммунной системы. Это происходит из-за цитотоксичности в отношении гепатоцитов, что может привести к циррозу, фульминантному гепатиту и гепатокарциноме. Хотя печень — это главный орган-мишень вируса, инфицирование человека HCV приводит к активации аутоиммунных механизмов и нарушению функции различных органов.

### **Заболевания глаз, вызванные гепатитом С**

Вирусные инфекции, такие как гепатит С, наряду с EBV, лимфотропным Т-клеточным вирусом человека типа I (HTLV-I) и ВИЧ, были ассоциированы с развитием синдрома, похожего на синдром Шегрена как у животных в экспериментальных моделях, так и у людей. Эта вирусная инфекция может способствовать хроническому аутоиммунному нарушению слезных и слюнных желез; присутствие активного вируса, персистирующего в железах, не очевидно [55]. Предположительно, существует возможная патогенетическая связь между язвой Мурена — рецидивирующим кератитом и хроническим гепатитом С [56]. Язва Мурена представляет собой хроническое прогрессирующее болезненное изъязвление периферийной стромы роговицы и эпителия. Глаз воспален, и боль может быть интенсивной с фотофобией и слезотечением. При небольшой травме может произойти перфорация. Хотя этиология этого периферического язвенного кератита неиз-

вестна, в настоящее время собираются доказательства того, что ключевую роль играет аутоиммунная реакция. Периферическая роговица имеет четко выраженные морфологические и иммунологические характеристики, которые провоцируют воспалительные реакции и образование иммунных комплексов. У некоторых пациентов присутствует скрытая инфекция хронического гепатита С, хотя большинство случаев являются идиопатическими. Другие формы офтальмологических повреждений у пациентов с хроническим гепатитом С включают эписклерит, ретинопатию и ретинальный васкулит. РНК вируса гепатита С была обнаружена во внутриглазной жидкости и слезах.

### **Диагностика и профилактика вирусных заболеваний, вызванных гепатитом С**

Чувствительный иммуноферментный анализ может обнаружить и количественно определить общий ядерный антиген HCV в анти-HCV-положительной и анти-HCV-отрицательной сыворотке. Разработаны ПЦР-методы для определения РНК HCV и генотипирования вируса гепатита С.

### **ВИРУС КРАСНУХИ**

Вирус коревой краснухи окружен липидной оболочкой, или «тогой» и это обусловило его включение в семейство Тогавирусов. Он был впервые выделен в чистом виде от солдат в 1962 г. Краснуха (немецкая корь) обычно проявляется как сыпь с легким фебрилитетом, но при инфицировании беременных женщин она может вызвать большие врожденные пороки развития. Люди являются единственными природными носителями. До введения вакцины против краснухи в 1969 г. эпидемия возникла в США с интервалами в 6–9 лет, преимущественно у детей. Краснуха в настоящее время практически исчезла из США, хотя иногда происходили вспышки, прежде всего среди молодежи. Приобретенная краснушная инфекция проявляется неспецифическими признаками недомогания и лихорадки у подростков и взрослых с последующим появлением краснушной сыпи. Краснуха является умеренно инфекционной и, вероятнее всего, передается аэрозолитованными частицами при выделении из дыхательных путей. Эритематозная макулопапулезная сыпь появляется сначала на лице, переходит на руки и ноги и покрывает все тело в течение 24 ч и исчезает на третий день. Как только вирус попадает в кровоток, он может распространяться на кожу и дистальные органы или трансплацентарно на развивающийся плод.

### **Заболевания глаз, связанные с вирусом краснухи**

Офтальмологические проявления приобретенной краснушной инфекции включают в себя неосложненный фолликулярный конъюнктивит, эпителиальный кератит и ретинит. Краснушный ретинит прояв-

ляется резким ухудшением зрения и многоочаговым хориоретинитом, большими областями буллезного нейросенсорного отслоения, отслоения подлежащего пигментного эпителия, включая весь задний полюс хрусталика, переднюю камеру и преретинальные гиалциты и темно-серые атрофические поражения ретинального пигментного эпителия. В последнее время хроническая вирусная инфекция краснухи была включена в патогенез гетерохромного иридоциклита Фукса, что доказывается детекцией выработки специфических интраокулярных краснушных антител и интраокулярной персистенцией вируса [57].

### **Врожденные заболевания, вызванные вирусом краснухи**

Связь между краснухой у матери и врожденными дефектами новорожденных была описана офтальмологами в 1941 г. У 25% женщин детородного возраста отсутствуют антитела к краснухе, и они подвержены первичной инфекции. Краснуха — тератогенный вирус, так как плод инфицируется вирусом краснухи трансплацентарно при виремии матери в ходе первичной инфекции. Доказанная материнская инфекция во время первого триместра беременности может закончиться спонтанным абортom, мертворождением или тяжелыми врожденными пороками плода, при этом бессимптомная краснуха у матери может также привести к заболеванию плода. Частота плодной инфекции наиболее высока в течение первых 10 недель и в течение последнего месяца беременности. Вероятность развития врожденных дефектов обратно пропорциональна срокам беременности. Классические признаки синдрома врожденной краснухи (СВК) включают пороки сердца (незаращение Боталлового протока, дефекты межжелудочковой перегородки и стеноз клапана легочной артерии), офтальмологические проявления (хориоретинит, катаракта, помутнение роговицы, микрофтальмия, страбизм и глаукома) и глухоту.

### **Заболевания глаз, вызванные врожденной краснухой**

Глазные проявления СВК могут быть ранними или поздними [58, 59]. Кратковременные ранние офтальмологические проявления СВК включают в себя генерализованное помутнение роговицы, которое может проходить в течение нескольких недель. Постоянные или прогрессирующие проявления СВК включают ретинопатию «перец с солью» и катаракту. Ретинопатия возникает у половины младенцев с симптоматической инфекцией и обычно является односторонней. Глазное дно, как бы посыпанное солью и перцем, бывает разным, варьируя от испещренных мелкими точками остроконечных, маленьких черных неравномерных образований до грубых пигментарных нарушений с крупнодисперсными неравномерными вкраплениями. Катаракты возникают почти у одной трети младенцев с ретинопатией; они двусторонние у примерно 50% заболевших младенцев и связаны с микрофтальмией примерно у 60% детей. Поздние проявления офтальмологических симптомов врожденной краснухи могут не опреде-

ляться до двух лет или более после рождения [10]. Глаукома, а также дефекты роговицы и хрусталика могут появляться не сразу. Ретиальная неоваскуляризация, связанная с врожденной ретиальной васкулярной атонией, может привести к нарушениям зрения.

Постоянные офтальмологические проявления СВК проявляются в прогрессирующем нарушении зрения от сильной миопии (близорукость), особенно у детей с ретинопатией, у которых развивается прогрессирующее макулезное рубцевание. Вирус краснухи может продолжать существовать у плода и новорожденного и может выделяться месяцами или годами после рождения; вирус может быть выделен в чистом виде из содержимого хрусталика при операции по удалению катаракты.

### **Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом краснухи**

Наличие приобретенной краснухи может быть подтверждено детекцией вируса при помощи ПЦР или по сероконверсии в ответ на антигены краснухи [60]. Выделение вируса часто бывает сложным, потому что вирус краснухи не вызывает цитопатического действия на клеточные линии, обычно используемые в диагностических лабораториях. Серологические критерии инфекции краснухи включают в себя четырехкратное увеличение специфических иммуноглобулинов G краснухи в парной сыворотке в течение одной-двух недель отдельно или новое появление специфических IgG краснухи. Диагностика СВК подтверждается обнаруженными характерными изменениями роговицы, объединенными системными нарушениями и историями болезней матерей, заразившихся краснухой. Так как у плода может развиться иммунный ответ на вирус краснухи, специфические антитела IgM и IgA к вирусу краснухи в пуповинной крови подтверждают диагноз.

Повышенный уровень антител IgM может вернуться к недиагностируемому уровню заболевания через 3–6 мес., а присутствие антител IgG после этого периода может также помочь в диагностике неонатальной инфекции. В отличие от приобретенной инфекции вирус краснухи может быть выделен в течение более чем одного года из носоглотки, лейкоцитарной пленки крови, спинномозговой жидкости и мочи младенцев с врожденной инфекцией. Дифференциальный диагноз врожденного краснушного ретинита состоит из этих заболеваний, составляющих TORCH-синдром (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирусная болезнь, вирус герпеса, включая EBV и сифилис).

Программы по иммунизации от краснухи в США включают в себя две стратегии: всеобщую иммунизацию младенцев и целевую вакцинацию восприимчивых девочек пубертатного периода и женщин детородного возраста. СВК все еще возникает в тех районах мира, где нет профилактических программ вакцинации от краснухи.

## ВИРУС ЧИКУНГУНЯ

Вирус Чикунгунья распространяется через укус инфицированных комаров рода *Aedes*, преимущественно *Aedes aegypti*. Молекулярная характеристика позволила обнаружить две отдельные линии штаммов, которые вызывали эпидемии в Африке и Азии. Лихорадка Чикунгунья является «новым» вирусным заболеванием с недавней эпидемией в Индии после длительного латентного периода [61]. Лихорадка Чикунгунья характеризуется внезапным повышением температуры, головной болью, усталостью, тошнотой, рвотой, болями в мышцах, сыпью, острой артралгией, продолжающимися от одного до семи дней. Системные проявления могут быть связаны с вирусемией, а вовлечение суставов может быть опосредовано иммунной реакцией на вирусные антигены. Болезнь, как правило, проходит без лечения и редко заканчивается смертельным исходом, хотя процесс может иметь тяжелое изнурительное течение.

### Заболевания глаз, вызванные вирусом Чикунгунья

Самыми распространенными глазными проявлениями, связанными с лихорадкой Чикунгунья, являются иридоциклит и ретинит, обычно имеющие доброкачественное клиническое течение [62]. Ретинит Чикунгунья возникает через несколько недель после первичного заболевания. Менее частые поражения глаз — эписклерит и воспаление зрительного нерва [63]. Неврит зрительного нерва может быть ретробульбарным, ретрохиазмическим или с вовлечением диска зрительного нерва (папиллит) или нервных волокон (нейроретинит). Обычно происходит частичное или полное восстановление.

### Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом Чикунгунья

Лихорадку Чикунгунья клинически трудно отличить от лихорадки денге, однако корреляция с результатами серологических анализов (IgM-антитела) и подсчета тромбоцитов может дифференцировать эти заболевания.



## ВИРУС БЕШЕНСТВА

Вирус бешенства — нейротрофический вирус, который передается из слюны или нервной ткани зараженных животных. Бешенство имеет распространение во всем мире, но редко встречается в США. В Северной Америке основным резервуаром инфекции служат несколько видов диких животных, так как большинство домашних животных вакцинировано. Вирус может проникать через поврежденную кожу или слизистые оболочки. Инкубационный период составляет от 9 до 90 дней. Затем вирус попадает в нервно-мышечные соединения, проникая в центральную и периферическую нервную систему. Симптомы бешенства включают боль и зуд в области раны, а затем



головную боль, лихорадку, рвоту и потерю аппетита. Тревожное или возбужденное состояние проявляется со спастическими сокращениями мышц при попытке проглотить что-либо. Судороги и параличи являются общими проявлениями. Бешенство почти всегда заканчивается смертельным исходом, если уже началось проявление симптомов заболевания.

### **Заболевание глаз, вызванное вирусом бешенства**

Глазные симптомы включают светобоязнь, снижение роговичного рефлекса, нарушения со стороны зрачков, отек диска, кровоизлияния в сетчатку, паралич глазных мышц. Вирус бешенства может передаваться при пересадке роговицы [64].

### **Диагностика и профилактика бешенства**

Жидкости, такие как слюна или СМЖ, либо клетки тканей ЦНС можно культивировать. Может быть измерен уровень нейтрализующих антител к вирусу бешенства. Вирус бешенства может быть обнаружен в коже или других тканях многими методами, включая ПЦР. Результаты биопсии и цитологического отпечатка роговицы могут быть полезны при ранней диагностике бешенства [65].

Подозреваемые на инфицирование животные должны быть пойманы и помещены в карантин. При подозрении на бешенство животное должно быть умерщвлено и образец ткани мозга должен быть исследован на вирус бешенства или тельца Негри (цитоплазматические зоинофильные включения в клетках гиппокампа). При укусах животных рану следует промыть большим количеством воды с мылом с последующей обработкой перекисью водорода или настойкой йода. Должна быть проведена также профилактика столбняка. Бешенство можно предотвратить с помощью введения иммуноглобулина и вакцины против бешенства.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. El-Sayed Zaki M, Abd-El Fatah GA. Rapid detection of oculopathogenic adenovirus in conjunctivitis. *Curr Microbiol* 2008; 56(2):105–109.
2. Sambursky R, Tauber S, Shirra F, et al. The RPS adeno detector for diagnosing adenoviral conjunctivitis. *Ophthalmology* 2006; 113(10):1758–1764.
3. Wiley LA, Roba LA, Kowalski RP, et al. A 5-year evaluation of the adeno-clone test for the rapid diagnosis of adenovirus from conjunctival swabs. *Cornea* 1996; 15(4):363–367.
4. Koidl C, Bozic M, Mossbock G, et al. Rapid diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by a fully automated molecular assay. *Ophthalmology* 2005; 112(9):1521–1528.
5. Elnifro, E. M, Cooper RJ, Klapper, PE, et al. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(7):1818–1822.

6. Gottsch JD, Froggatt JW, Smith DM, et al. Prevention and control of epidemic keratoconjunctivitis in a teaching eye institute. *Ophthalmic Epidemiol* 1999; 6(1):29-39.
7. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 2001; 20(1):1-13.
8. Hodge WG, Margolis TP. Herpes simplex virus keratitis among patients who are positive or negative for human immunodeficiency virus: an epidemiologic study. *Ophthalmology* 1997; 104(1):120-124.
9. Streilein JW, Dana MR, Ksander BR. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today* 1997; 18(9):443-449.
10. Arnold JJ, McIntosh ED, Martin EJ, et al. A fifty-year follow-up of ocular defects in congenital rubella: late ocular manifestations. *Aust N Z J Ophthalmol* 1994; 22(1):1-6.
11. Walters G, James TE. Viral causes of the acute retinal necrosis syndrome. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12(3):191-195.
12. Farhatullah S, Kaza S, Athmanathan S, et al. Diagnosis of herpes simplex virus-1 keratitis using Giemsa stain, immunofluorescence assay, and polymerase chain reaction assay on corneal scrapings. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(1):142-144.
13. El-Aal AM, El Sayed M, Mohammed E, et al. Evaluation of herpes simplex detection in corneal scrapings by three molecular methods. *Curr Microbiol* 2006; 52(5):379-382.
14. Herpetic Eye Disease Study Group. Acyclovir for the prevention of recurrent herpes simplex virus eye disease. *N Engl J Med* 1998; 339(5):300-306.
15. Liesegang TJ. The Varicella-Zoster Virus Diseases. *Contemp Ophthalmol* 2006; 5:1-7.
16. Liesegang TJ. Herpes zoster ophthalmicus natural history, risk factors, clinical presentation, and morbidity. *Ophthalmology* 2008; 115 (suppl 2):S3-S12.
17. Liesegang TJ. Herpes zoster virus infection. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15(6):531-536.
18. Ganatra JB, Chandler D, Santos C, et al. Viral causes of the acute retinal necrosis syndrome. *Am J Ophthalmol* 2000; 129(2):166-172.
19. Holland GN. Standard diagnostic criteria for the acute retinal necrosis syndrome. Executive Committee of the American Uveitis Society. *Am J Ophthalmol* 1994; 117(5):663-667.
20. Engstrom RE Jr., Holland GN, Margolis TP, et al. The progressive outer retinal necrosis syndrome. A variant of necrotizing herpetic retinopathy in patients with AIDS. *Ophthalmology* 1994; 101(9):1488-1502.
21. Weidmann M, Meyer-Konig U, Hufert FT. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1565-1568.
22. Davis JL, Feuer W, Culbertson WW, et al. Interpretation of intraocular and serum antibody levels in necrotizing retinitis. *Retina* 1995; 15(3):233-240.
23. Chodosh J. Epstein-Barr virus stromal keratitis. *Ophthalmol Clin North Am* 1994; 7:549-556.
24. Matoba AY. Ocular disease associated with Epstein-Barr virus infection. *Surv Ophthalmol* 1990; 35(2):145-150.
25. Pitetti RD, Laus S, Wadowsky RM. Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(8):736-739.

26. Chodosh J, Gan YJ, Sixbey JW. Detection of Epstein-Barr virus genome in ocular tissues. *Ophthalmology* 1996; 103(4):687-690.
27. Coats DK, Demmler GJ, Paysse EA, et al. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS* 2000; 4(2):110-116.
28. Jabs DA, Van Nattan NL, Kempen JH, et al. Characteristics of patients with cytomegalovirus retinitis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Am J Ophthalmol* 2002; 133(1):48-61.
29. Hodge WG, Boivin JF, Shapiro SH, et al. Clinical risk factors for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Ophthalmology* 2004; 111(7):1326-1333.
30. Hoover DR, Peng Y, Saah, A, et al. Occurrence of cytomegalovirus retinitis after human immunodeficiency virus immunosuppression. *Arch Ophthalmol* 1996; 114(7):821-827.
31. Sjo NC, Heegaard S, Prause JU, et al. Human papillomavirus in conjunctival papilloma. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(7):785-787.
32. Shields CL, Shields JA. Tumors of the conjunctiva and cornea. *Surv Ophthalmol* 2004; 49 (1):3-24.
33. Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, et al. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1997; 81(4):308-313.
34. Neff JM, Lane JM, Fulginiti VA, et al. Contact vaccinia-transmission of vaccinia from smallpox vaccination. *IAMA* 2002; 288(15):1901-195.
35. Semba RD. The ocular complications of smallpox and smallpox immunization. *Arch Ophthalmol* 2003; 121(5):715-719.
36. Fillmore GL, Ward TP, Bower KS, et al. Ocular complications in the Department of Defense Smallpox Vaccination Program. *Ophthalmology* 2004; 111(11):2086-2093.
37. Charteris DG, Bonshek RE, Tullo AB. Ophthalmic molluscum contagiosum: clinical and immunopathological features. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(5):476-481.
38. Charles NC, Friedberg DN. Epibulbar molluscum contagiosum in acquired immune deficiency syndrome. Case report and review of the literature. *Ophthalmology* 1992; 99(7):1123-1126.
39. Riffenburgh RS. Ocular manifestations of mumps. *Arch Ophthalmol* 1961; 66:739-743.
40. Foster RE, Lowder CY, Meisler DM, et al. Mumps neuroretinitis in an adolescent. *Am J Ophthalmol* 1990; 110 (1):91-93.
41. Kayikcioglu O, et al. Ocular findings in a measles epidemic among young adults. *Ocul Immunol Inflamm* 2000; 8(1):59-62.
42. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001; 79(3):214-221.
43. Holland GN. AIDS and ophthalmology: the first quarter century. *Am J Ophthalmol* 2008; 145(3): 397-408.
44. Belfort R Jr. The ophthalmologist and the global impact of the AIDS epidemic LV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 2000; 129 (1):1-8.
45. Cunningham ET Jr., Margolis TP. Ocular manifestations of HIV infection. *N Engl J Med* 1998; 339(4):236-244.

46. Jeng BH, Holland GN, Lowder CY, et al. Anterior segment and external ocular disorders associated with human immunodeficiency virus disease. *Surv Ophthalmol* 2007; 52(4):329–368.
47. Vrabec TR. Posterior segment manifestations of HIV/AIDS. *Surv Ophthalmol* 2004; 49(2):131–157.
48. Wairagkar NS, Gogate SS, Labhsetwar AS. Investigation of an epidemic of acute haemorrhagic conjunctivitis in Pune, India. *J Commun Dis* 1999; 31(1):41–43.
49. Kono R. Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: a pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. *Am J Epidemiol* 1975; 101(5):383–390.
50. Park SW, Lee CS, Jang HC, et al. Rapid identification of the coxsackievirus A24 variant by molecular serotyping in an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(3):1069–1071.
51. Lim WK, Mathur R, Koh A, et al. Ocular manifestations of dengue fever. *Ophthalmology* 2004; 111(11):2057–2064.
52. Garg S, Jampol LM. Systemic and intraocular manifestations of West Nile virus infection. *Surv Ophthalmol* 2005; 50(1):3–13.
53. Chan CK, Limstrom SA, Tarasewicz DG, et al. Ocular features of west nile virus infection in North America: a study of 14 eyes. *Ophthalmology* 2006; 113(9): 1539–1546.
54. Priestley Y, Koevary S. Systemic and ophthalmic manifestations of West Nile Virus infection. *Expert Rev Ophthalmol* 2008; 3(3):279–292.
55. Jacobi C, Wenkel H, Jacobi A, et al. Hepatitis C and ocular surface disease. *Am J Ophthalmol* 2007; 144(5):705–711.
56. Wilson SE, Lee WM, Murakami C, et al. Mooren's corneal ulcers and hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 329(1):62.
57. Quentin CD, Reiber H. Fuchs heterochromic cyclitis: rubella virus antibodies and genome in aqueous humor. *Am J Ophthalmol* 2004; 138 (1):46–54.
58. Givens KT, Lee DA, Jones T, et al. Congenital rubella syndrome: ophthalmic manifestations and associated systemic disorders. *Br J Ophthalmol* 1993; 77(6):358–363.
59. Wolff SM. The ocular manifestations of congenital rubella. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1972; 70:577–614.
60. Rajasundari TA, Sundaresan P, Vijaylakshmi P, et al. Laboratory confirmation of congenital rubella syndrome in infants: an eye hospital based investigation. *J Med Virol* 2008; 80(3):536–546.
61. Chhabra M, Mittal V, Bhattacharya D, et al. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(1):5–12.
62. Mahendradas P, Ranganna SK, Shetty R, et al. Ocular manifestations associated with chikungunya. *Ophthalmology* 2008; 115(2):287–291.
63. Mittal A, Mittal S, Bharati MJ, et al. Optic neuritis associated with chikungunya virus infection in South India. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(10):1381–1386.
64. Gode GR, Bhide NK. Two rabies deaths after corneal grafts from one donor. *Lancet* 1988; 2(8614):791.
65. Zaidman GW, Billingsley A. Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis. *Ophthalmology* 1998; 105(2):249–251.

М. Нидриг, А. Ницше, О. Доносо-Мантке

Matthias Niedrig, Andreas Nitsche, and Oliver Donoso-Mantke,  
Robert Koch-Institut, Berlin, Germany

Вирусы, переносимые членистоногими (*arthropode-borne viruses*, арбовирусы) представляют собой достаточно большую и гетерогенную совокупность различных семейств вирусов, таких как тогавирусы *Togaviridae*, флавивирусы *Flaviviridae*, буньявирусы *Bunyaviridae*, реовирусы *Reoviridae*, рабдовирусы *Rhabdoviridae* и ортомиксовирусы *Orthomyxoviridae*.

Более сотни вирусов в настоящее время классифицированы как арбовирусы, из них наиболее хорошо изучены тогавирусы и флавивирусы [1]. Все эти вирусы обладают общей характеристикой: они переносятся комарами, клещами или москитами *Phlebotomus*. Поскольку частые случаи укусов и возможность передачи этих вирусов переносчиками-членистоногими могут вызывать острую клиническую и субклиническую инфекцию человека, очень важной становится быстрая и надежная диагностика вирусной инфекции.

Чтобы показать современное состояние дел по этой проблеме, в данной главе описаны основные возбудители, представляющие проблему для здравоохранения.

Арбовирусы включают флавивирусы: вирус денге (*DENV*), вирус желтой лихорадки (*YFV*), вирус клещевого энцефалита (*TBEV*) и вирус лихорадки Западного Нила (*WNV*) и буньявирусы: альфавирус — вирус Чикунгунья (*CHIKV*), вирус папатачи (или вирус флеботомной лихорадки, *sandfly virus*, *SFV*), вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки (*CCHFV*) и вирус лихорадки долины Рифт (*Rift Valley Fever*, *RVF*).

Диагностическое исследование на арбовирусы главным образом ограничено теми больными, которые, как предполагается, могут быть инфицированы при укусах насекомых. Например, *DENV*, у которого в настоящее время обнаружено четыре серотипа, распространен по земному шару практически во всех субтропических зонах и стал самой большой международной проблемой здравоохранения в последние годы, группу риска составляют почти 2,5 млрд людей [2]. Клинические признаки лихорадки денге связаны с возрастом больного и штаммом вируса, варьируют от умеренной лихорадки до геморрагической лихорадки денге (*DHF*) с тяжелыми осложнениями и потенциальным смертельным исходом или шоковым синдромом денге (*DSS*), который характеризуется развитием признаков резкого нарушения кровообращения. При развитии *DSS* без соответствующего лечения больные могут умереть в течение 12–24 ч. В зависимости от тяжести инфекции для подтверждения клинического диагноза могут быть использованы различные методы лабораторной диагностики.

При острой инфекции выявление возбудителя предоставляет единственную возможность успешной диагностики. Диагностика может

быть проведена ограниченным количеством диагностических методов, основанных на детекции вирусспецифичных белков или вирусного генома (рис. 26.1) Для обнаружения вирусных частиц методом электронной микроскопии вирусная нагрузка должна составлять  $10^6$ /мл, что сильно зависит от особенностей вируса, течения инфекции и времени взятия пробы. В табл. 26.1 приведен краткий обзор чувствительности и специфичности различных диагностических методов. Приблизительное время, необходимое для диагностики, также важно для практического применения у больных с острой инфекцией.

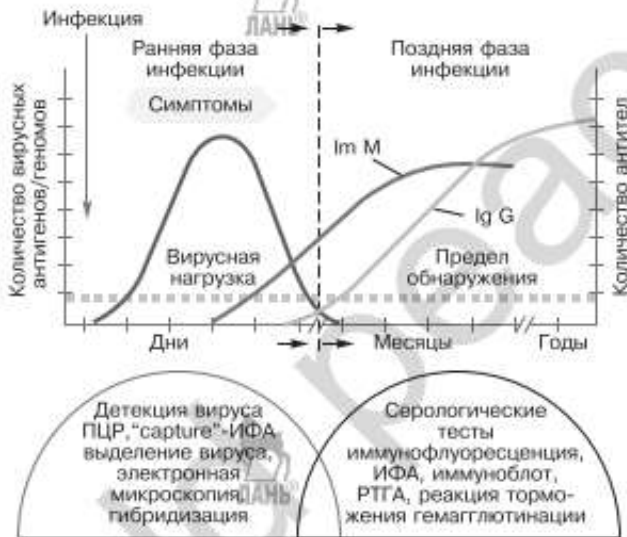


Рис. 26.1 (см. цветную вклейку). Схема диагностики вирусных инфекций

Из-за низкого коммерческого интереса для большинства флави-вирусов не существует методов анализа на основе определения специфических белков, и такие методы используются только в исследовательских целях (табл. 26.2). Некоторые методы могут включать иммуногистохимическое окрашивание образцов тканей при помощи моноклональных антител против предполагаемого вируса [2]. Другие методы применяют для детекции вирусного антигена, например иммуноферментный анализ (ИФА), но они не очень распространены и не слишком чувствительны. В последние несколько лет ведущим методом диагностики арбовирусных инфекций становится определение специфических последовательностей вирусных РНК и ДНК с помощью ПЦР. В целом ПЦР — быстрый метод, позволяющий проводить детекцию при низкой вирусной нагрузке и обеспечивающий исследователя и клинициста генетическим материалом для дальнейшей характеристики возбудителя (например, путем секвенирования). С другой стороны, требование высокой специфичности, обусловленное

Таблица 26.1

## Основные характеристики различных диагностических методов

	Время диагностики	Чувствительность	Специфичность
Детекция вируса			
Выделение вируса	1–7 сут.	Высокая <sup>а</sup>	Высокая <sup>б</sup>
Гибридизация	3–4 ч	Высокая <sup>а</sup>	Хорошая
ПЦР	2–4 ч	Высокая <sup>а</sup>	Высокая
Пиросеквенирование	1 ч	Высокая <sup>а</sup>	Высокая
Электронная микроскопия	30 мин	Низкая <sup>а</sup>	Высокая <sup>а</sup>
ИФА с захватом	3–5 ч	Хорошая <sup>а</sup>	Высокая
Серология		ЛАНЬ <sup>а</sup>	
ИФА	3–4 ч	Высокая	Низкая
Иммунофлуоресценция	2–4 ч	Хорошая	Хорошая
Иммуноблоттинг	2–4 ч	Хорошая	Хорошая
Нейтрализация	4–7 сут.	Хорошая	Высокая
РТГА	2–4 ч	Низкая	Хорошая

<sup>а</sup> Зависит от системы культивирования.  
<sup>б</sup> Зависит от системы детекции.  
<sup>а</sup> 10<sup>4</sup> частиц/мл.  
<sup>а</sup> 200 геномных экв./мл.  
<sup>а</sup> Требуется ПЦР.  
<sup>а</sup> Не менее 10<sup>5</sup> частиц/мл.  
<sup>а</sup> Детекция семейства вирусов.  
<sup>а</sup> 0,01 мкг антигена

точным соотношением пар оснований праймера и матрицы, может привести к ложноотрицательным результатам даже при небольших изменениях целевой последовательности. Поскольку флавивirusы склонны к частым абберациям в последовательностях, условия проведения и праймеры для ПЦР должны подбираться очень тщательно. Наконец, должны быть получены точные знания о целевой последовательности вируса, что достаточно сложно для флавивirusов. Тем не менее почти все недавно описанные случаи острых вирусных геморрагических лихорадок, которые были завезены в страны западного мира, были диагностированы с помощью ПЦР до того, как вирус был успешно культивирован.

Культивирование вируса в подходящей культуре клеток дает дополнительную возможность для его детекции в острой фазе болезни. Процесс культивирования трудоемок и может занять до семи дней в зависимости от чувствительности клеток к вирусу и перmissивности культуры, а также количества вирусов в сыворотке больного. Но культивирование позволяет идентифицировать образцы, если обнаруживается типичный цитопатический эффект. Поскольку практи-

чески все эти вирусы, кроме SFV, высокопатогенны и манипуляции с ними должны проводиться в лабораториях 3 и 4 класса биологической защиты (BSL-3, BSL-4) культивирование вируса ограничено несколькими хорошо оборудованными лабораториями с высококвалифицированными сотрудниками.

Для диагностики инфекции денге в ранней фазе доступны наборы для быстрого анализа. Эти методы непрямого выявления вируса основаны на идентификации специфических IgM из крови или сыворотки

Таблица 26.2

Методы диагностики арбовирусных инфекций в пробах от больных или из окружающей среды

Вирусный возбудитель	Диагностика		
	Острая/ранняя фаза	Острая/поздняя фаза	Фаза выздоровления
Вирус денге 1-4	ПЦР <sup>a</sup> , ВВ <sup>b</sup> , ИГХ, ИФА <sup>a</sup> (тест-система NS-1)	ИФА <sup>a</sup> IgM; НФЛА <sup>a</sup> РТГА, быстрые тесты	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM/IgG НФЛА <sup>a</sup>
Вирус желтой лихорадки	ПЦР <sup>b</sup> , ВВ <sup>b</sup> , ИГХ	IgM ИФА, НФЛА <sup>a</sup>	IgM/IgG ИФА, IgM/IgG НФЛА <sup>a</sup>
Вирус лихорадки Западного Нила	ПЦР <sup>a,b</sup> , ВВ <sup>b</sup> , ИГХ	IgM ИФА <sup>a</sup> , IgM НФЛА <sup>a</sup> , РТГА	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM/IgG НФЛА <sup>a</sup> , РТГА
Вирус клещевого энцефалита	ПЦР <sup>b</sup> , ВВ <sup>b</sup> , ИГХ	IgM ИФА <sup>a</sup> , НФЛА <sup>a</sup> , ИГХ	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM/IgG НФА <sup>a</sup> ИГХ
Вирус Чикунгунья	ПЦР <sup>b</sup> , ВВ <sup>b</sup> , ИГХ	IgM/IgG ИФА, IgM НФЛА <sup>a</sup> , РТГА	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , РТГА
Вирус паппатачи	ПЦР <sup>a,b</sup> , ВВ <sup>b</sup>	ИБ <sup>a</sup> , IgM НФЛА <sup>a</sup>	ИБ <sup>a</sup> , IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM/IgG НФЛА
Вирус Конго-Крымской лихорадки	ПЦР <sup>b</sup> , ВВ <sup>b</sup>	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM НФЛА	IgM/IgG ИФА, IgG НФЛА
Вирус лихорадки долины Рифт	ПЦР <sup>b</sup> , ВВ <sup>b</sup>	IgM/IgG ИФА <sup>a</sup> , IgM НФЛА, РТГА, ингибирование ферментного иммуноанализа	IgM/IgG ИФА, IgG НФЛА, РТГА

<sup>a</sup> Доступные тест-системы.

<sup>b</sup> Методы полезны для анализа окружающей среды или переносчиков (комаров, клещей, москитов *Phlebotomus*).

**Сокращения:** ВВ — выделение вируса в культуре, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ИГХ — иммуногистохимический анализ образцов ткани; ИФА — иммуноферментный анализ для выявления IgG и IgM; НФЛА — непрямоиммунофлуоресцентный анализ, РТГА — реакция торможения гематглютинации, ИБ — иммуноблот



в блот-стрипах, на которые нанесены специфические белки вируса денге и контрольные антитела. Окрашивание соответствующих полос, включая контроль, позволяет определить наличие IgM. Тем не менее эти быстрые тесты, которые доступны в различных форматах и производятся различными компаниями, как и другие серологические тесты, имеют свои «за» и «против». Несмотря на быстроту и простоту постановки, не требующую специально обученного персонала, частота ложноположительных результатов, вызванных неспецифическими реакциями, по-видимому, выше, а чувствительность этих методов ниже, чем у других тест-систем.

Было предпринято много попыток анализа специфического иммунного ответа на вирусы денге серотипов 1–4 при помощи серологических методов. Одна из серьезных причин такого внимания к данной проблеме — риск острой лихорадки денге, вызванной вторичным инфицированием другим серотипом вируса. В основе этого лежит механизм, получивший название «антителозависимого усиления» [2]. К сожалению, все попытки подобрать селективные серотип-специфические эпитопы и разработать моноклональные антитела, специфические для рекомбинантных экспрессирующихся белков или пептидов, были неудачными [6]. Причина этих затруднений помимо высокой гомологии в последовательности E-белка флавивирусов может заключаться в конформационной изменчивости этих эпитопов, которые не могут быть воспроизведены короткими рекомбинантными белками или пептидами.

Для различения четырех серотипов вирусов денге, таким образом, пригодна только реакция торможения гемагглютинации (РТГА), но и этот метод не предлагает рутинного использования с учетом затрат времени и трудоемкости его осуществления. Показано также, что ИФА на IgG и метод ингибирования гемагглютинации менее чувствительны по сравнению с РТГА при низком уровне антител [7]. Обычно для диагностики лихорадки денге проводят серологическое исследование с помощью ИФА или ингибирования гемагглютинации, но эти тесты редко используются для диагностики в ранней фазе заболевания. Кроме того, антитела против вируса денге перекрестно реагируют с другими флавивирусами. Недавно был сделан вывод о том, что определение антигена NS-1 вируса денге полезно для ранней диагностики инфекции и после проявления лихорадки служит альтернативой ПЦР [5, 8]. ПЦР в реальном времени также становится все более важным инструментом ранней детекции генома вируса денге в образцах сыворотки человека [9–12]. В настоящее время разрабатываются методы на основе генно-инженерного вируса денге, позволяющие определять вирусы всех четырех серотипов. Разрабатываются также методы детекции отдельных серотипов вируса денге и методы, разделяющие разные серотипы при помощи специфических праймеров и зондов. Недавно проведены перспективные исследования по генно-инженерной амплификации всех четырех серотипов с последующим секвенирующим типированием при помощи пиросеквенатора.

Пиросеквенирование — метод, при котором ферментативно присоединяются нуклеотиды, добавляемые по отдельности комплементарно последовательностям цепей ДНК, при этом ведется постоянный мониторинг процесса в реальном времени. Для каждого включенного в последовательность нуклеотида генерируется отчетливый световой сигнал, который регистрируется как пик гистограммы, называемой пирограммой. Пиросеквениатор секвенирует фрагменты размером до 80 п. н. и выполняет идентификацию полиморфизма единичных нуклеотидов (ПЕН). Как было прежде показано, этой максимальной длины достаточно для идентификации и типирования нескольких возбудителей, таких как группа хантавирусов, отличающихся высокой степенью биологического разнообразия. Таким образом, разработка коротких последовательностей длиной до 40 пар оснований обеспечивает дополнительную информацию для уже известных серотипов и идентификацию пока еще неизвестных генотипов.

Несмотря на то что уже существует очень эффективная вакцина против желтой лихорадки, диагностика этого заболевания остается исключительно важной проблемой экспресс-диагностики. Желтая лихорадка (YFV) передается человеку комарами в тропических регионах Африки и Южной Америки, вызывая эндемические эпидемические вспышки общей численностью примерно 200 000 случаев в год [13]. Значительные успехи в снижении смертности были достигнуты после введения вакцинации в программу иммунизации детей в Африке. Тем не менее постоянное перемещение людей требует ведения регулярного серологического анализа для контроля уровня иммунной защиты после вакцинации, чтобы избежать снижения его среди населения эндемических регионов. Этот мониторинг требует использования анализа при помощи YFV-специфического ферментного иммунного анализа для определения IgG среди африканского населения. Чтобы оценить специфичность результатов серологического иммуноанализа, требуется более специфический тест, такой как реакция нейтрализации [14].

Для анализа и быстрой диагностики в случае острой инфекции как у больных из эндемических регионов, так и у невакцинированных туристов, возвратившихся из эндемических регионов, наиболее чувствительный и разработанный метод — ОТ-ПЦР [15,16]. Последующее выделение вируса в клеточной культуре件 полезно для подтверждения, но для выделения требуется слишком много времени, которое превышает необходимое для быстрой постановки диагноза. Кроме того, ОТ-ПЦР применяется в качестве основы для принятия решения о проведении очередной вакцинации против YFV в качестве превентивной меры при повышении количества случаев заболевания в городах, располагающихся в эндемических регионах.

Относительно короткий период виремии, который составляет лишь несколько дней у больных, выздоравливающих после острого приступа YFV, ограничивает применение ПЦР-анализа, снижая вероятность положительного результата и требуя дополнительного серологического подтверждения. В результате высокой степени перекрестного реа-

гирования между разными флавивирусами по требованиям ВОЗ для достоверного положительного результата требуется четырехкратное превышение контрольного уровня антител в сыворотке. У больных с острой YFV может быть обнаружен очень высокий уровень антител, вирус может определяться даже в ткани печени при помощи электронной микроскопии и иммуногистохимического окрашивания со специфическими антителами [3, 16]. Высокая специфичность и чувствительность недавно разработанного метода непрямого флуоресцентного анализа делает его полезным инструментом для быстрой диагностики желтой лихорадки при эпидемической вспышке, для эпидемиологических исследований, для анализа уровня иммунной защиты после вакцинации [17].

Появление вируса лихорадки Западного Нила в Северной Америке в 1999 г. как нового возбудителя стало серьезной проблемой, при этом вначале заболевание может быть неверно диагностировано, поскольку в начальной фазе клинические признаки совпадают с признаками энцефалита Сент-Луис (SLE). До этого времени SLE, вызываемый вирусом SLE, был распространенной инфекцией в США. Вирус SLE принадлежит к семейству флавивирусов с высоким потенциалом перекрестной реактивности с другими флавивирусами при различных методах анализа. Очень рано было обнаружено, что этот возбудитель легко распространяется мигрирующими птицами и может передаваться человеку через переносчика-комара. Эта новая инфекция привела к необходимости разработки нового диагностического метода для диагностики WNV у больных с острым энцефалитом и для принятия мер безопасности персонала при работе с образцами крови и плазмы. Случайная передача при трансплантации органов инфицированного донора ясно показывает необходимость соблюдения требования биобезопасности при интенсивных диагностических процедурах [18]. Было описано очень большое число попыток снижения передачи вируса путем скрининга крови и органов методами непрямого флуоресценции и ОТ-ПЦР. Такие рутинные анализы всегда основаны на разработке и стандартизации диагностических методов.

Тем не менее использование сертифицированного метода ИФА не помогло решить проблемы перекрестной реактивности между различными флавивирусами. Как было обнаружено в оценочном исследовании различных коммерчески доступных тест-систем ИФА для WNV-специфичных IgG, все они показали положительную реактивность с анти-YFV и TBE-сыворотками (19021). Даже при использовании реакции торможения гемагглютинации, обладающей самой высокой специфичностью, был обнаружен определенный достаточно высокий уровень антител, показывающий анти-YFV и/или TBE-реактивность, показывающий перекрестную активность реакции нейтрализации с WNV. При внешнем контроле качества при серологической детекции WNV-положительной сыворотки было обнаружено, что только 8 из 27 (29,6%) лабораторий-участников достигли необходимых критериев в точности определения иммуноглобулинов M и G.

Эти данные характеризуют задачи достоверного серологического диагноза WNV [22]. Анализ avidности антител может стать быстрой и простой возможностью преодоления проблем перекрестной реактивности. Как показано в случае дифференцировки первичной пробы после предыдущей инфекции, avidность IgG предоставляет дополнительную диагностическую ценность [23]. Эти параметры должны быть оценены также с учетом перекрестной реактивности с другими флавивирус-реактивными сыворотками. Обратный ИФА, основанный на детекции В-домена Е-белка, видимо, более специфичен [24]. При использовании этого метода можно избежать частой перекрестной реакции, вызванной применением сыворотки непосредственно против флавивирусов.

Опубликованы данные для диагностики WNV методом ПЦР [25, 26]. В этих исследованиях было показано, что две линии вирусов, обнаруженные в Африке, имеют очень специфический тип распространения [27]. В США в результате исключительного распространения одного штамма вирусов присутствуют только варианты линии 1, исходно выделенные из Израильского прототипа. Недавно было показано исключительное распространение в Венгрии линии 2 [28]. Эти знания позволяют разработать новые WNV-специфичные тест-системы для ОТ-ПЦР, которые могут быть применены в Европе так, чтобы они могли распознавать обе линии вируса. Как было показано при проведении внешнего контроля качества, только 11 из 30 лабораторий были способны обнаружить 2 линию в высоких концентрациях, что показывает необходимость улучшения качества исследований путем адаптации праймеров к линии 2 WNV [29].

Вирус клещевого энцефалита (TBEV) представляет собой наиболее значимый из флавивирусов в Европе и России, передающийся укусами клещей-переносчиков семейства Ixodes. Самая высокая частота была обнаружена в Кемеровской области в Сибири, но клещи-переносчики также встречаются в Центральной и Восточной Европе с высокой частотой случаев укусов, вызывающих развитие энцефалита [30]. Двух-фазное течение болезни начинается с характерных гриппоподобных симптомов, после которых следует бессимптомный период и затем примерно у 20–30% больных развивается фаза менингита с возможным летальным исходом (до 2%) [31]. Очень часто больные не помнят или не распознают укус клеща, что приводит к поздней диагностике инфекции. Серология является наиболее часто применяемым методом анализа при TBEV, хотя некоторые ретроспективные исследования показывают, что в ранней фазе заболевания TBEV может быть обнаружен ПЦР-методами [32, 33]. В большинстве случаев диагностика первой линии проводится на основе выявления IgM с использованием коммерческих тест-систем ферментного TBEV-специфического иммуноанализа, которые производятся различными компаниями и имеют различное качество. Хотя использование этих тест-систем не позволяет решить проблему серологической перекрестной реактивности с другими флавивирусами, их качество улучшилось после проведения

сравнительной оценки качества несколько лет назад [33, 34, 35]. Проведение внешнего контроля качества коммерческих серологических тест-систем установило, что правильные результаты были получены по крайней мере для 90% образцов в 33 из 40 (83%) лабораторий-участниц в случае IgM и в 16 из 42 (38%) лабораторий в случае IgG [36]. Было также показано, что только 33–44% лабораторий правильно определили дальневосточный и/или сибирский серотип TBEV, несмотря на то что в прибалтийских странах уже имеется сибирский штамм вируса [37, 38]. Можно предположить, что с повышением требований к качеству диагностики острого TBEV более важным станет ПЦР-метод, позволяющий определить геном вируса в сыворотке или СМЖ больного. К сожалению, из-за короткого периода виремии отрицательный результат ПЦР не является основанием для того, чтобы дать отрицательное заключение о наличии инфекции [39]. Для врачей, не запрашивающих ПЦР-исследования, единственным доводом оказывается то, что не существует специфического медикаментозного лечения, которое могло бы быть применено к больным TBEV. Тем не менее можно надеяться, что ситуация изменится. Кроме того, такие методы лечения, как антибиотики, часто применяемые при картине энцефалита, при лечении TBEV могут нанести вред больному.

Вирус Чикунгунья (CHIKV), который географически распространен в Африке, Индии и Юго-Восточной Африке, принадлежит к семейству альфавирусов и передается комарами человеку. С 2005 г. было отмечено несколько вспышек эпидемий лихорадки Чикунгунья в странах Африки, Юго-западного побережья Индийского океана, Азии и, в последнее время, Европы [40, 41]. 266 тыс. случаев CHIKV на острове Реюньон и 1,3 млн случаев в Индии выявили острую необходимость и важность быстрой и достоверной диагностики [42, 43]. Большинство случаев инфицирования были диагностированы лабораторными методами на основе ферментного иммуноанализа, позволяющего обнаружить иммуноглобулины M и/или G [44]. Как показано в статье, посвященной исследованию иммуноглобулинов M и G у путешественников, инфицированных CHIKV, эти антитела появляются почти в одно время на второй день после развития симптомов [42]. При соотношении с ОТ-ПЦР-анализом, давшим положительный результат у всех больных, у которых пробы были взяты на 1–4 сут. после начала развития инфекции, доказано, что в острых случаях другие методы исследования также пригодны для постановки диагноза. Как было показано в данном исследовании, частота успешного выделения вируса хорошо коррелирует с количеством копий генома в мл сыворотки больного. Более того, при проведении контроля качества серологического исследования CHIKV наиболее чувствительным методом оказалась РТГА по сравнению с другими методами, такими как ИФА [45]. Многие лаборатории показали почти оптимальное проведение выявления IgM, независимо от использования коммерческих или «внутрилабораторных» тест-систем. Потенциальная проблема перекрестных серологических реакций у больных, инфицированных

другими альфавирусами, такими как вирусы восточного, западного или Венесуэльского лошадиного энцефаломиелита, вирусом О'Ньюнг-Ньюнг, вирусом реки Росс или вирусом леса Семлики, видимо, менее значимы из-за разных областей распространения этих болезней. Недавно разработанные коммерческие наборы для серологического определения помогут улучшить качество диагностики этих новых инфекций [46].

Выявление методом ПЦР широко распространенных штаммов СНИКV, распределенных между Западной Африкой и Азией, по-видимому, не должно представлять большую проблему, если будет проведено секвенирование генома с высокой гомологией выбранного ПЦР-праймера [42]. Тем не менее необходимо повысить чувствительность некоторых методов исследования, как это было показано при проведении внешнего контроля качества, в которых 87% лабораторий не смогли обнаружить 1000 геномных копий в мл пробы [47].

Вирус лихорадки папатачи (SFV), который переносится москитами *Phlebotomus*, широко распространен во всех странах средиземноморского региона. Группа этих вирусов включает несколько штаммов, названных по тому месту, где они впервые были выделены в ходе вспышки заболевания: Тосканский, Неапольский, Сицилийский, Корфу и Кипрский [48]. Хотя обычно заболевание протекает нетяжело, редкими осложнениями могут быть менингит, менингоэнцефалит и энцефалит. Заболеваемость этими инфекциями достаточно низкая [49]. В последние годы было показано наличие лихорадки папатачи на юге Франции, в Португалии, Испании, Греции, Италии, на Кипре и в Алжире, что подчеркивает важность изучения этой инфекции [50–52]. В большинстве случаев диагноз был поставлен на основе данных исследований без применения коммерческих наборов, хотя они доступны. Эти тест-системы разработаны на основе ИФА и иммуноблота. Недавно была разработана тест-система для выявления генома вируса методом ОТ-ПЦР, которая дополняет имеющуюся в продаже каскадную ПЦР и может использоваться для скрининга окружающей среды, в том числе насекомых — переносчиков вируса, а также образцов от больных с признаками острой инфекции [53, 54]. Внедрение новых и более чувствительных ПЦР-систем поможет улучшить диагностику вирусного менингита, вызванного SFV, у больных из эндемичных районов.

Конго-Крымская геморрагическая лихорадка (ССНФV) названа по двум географическим регионам, в которых был обнаружен и выделен вирус, что указывает на широкий ареал распространения этой болезни [55]. ССНФV встречается в Восточной, Западной и Южной Африке, на Ближнем Востоке, в Азии и Юго-Восточной Европе. Недавняя вспышка в Турции и спорадические случаи заболевания на севере Греции позволяют увидеть, что эндемическая область распространяется и на эти регионы [56–58]. Вирус переносится, главным образом, при укусах клещами *Hyalomma* лиц, контактирующих с животными, — пастухов, фермеров или мясников. Диагностику острых

случаев осуществляют с помощью ПЦР или серологически при выявлении специфического IgM в ИФА. У больных в острой фазе болезни с интенсивной вирусемией возможно обнаружение вируса методом связывания антигена, но этот метод используется редко [59]. Сравнение методов ИФА и ОТ-ПЦР показало, что детекция антигена на один-два порядка менее чувствительна [60].

Коммерчески доступны тест-системы для серологического определения как IgM- так и IgG-методами ферментного иммунного анализа и иммунофлуоресценции. Проблема манипуляции с этими высокоинфекционными возбудителями человека при определении серологическими методами обычно требует наличия оборудования высокого уровня защиты (обычно 4 уровня биологической безопасности для вирусологических лабораторий), которое используется для культивирования вируса. Эта проблема, как было недавно показано, может быть решена путем применения рекомбинантных антигенов, не представляющих биологической опасности [61]. Рекомбинантные антигены представляют собой новый чувствительный и специфический инструмент с эквивалентным результатом диагностики ССНФV. С введением новых методов количественной ПЦР стало возможным измерение уровня вирусной нагрузки в клинических образцах, которое бывает важно при сравнении степени остроты протекания инфекции у больного [62]. Резюмируя, можно сказать, что количество копий РНК генома может рассматриваться как фактор, имеющий высокую предикативную ценность для более или менее острого течения заболевания. У восьми из девяти больных с летальным исходом была обнаружена вирусная нагрузка более  $10^9$  копий/мл, в то время как у 25 из 26 больных с нелетальным исходом вирусная нагрузка была менее  $10^9$  копий/мл ( $P < 0,001$ ).

Вирус лихорадки долины Рифт (RVF) — РНК-вирус, который переносится комарами и ответственен за большие вспышки заболеваний с острым лихорадочным состоянием среди скота и людей в странах Африки и Саудовской Аравии. Вирусная инфекция животных часто приводит к самопроизвольным абортам со значительной смертностью новорожденного потомства и значительному экономическому ущербу. Инфицирование человека выражается в развитии гриппоподобного состояния. У 1–2% больных развивается острое осложнение, которое может включать энцефалит или геморрагическую лихорадку с высокой частотой смертельных исходов. В когортном исследовании, обобщившем описание случаев эпидемии RVF в Саудовской Аравии с августа 2000 г. по сентябрь 2001 г., были проанализированы 834 описанных случая, где были проведены лабораторные исследования. Из этих случаев 81,9% были лабораторно подтверждены, из них 51,1% были положительны только в отношении IgM RVF, 35,7% положительны только на RVF-антиген и 13,2% были положительны по обоим параметрам [63]. Были опубликованы результаты, показывающие значительное повышение эффективности диагностики острых инфекций, а в настоящее время как показала вспышка RVF

в Кении в 2006 г., улучшена диагностика RVF методом ОТ-ПЦР [64–66]. Для выявления антител к RVFV был разработан метод фермент-связанного иммуносорбентного ингибирования, который применяется для серологической оценки иммунного статуса людей, домашних животных и диких жвачных животных при проведении программ наблюдения за распространением и контролем RVF [67]. Этот метод, который пока используется на уровне лабораторного и не имеет коммерческих аналогов, показал более высокую чувствительность при обнаружении раннего иммунологического ответа по сравнению с реакцией нейтрализации вируса или РТГА и может быть использован в опытных лабораториях в качестве безопасной, надежной и высокоточной диагностики. При дальнейшей разработке метода было показано, что инактивированный антиген целого вируса можно эффективно заменить рекомбинантным N-белком. Это дает возможности для дополнения традиционных методов серодиагностики RVF [68]. Вполне вероятно, что улучшение диагностики серологическими и генодиагностическими методами будет также влиять на программы эпиднадзора за инфекционными болезнями и на алгоритм ведения больных RVF, как уже показано в отношении других возбудителей вирусных геморрагических лихорадок.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hayes E, Machenzie J, Shope R. American Public Health Association. Arthropod-borne viral diseases. In: Heyman DL, ed. Control of Communicable Diseases Manual. 19th ed. Washington, DC: United Book Press, Inc, 2008:34–39.
2. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370(9599):1644–1652. Review.
3. Bae HG, Drosten C, Emmerich P, et al. Analysis of two imported cases of Yellow Fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol* 2005; 33:274–280.
4. Blacksell SD, Bell D, Kelley J, et al. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(11): 1458–1464.
5. Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(8):280.
6. Wichmann O, Stark K, Shu PY, et al. Clinical features and pitfalls in the laboratory diagnosis of dengue in travelers. *BMC Infect Dis* 2006; 6:120.
7. Pengsaa K, Yoksan S, Limkittikul K, et al. Maternally transferred neutralising dengue antibodies in Thai infants: A pilot study. *Ann Trop Paediatr* 2003; 23(3):159–165.
8. Chuansumrit A, Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, et al. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(1):43–48.
9. Das S, Pingle MR, Munoz-Jordan, et al. Detection and serotyping of dengue virus in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR-ligase detection reaction assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10):3276–3284.



10. Domingo C, Palacios G, Niedrig M, et al. A new tool for the diagnostic and molecular surveillance of Dengue infections in clinical samples. *WHO Dengue Bull* 2004; 28:87-95.
11. Teichmann D, Gobels K, Niedrig M, et al. Virus isolation for diagnosing dengue virus infections in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(11):697-700.
12. Teichmann D, Gobels K, Niedrig M, et al. Clinical and laboratory features of Dengue virus infected traveller previously vaccinated against Yellow Fever. *Scan J Infect Dis* 2003; 35(6-7):427-429.
13. Monath TP. Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. *Bull Soc Pathol Exot* 2006; 99(5):341-347.
14. Koraka P, Zeller H, Niedrig M, et al. Reactivity of serum samples from patients with a Flavivirus infection measured by IFA and ELISA. *Microbes Infect* 2003; 4:1209-1215.
15. Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, et al. Detection of Yellow Fever: A comparison of quantitative real time and plaque assay. *J Virol Methods* 2003; 110(2):185-191.
16. Teichmann D, Grobusch MP, Wesselmann H, et al. A haemorrhagic fever from the Cote d'Ivoire. *Lancet* 1999; 354(9190):1608.
17. Niedrig M, Kursteiner O, Herzog C, et al. Evaluation of an Indirect Immunofluorescence Assay for detection of Ig M and IgG Antibodies against Yellow Fever Virus. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(2):171-181.
18. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, et al. West Nile Virus in Transplant Recipients Investigation Team Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 348(22):2196-2203.
19. Pfliegerer C, Konig C, Chudy M, et al. Molecular epidemiology of West Nile Virus in humans. *Dev Biol (Basel)* 2006; 126:197-201.
20. Linke S, Muehlen M, Niedrig M, et al. Assessing the exposure of German and Austrian bird ringers to west Nile virus (Flavivirus) and evaluating their potential risk to acquire an infection. *J Ornithol* 2008; 149:271-275.
21. Malan AK, Martins TB, Hill HR, et al. Evaluations of commercial West Nile virus immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme immunoassays show the value of continuous validation. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2) 727-733.
22. Niedrig M, Donoso-Mantke O, Altmann D, et al. External quality assurance study on serology diagnosis of West Nile. *BMC Infect Dis*. 2007; 7:72.
23. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, et al. Use of Ig G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12) 5873-5875.
24. Ludolfs D, Linckh S, Niedrig M, et al. Reverse ELISA for the detection of anti West Nile IgG antibodies in humans. *Clin Microbiol Infect* 2007; 26(7):467-473.
25. Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12):4506-4513.
26. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, et al. Detection of West Nile virus lineage 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods* 2007; 146:355-358.
27. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, et al. West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(9) 519-529.
28. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, et al. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(2):225-231.

29. Niedrig M, S Linke, H Zeller, et al. First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *J Clin Chem* 2006; 10(12):2200–2203.
30. Korenberg E, Likhacheva T Analysis of the long-term dynamics of tick-borne encephalitis (TBE) and ixodid tick-borne borrelioses (ITBB) morbidity in Russia. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 (suppl 40):54–58.
31. Poponnikova TV. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(40) 59–62.
32. Schultze D, Dollenmaier G, Rohner A, et al. Benefit of detecting tick-borne encephalitis viremia in the first phase of illness. *J Clin Virol* 2007; 38(2):172–175.
33. Donoso Mantke O, Achazi K, Niedrig M. Serological versus PCR methods for the detection of tick-borne encephalitis virus infections in humans. *Future Virol* 2007; 2(6) 565–572.
34. Niedrig M, Vaisviliene D, Klockmann U, et al. Comparison of six commercial IgG-ELISA Kits for the detection of TBEV-antibodies. *J Clin Virol* 2000; 20:179–182.
35. Jääskeläinen A, Xiuqi Han X, Niedrig M, et al. Diagnostics of tick-borne encephalitis with  $\mu$ -capture IgM-иммуоферментного анализа based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9):4336–4342.
36. Niedrig M, Avšič T, Aberle SW, et al. Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 2007; 38:260–264.
37. Donoso Mantke O, Schädler R, Niedrig M. Survey on cases of tick borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill* 2008; 13(17):18848.
38. Golovljova I, Vene S, Sjölander KB, et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *J Med Virol* 2004; 74(4) 580–588.
39. Donoso Mantke O, Aberle SW, Avšič T, et al. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 2007; 38:73–77.
40. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 2006; 3(7):263.
41. Brisse S, Iteman I, Schuffenecker I. Chikungunya outbreaks. *N Engl J Med* 2007; 356(25):2650–2652.
42. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(3):416–122.
43. Laurent P, Le Roux K, Grivard P, et al. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin Chem* 2007; 53(8):1408–1414.
44. Gerardin P, Guernier V, Perrau J, et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis* 2008; 8:99.
45. Niedrig M, Zeller H, Schuffenecker I, et al. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of chikungunya virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(9):880–884.
46. Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J Virol Methods* 2008; 149:175–179.

47. Panning M, Charrel RN, Landt O, et al. Coordinated implementation and external quality assessment of diagnostic Chikungunya virus RT-PCR. *Emerg Infect Dis* 15(3):469-471.
48. Xu F, Chen H, Travassos da Rosa AP, et al. Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment. *J Gen Virol* 2007; 88(8):2312-2319.
49. De Lamballerie X, Tolou H, Durand JP et al. Prevalence of Toscana virus antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7(2):275-277.
50. Konstantinou GN, Papa A, Antoniadis A. Sandfly-fever outbreak in Cyprus: Are phleboviruses still a health problem? *Travel Med Infect Dis* 2007; 5(4):239-242.
51. Santos L, Simões J, Costa R, et al. Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill* 2007; 12(6):E3-E4.
52. Izri A, Temmam S, Moureau G, et al. Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(5):795-797.
53. Perez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Mari JM, et al. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol* 2007; 39(4):276-281.
54. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sail AA, et al. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol* 2008; 41(2):138-142.
55. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004; 64(3):145-160.
56. Gozalan A, Eesen B, Fitzner J, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever cases in Turkey. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(4):332-336.
57. Papa A, Christova I, Papadimitriou E, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(8):1465-1467.
58. Papa A, Maltezou HC, Tsiodras S, et al. A case of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, June 2008. *Euro surveill* 2008; 13:33.
59. Smirnova SE, Karavanov AS. Detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus antigen by solid phase enzyme immunosorbent assay. *Acta Virol* 1985; 29:87-90.
60. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, et al. Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol* 2006; 35(2):154-159.
61. Larichev VF, Manzeniuk IN, Naidenova EV, et al. ELISA and PCR test systems used to detect Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Vopr Virusol* 2007; 52(4):43-46.
62. Cevik MA, Erbay A, Bodur H, et al. Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2007; 45(7):e96-e100.
63. Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, et al. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: Epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin Infect Dis* 2003; 37(8):1084-1092.
64. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rift Valley fever outbreak-Kenya, November 2006-January 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56(4):73-76.
65. Bird BH, Bawiec DA, Ksiazek TG, et al. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Microbiol* 2007; 45(11):3506-3513.

66. Bird BH, Khristova ML, Rollin PE, et al. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol* 2007; 81(6):2805–2816.
67. Paweska JT, Mortimer E, Leman PA, et al. An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J Virol Methods* 2005; 127(1):10–18.
68. Fafetine JM, Tijhaar E, Paweska JT, et al. Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet Microbiol* 2007; 121 (1-2):29–38.



## 27 ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЯМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

**С. Пергам**

Steven A. Pergam, Department of Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.

**К.Р. Джером**

Keith R. Jerome, Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, U.S.A.

### ВВЕДЕНИЕ

Больные с ослабленным иммунитетом — так называемые иммунокомпрометированные больные — представляют клинической вирусологической лаборатории уникальную возможность для проведения диагностических исследований. Иммунный ответ хозяина играет критическую роль в контроле вирусных инфекций, и при отсутствии такого контроля вирусы могут вызывать тяжелые инфекции с выраженными клиническими проявлениями. Таким образом, иммунокомпрометированные больные требуют неустанныго и частого мониторинга вирусных инфекций, а клинические вирусологические лаборатории представляют собой важный компонент системы ведения таких больных.

Иммуносупрессия — общий термин, включающий широкий спектр состояний иммунитета, которые варьируют по остроте, но все связаны с повышенным риском развития инфекции. В норме у здоровых людей, которых инфицирует вирус, по определению, иммунная система отвечает на воздействие, но в некоторые моменты жизни они также оказываются чувствительными к вирусной инфекции. Дети младшего возраста, особенно новорожденные и недоношенные, входят в группу повышенного риска развития опасных вирусных инфекций [1]. С возрастом происходит снижение активности Т-клеточного звена иммунного ответа на вирусные инфекции, такие, например, как вирус опоясывающего лишая (VZV), что может привести к повышению заболеваемости [2, 3]. У беременных женщин часто возникает физиологическое снижение функции иммунной системы [4], которое может быть причиной возникновения осложнений при отдельных вирусных инфекциях [5, 6].

Ослабление иммунитета развивается по различным причинам, среди которых инфекции и онкологические заболевания. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), подробно рассмотренный в гл. 23,

является одной из ведущих причин иммуносупрессии, распространенной по всему миру. Нарушение иммунитета от умеренного до глубокого может быть проявлением далеко зашедшего ракового процесса, в частности у больных с лейкемией, лимфомой или множественной миеломой. У больных с дисфункцией органов — почек, печени — изменение иммунитета приводит к повышению чувствительности к инфекции и меньшему уровню защиты при вакцинации [7–9]. Существует также большое количество наследственных иммунодефицитов, которые в зависимости от специфических нарушений могут также быть ассоциированы с повышенной чувствительностью к вирусным инфекциям [10].

Одна из самых частых причин нарушения иммунитета у больных в США — применение иммуносупрессорных препаратов для лечения различных заболеваний и при медицинских вмешательствах. Иммуносупрессивная терапия применяется при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (*hematopoietic stem cell transplantation, HSCT*) и паренхиматозных органов (*solid organ transplantation, SOT*), что приводит к повышению предрасположенности больных к вирусным инфекциям. В этих случаях клиническая вирусологическая лаборатория играет важную роль в диагностике и мониторинге состояния. В этой главе внимание сфокусировано на специфических вирусных инфекциях, которые развиваются у больных с нарушенным иммунитетом, особенно после трансплантации. Здесь представлен общий обзор, поскольку дополнительная информация об отдельных вирусах содержится в других главах книги.

## ИММУНОСУПРЕССИЯ У БОЛЬНЫХ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

### Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

При аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) пациент получает стволовые клетки от одного из трех источников: донорского костного мозга, периферической крови или стволовых клеток из крови пупочного канатика (*umbilical cord blood, USB*). В дополнение к аллогенным трансплантатам больным, получающим высокие дозы химиотерапии, проводят аутотрансплантацию собственных стволовых клеток. Этот прием применяется при большой группе заболеваний, включая неходжкинскую лимфому и множественную миелому [11, 12]. В процессе подготовки к трансплантации стволовых клеток используются различные режимы подавления костного мозга реципиента; общепринято введение высоких доз циклофосфида с фракционированным облучением всего тела или введение бисульфана. Более популярной при лечении пожилых людей или больных с тяжелыми сопутствующими заболеваниями становится аллогенная трансплантация без подавления костного мозга (или с пониженной интенсивностью подавления) [13, 14]. Независимо от условия режима целью большинства принятых способов подготовки реципиента явля-

ется подавление собственной иммунной системы для предупреждения реакции отторжения, в результате чего после трансплантации у больных ослаблена иммунная система [15].

После проведенных процедур восстановление иммунитета затягивается. Первоначально у больных в периферической крови отсутствуют нейтрофилы и лимфоциты, и эти пациенты имеют высокий риск развития оппортунистических инфекций. Первыми в организме приживляются моноциты, после них в периферической крови появляются гранулоциты и естественные киллеры (NK-клетки) [15]. Функция лимфоцитов восстанавливается медленнее, и хотя общее количество лимфоцитов обычно возвращается к норме за 2 мес. после трансплантации, больные остаются в группе повышенного риска развития вирусных инфекций. Считается, что ограниченная клональность Т-клеток в популяции донорских клеток ограничивает разнообразие антигенной специфичности в ранний посттрансплантационный период [16]. Более того, Т-клеточный ответ на вирусную инфекцию часто бывает отсроченным, особенно у больных, у которых развилась реакция «трансплантат против хозяина» (*graft-versus-host disease*, GVHD) или которым требуется терапия стероидными препаратами [17]. У больных, которые подвергаются истощению Т-клеточного ответа или трансплантации стволовых клеток из крови пупочного канатика, имеют длительный период восстановления Т-клеточного звена иммунного ответа [18]. Восстановление В-клеточного ответа также отсрочено при хронической форме GVHD [19, 20] и может еще затянуться в результате обработки моноклональными анти-В-клеточными антителами, такими как ритуксимаб (*Rituximab*) [21]. Вместе эти процессы подавления клеточного иммунитета приводят к высокой частоте развития вирусных инфекций в посттрансплантационный период.

После трансплантации HSCT реципиенты подвергаются иммуносупрессивной терапии для профилактики GVHD. Уровень ослабления иммунитета должен быть сбалансирован, так как глубокая супрессия предвещает повышение количества и остроты инфекционных заболеваний, недостаточная супрессия приводит к риску осложнений, связанных с GVHD. Обычно для предупреждения развития GVHD применяют метотрексат, ингибиторы кальциневрина и микофенолата мофетил (MMF), которые повышают риск вирусных заболеваний [22]. Независимо от профилактики больным, у которых развивается GVHD, назначают высокую дозу глюкокортикоидов и дополнительные иммуносупрессоры, которые могут в будущем повысить риск вирусных осложнений [23]. В некоторых центрах для предупреждения развития GVHD до трансплантации проводится обработка трансплантата для подавления Т-клеток с помощью антимоноцитного глобулина (ATG) и алемтузумаба (моноклональные антитела к CD52). Эти препараты могут быть также использованы в качестве терапевтических при острых случаях GVHD, оба препарата значительно увеличивают риск посттрансплантационных инфекций [24, 25].

## Трансплантация паренхиматозных органов

При трансплантации паренхиматозных органов больные также до пересадки органа от донора подвергаются индукционной терапии. Хотя режим проведения такой терапии сильно варьирует в различных центрах трансплантации, в целом режим проведения подготовки реципиента основан на высоких дозах стандартных иммуносупрессоров (таких как ингибиторы кальциневрина, глюкокортикоиды и MMF) или комбинации низких доз иммуносупрессоров и биологических агентов — таких как антитела против Т-клеточных антигенов. С тех пор как были получены данные о повышении приживаемости трансплантата у больных, получавших анти-Т-клеточную терапию [26], в большинстве центров для претрансплантационной подготовки используются эти агенты в комбинации с низкими дозами иммуносупрессоров и стероидов [27]. Эти биологические агенты можно классифицировать по трем группам: преимущественно поликлональная антителная терапия (ATG), IL-2-рецептор-специфические антитела (анти-CD52) и алемтузумаб, который действует как на В-, так и на Т-клеточное звено иммунитета. ATG и алемтузумаб имеют высокую степень ассоциации с риском развития инфекционных осложнений [28, 29]. Антитела, которые не приводят к полному истощению клеточного иммунитета, такие как даклизумаб и базиликсимаб, связаны с более низким риском развития инфекции [30–32].

После трансплантации органа больные остаются на режиме употребления «коктейля» иммуносупрессоров, которые предупреждают развитие острого и хронического отторжения органа. Эти препараты часто используются в комбинации и включают низкие дозы стероидов, ингибиторы кальциневрина (сиролимус/циклоспорин), MMF, азатиоприн или m-TOR-ингибиторы (мишень для рапамицина у млекопитающих, *mammalian target of rapamycin*, m-TOR), к которым относятся сиролимус и зверолимус. Для снижения системного побочного действия глюкокортикоидов также использовался бесстероидный режим претрансплантационной подготовки, при этом показана его эффективность [33].

## Иммуносупрессорные препараты при трансплантации

Различные иммуносупрессорные компоненты, применяемые при трансплантации, имеют различные механизмы, при помощи которых они оказывают действие на иммунную систему. Кортикостероиды ингибируют транскрипцию генов, которые кодируют цитокины и другие медиаторы иммунной системы, оказывая понижающую регуляцию молекул адгезии и в целом подавляя воспалительный ответ [34]. Такролимус и циклоспорин, напротив, оказывают направленное действие как ингибиторы кальциневрина, что приводит к ингибированию передачи Т-клеточного сигнала и транскрипции IL-2 [35]. MMF действует путем ингибирования монофосфатдегидрогеназы, следовательно, подавляя синтез пуринов *de novo*, кото-

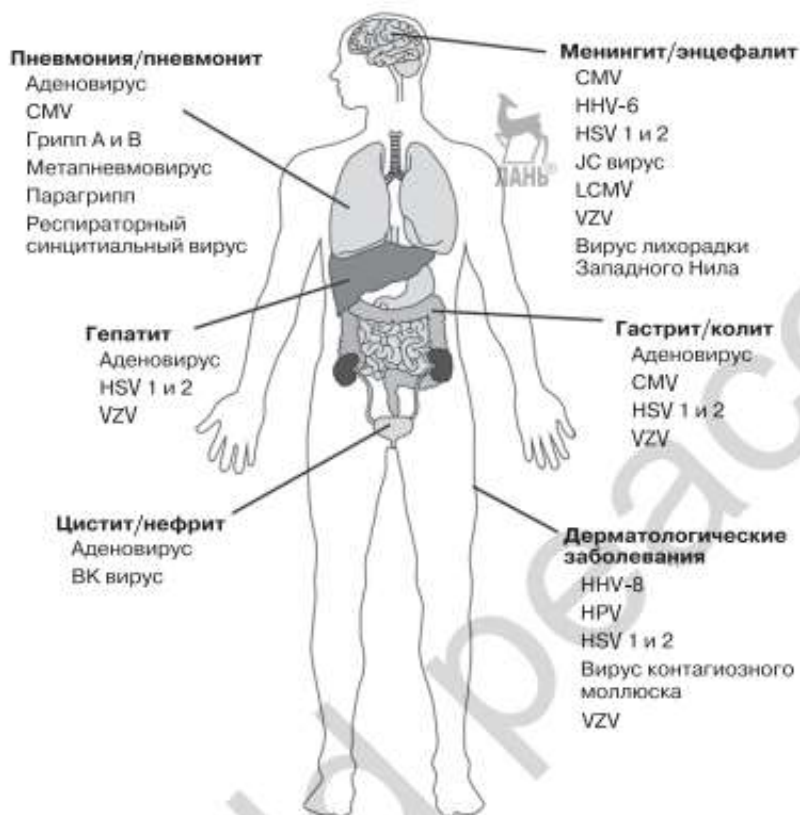


рый необходим для пролиферации Т- и В-клеток [34]. Более новые агенты, такие как эверолимус и сиролимус, которые ингибируют m-TOR, обладают как антипролиферативным, так и иммуносупрессивным действием [36]. Моноклональные антитела имеют мишенью специфические компоненты иммунной системы, такие как Т-клетки (через IL-2-рецептор/анти-CD52 антитела, например, базиликсимаб) и В-клетки (анти-CD20, например, ритуксимаб). ATG и алемтузумаб, которые обладают более широким спектром мишеней-лимфоцитов, также могут быть добавлены к стандартным иммуносупрессорным агентам при лечении острой реакции отторжения у больных после трансплантации паренхиматозных органов и при острой GVHD у HSCT. Более новые агенты — ингибиторы фактора некроза опухоли (ETA), такие как инфликсимаб, реже используются при трансплантации, но также ассоциированы со снижением иммунных функций [37].

Для оптимизации терапевтического воздействия стандартных препаратов с минимизацией риска инфекционных осложнений поставщики обычно измеряют физиологическую концентрацию иммуносупрессирующих агентов. Поскольку существует большое число факторов, влияющих на метаболизм лекарственных препаратов, включая возраст больного [38], генетику [39] и взаимодействия лекарств между собой [40–42], следует вести мониторинг уровня препаратов, который может помочь предупредить развитие избыточной иммуносупрессии и лекарственной токсичности. Возможен мониторинг уровня циклоспорина в течение некоторого времени, и большинство центров опираются на концентрацию препарата в течение двух часов после введения, как на суррогатный маркер общего действия циклоспорина [43]. С одной стороны, полезность такого мониторинга показана в большом количестве групп; также показано, что эта форма лучше, чем мониторинг состояния больного до введения препарата. Такролимус и сиролимус, с другой стороны, обычно измеряются до введения следующей дозы, и похоже, что у этого метода нет каких-то преимуществ по сравнению с другими. Данные о полезности мониторинга уровня MMF остаются противоречивыми [43,44].

## **ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ**

Вирусные возбудители остаются постоянно существующей проблемой у больных после трансплантации. Герпесвирус и респираторные вирусы в особенности являются ведущей причиной заболеваемости и смертности у трансплантированных больных, и вирусы — основные причины менингитов, энцефалитов, пневмонии, гастрита и колита среди других инфекционных осложнений в трансплантологии (рис. 27.1). Клиническая вирусологическая лаборатория должна гарантировать диагностическую специфичность и позволяет обеспечить контроль, профилактику и лечение этих вирусных инфекций.



**Рис. 27.1.** Схема вирусного заболевания у посттрансплантационных больных. CMV — цитомегаловирус, HPV — папилломавирус человека, HSV — вирус простого герпеса, LCMV — вирус лимфоцитарного хориоменингита, VZV вирус опоясывающего лишая, HHV — человеческий герпесвирус, JC — полиомавирус JC

### Цитомегаловирус (CMV)

CMV — наиболее распространенная вирусная инфекция при трансплантации. После первичной инфекции у здорового хозяина формируется пожизненная иммунная защита. Как только иммунная система нарушается в ходе трансплантации, CMV может избежать контроля со стороны иммунитета и реплицироваться, что приводит к серьезным осложнениям. Риск CMV после трансплантации зависит в большой степени от статуса сыворотки реципиента и донора. Самый малый риск популяции при трансплантации установлен в случае серологически CMV-отрицательного реципиента, который получает орган от серологически CMV-отрицательного донора, эту ситуацию можно обозначить D-/R- [52]. При HSCT группу наиболее высокого риска

составляют сероположительные реципиенты (R+) [52, 53], из которых у 60–70% в посттрансплантационный период развивается CMV [54]. При пересадке органа максимальный риск составляют, напротив, серологически отрицательные реципиенты (R–), получившие орган от сероположительного донора (D+). Умеренный риск заболевания при HSCT составляют реципиенты в случае D+/R–, а при пересадке органа — D–/R+. Эти различия значительны; было показано, что при HSCT серологически положительные реципиенты, по сравнению с серологически отрицательными, имеют более высокий риск смерти, связанный с трансплантацией [52]. Больные, входящие в группу высокого риска, как сообщают, имеют повышенную частоту GVHD, отторжения органа, оппортунистических инфекций, респираторных заболеваний [55–57]. Тем не менее, поскольку серологический статус является одним из факторов, которые определяют выбор оптимального донора для данного реципиента, другие факторы, такие как несоответствие HLA и возраст, видимо, являются более сильными детерминантами общей выживаемости [58], часто нельзя избежать риска развития CMV.

Реактивация CMV в течение посттрансплантационного периода может привести к угрожающим для жизни инвазивным осложнениям, таким как пневмония, энтерит, ретинит, энцефалит или мультиорганное диссеминированное заболевание [23, 59, 60]. Инвазивный CMV-процесс пока остается главной причиной смертности от инфекционных осложнений при трансплантации. CMV отмечается примерно у 6–9% сероположительных HSCT реципиентов [23]. У реципиентов по времени после HSCT CMV может проявляться в двух формах: ранняя форма CMV обычно возникает в течение первых 3 мес. после трансплантации, в течение периода наиболее выраженной иммуносупрессии. Поздняя форма CMV развивается более чем через 3 мес. после HSCT в результате дефекта клеточно-опосредованного иммунитета, который развивается и сохраняется после трансплантации [23, 61, 62]. Факторы риска позднего CMV включают определяемый уровень CMV в плазме или цельной крови в ранний посттрансплантационный период ( $\leq 100$  дней), длительную лимфопению и неполноценный Т-клеточный ответ на CMV [60]. При пересадке паренхиматозных органов риск посттрансплантационной CMV зависит от уровня иммуносупрессии и трансплантированного органа [63]. Частота развития поздней формы заболевания повышается в результате более частого применения противовирусной профилактики в ранний посттрансплантационный период [64, 65].

Клинически наиболее частым проявлением CMV у иммунокомпрометированных больных является энтерит и пневмония [59]. В дополнение к этому, при пересадке органа CMV-инфекция может проявиться в аллотрансплантате, что приводит к его отторжению [57]. Быстрая диагностика CMV в этих случаях очень существенна, поскольку отсроченная диагностика может привести к серьезным последствиям и даже смерти. CMV-индуцированная пневмония диагностируется

при детекции CMV в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) или в биопсийном образце [66].

Диагностика CMV-пневмонии может быть проведена на основе однослойных культур во флаконах, прямого флуоресцентного метода выявления антигена, цитологии или иммуногистохимии биопсийного образца [59]. Аналогично CMV-желудочно-кишечные болезни диагностируют путем детекции вируса в биопсийных образцах. Высокая степень остороженности должна быть даже в случае отсутствия признаков вирусемии, поскольку желудочно-кишечная форма CMV (и в меньшей степени при другой локализации вируса) может иметь место при отсутствии определяемого уровня вируса в крови. CMV-инфекция обычно лечится при помощи ганцикловира (плюс внутривенное введение иммуноглобулина при пневмонии) как препарата первой линии, и фоскарнета в качестве альтернативной терапии у больных с выраженной нейтропенией (табл. 27.1).

Данные и клинический опыт показывают, что ожидание появления симптомов до начала анти-CMV-терапии не совсем оправданный подход, поскольку к этому времени уже может установиться вирус-

Таблица 27.1

**Некоторые противовирусные препараты, обладающие активностью против вирусов, ассоциированных с вирусными осложнениями у трансплантированных больных**

	Препарат	Вирус
Герпесвирусы	Ацикловир/валацикловир/фамцикловир	HSV 1 и 2; VZV
	Ганцикловир/вальганцикловир	CMV; HHV-6 <sup>a</sup> ; KSHV/HHV-8 <sup>b</sup> ; VZV
	Фоскарнет	CMV; HSV 1 и 2; HHV-6 <sup>b</sup> ; VZV
	Цидофовир	CMV; HSV 1 и 2; HHV-6; KSHV/HHV-8 <sup>c</sup>
Полномавирусы	Цидофовир	БК-вирус; JC-вирус
	Лефлуноמיד	БК-вирус <sup>d</sup>
Респираторные вирусы	Адамантинес	Грипп А
	Цидофовир	Аденовирус <sup>e</sup>
	Ингибиторы нейраминидазы	Грипп А и В
	Рибавирин	Аденовирус <sup>f</sup> ; грипп А и В; метапневмовирус <sup>g</sup> ; RSV

<sup>a</sup> см. [45].<sup>b</sup> см. [46].<sup>c</sup> см. [47, 48].<sup>d</sup> см. [49].<sup>e</sup> см. [50].<sup>f</sup> см. [51].

*Сокращения:* CMV — цитомегаловирус, HSV — вирус простого герпеса, KSHV — герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши, VZV — вирус опоясывающего лишая

ная репликация на высоком уровне и инвазивная болезнь тканей. Исследования показали выживание только 30–50% больных, у которых произошло развитие симптоматики CMV-пневмонии даже при проведении интенсивной терапии [67, 68]. Чтобы предупредить такие страшные последствия, разработаны две основные профилактические стратегии, которые в настоящее время используются на практике против CMV-инфекции: первичная противовирусная профилактика и предупреждающая терапия. Недавно проведенный мета-анализ по сравнению с эффективностью этих двух стратегий обнаружил, что они обе предупреждают развитие CMV-инфекции, хотя профилактический подход, по-видимому, лучше подходит для больных из группы высокого риска [69, 70].

Было проведено несколько клинических исследований предупреждающего профилактического действия ганцикловира, в которых было показано снижение частоты заболеваний CMV, однако на общую выживаемость введение этого препарата профилактически не повлияло [59]. Профилактическое применение ганцикловира, кроме того, может привести к продолжительной нейтропении, повышению чувствительности к бактериальным и микотическим инфекциям [71]. Более того, продолжительное употребление противовирусных агентов, особенно в условиях слабого или нераспространенного иммунного ответа, может привести к селекции мутантных штаммов, устойчивых к действию препаратов [72, 73]. Первичная профилактика используется в большом количестве центров трансплантации органов в ранний посттрансплантационный период, препаратом выбора в большинстве центров в США считается вальганцикловир, благодаря его повышенной биологической доступности и сниженному риску развития резистентности CMV к этому препарату [74].

Во многих центрах трансплантации у больных при трансплантации паренхиматозных органов и стволовых клеток для предупреждения CMV используется упреждающая терапия. При HSCT реципиенты проходят мониторинг на предмет CMV-виремии методом количественной ПЦР в реальном времени в течение первых 100 дней после трансплантации; в других центрах используется тест на исследование антигенемии. Не у всех больных с низким уровнем CMV виремии, который обнаруживается методом ПЦР, будет развиваться клиническая картина инфекционного процесса. Таким образом, конкретные центры и врачи нуждаются в определении и детерминации пороговой величины, для того чтобы минимизировать ненужные вмешательства. Через 100 дней после трансплантации ПЦР-контроль может быть прекращен у больных из группы низкого риска [59]. Больные из группы высокого риска продолжают еженедельно обследоваться на CMV-инфекцию поздней фазы, пока они не достигнут момента получения минимального количества препаратов-иммуносупрессоров, после чего в течение еще трех недель не будут получены отрицательные результаты [59]. При HSCT контроль поздней CMV-инфекции порог детекции CMV для начала противовирусной терапии обычно составляет 1000 копий/мл

или более чем в пять раз повышенная вирусная нагрузка по сравнению с исходно установленной для данного пациента [59].

Наконец, следует заметить, что CMV-инфекция сама по себе вызывает иммуносупрессию, кроме того, она ассоциирована с повышенным риском инфицирования другими возбудителями, в том числе вирусными (особенно вирусом Эпштейна—Барр), микотическими и бактериальными, что может привести к бактериемии [75]. Таким образом, контроль CMV-виремии критически важен при ведении больных после трансплантации не только для того, чтобы предупредить прямое патогенное действие вируса, но также минимизировать синергичное действие других патогенных инфекций.

### Вирус Эпштейна—Барр (EBV)



EBV — инфекция у лиц с нормальным иммунитетом обычно протекает как самоограничивающийся процесс; подобно CMV, развивается пожизненный иммунитет. Больные, у которых имеется острая иммуносупрессия, попадают в группу высокого риска развития EBV — связанных посттрансплантационных осложнений. В посттрансплантационный период EBV-инфекция у реципиентов бывает ассоциирована с гепатитом, гемофагоцитарным синдромом, а также EBV-ассоциированными лимфопролиферативными заболеваниями (*EBV-associated lymphoproliferative disorders*, EBV-LPD), которые также называют посттрансплантационными лимфопролиферативными нарушениями (*posttransplantation lymphoproliferative disorders*, PTLD). При EBV-LPD вирус EBV инфицирует покоящиеся В-клетки, вызывая их трансформацию до пролиферирующих бластных форм. Эти лимфобласты затем дифференцируются в покоящиеся В-клетки памяти, которые представляют собой долговременный резервуар латентной EBV-инфекции [76]. Инфицированные В-клетки, которые не способны установить или поддержать латентное состояние, экспрессируют вирусный антиген и, таким образом, становятся мишенью действия и разрушаются EBV-специфическими Т-клетками. Тем не менее в условиях иммуносупрессии Т-клеточный ответ со стороны хозяина может быть недостаточным для эффективного контроля репликации EBV в В-клетках, что приводит к высокому уровню EBV — виремии и вирус-стимулированной В-клеточной пролиферации.

Клинические проявления EBV-LPD в трансплантологии вариабельны [77]. У некоторых больных заболевание может протекать бессимптомно, у других могут проявиться неспецифические симптомы, такие как лихорадка, сонливость, потеря веса. У ряда больных развивается мононуклеозоподобный синдром [78]. Общий признак в результате лимфоидной пролиферации во внеузловых участках лимфатической системы (десны, подкожные ткани, легкие, печень и селезенка) — развитие лимфаденопатии [78].

Первичная посттрансплантационная EBV-инфекция представляет главный фактор риска развития EBV-LPD [79]. EBV-серонегативные

больные, получившие органы от сероположительных доноров (D+/R-), находятся в группе особого риска EBV-LPD. Риск EBV-LPD также повышается при повышении интенсивности иммуносупрессии и может быть связан с одновременным инфицированием CMV [80]. Эти факторы, вместе взятые, обуславливают намного более высокую частоту EBV-LPD у детей по сравнению со взрослыми больными [78]. Кроме того, определенные иммуносупрессирующие агенты могут обладать прямым пронеопластическим действием, который вносит вклад в развитие EBV-LPD, независимо от иммуномодулирующего действия [81].

При ранней диагностике EBV-LPD легко отзывается на ряд терапевтических воздействий [81, 82]. Интересно, что противовирусные препараты не оказывают достоверного эффекта при этом заболевании, преимущественно из-за того, что опухолевые клетки при EBV-LPD приобретают вторичную мутацию, обеспечивающую вирус-независимую пролиферацию [76]. Первичная терапия направлена на снижение иммуносупрессии, несмотря на повышение риска отторжения трансплантата или GVHD. При ранней форме болезни во многих случаях может быть лечебной снижение уровня иммуносупрессии вместе с местным контролем методом иссечения или радиотерапии [83]. Наиболее общепринятым методом тем не менее является редукция иммуносупрессии в комбинации с анти-B-клеточной терапией с использованием ретуксимаба — препарата химерных анти-CD20-антител [81, 82]. Терапия ретуксимабом хорошо переносится и высокоэффективна, особенно когда препарат назначается на ранней стадии развития заболевания. Она приводит к быстрой и полной реакции у большинства больных. У пациентов, для которых терапия ретуксимабом оказалась неэффективной, или у больных с диффузной формой болезни может быть эффективна комбинационная химиотерапия, такая как СНОР-терапия (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон), хотя такие методы лечения связаны с высокой токсичностью препарата.

Ранняя диагностика EBV-LPD критически важна для наилучшего терапевтического лечения с наименьшей токсичностью. В силу значимости быстрой диагностики T-клеточной пролиферации, связанной с EBV, некоторые центры трансплантологии ведут посттрансплантационных больных при помощи ПЦР-мониторинга. Различные группы исследователей отстаивали преимущества исследования проб цельной крови, мононуклеарных клеток периферической крови или бесклеточной плазмы. В целом все эти образцы обеспечивают достаточно высокую чувствительность, хотя сравнительные исследования позволяют предположить, что с бесклеточной плазмой может быть связана наивысшая специфичность в отношении EBV-LPD [84]. Многие авторы предпочитают превентивную терапию, при которой уровень детекции ДНК EBV превышает определенный порог, являющийся пусковым для редукции иммуносупрессии +/- терапия ретуксимабом. В настоящее время не существует руководств по ведению мониторинга EBV вiremии, тем не менее предполагается, что порог, равный 500–1000

вирусных копий, достаточен для начала упреждающей терапии, поскольку это уровень является предиктивным фактором клинических осложнений, связанных с EBV [85, 86]. Другие группы исследователей выступают в защиту так называемой «быстрой» терапии, при котором лечение запускается только при детекции ДНК EBV одновременно с проявлениями клинических симптомов EBV-LPD. Быстрая терапия, как показано, имеет такую же эффективность, что и упреждающая терапия [87]. Тем не менее, опираясь на то положение, что отсроченное лечение, начало которого переносится на момент проявления симптомов, может привести к более острому течению болезни, многие клиницисты до настоящего момента еще предпочитают упреждающий подход [82].

### **Вирусы простого герпеса 1 и 2 и вирус опоясывающего лишая (VZV)**

Вирусы простого герпеса (1 и 2) и вирус опоясывающего лишая (VZV) могут реактивироваться в течение посттрансплантационного периода. Лабораторные исследования на VZV и HSV чрезвычайно важны для трансплантированных больных и существенных для пациентов с атипичными проявлениями [88]. Типичные высыпания на рото-губной области или генитальные поражения очень часто повторяются и очень продолжительны в периоде иммуносупрессии. Повреждения кожи и слизистых могут вовлекать пищевод; серьезные повреждения, развившиеся из поражения слизистой рта, повышают риск бактериальной суперинфекции. Могут наблюдаться редкие осложнения, такие как пневмонит, энцефалит и гепатит. Дифференциальная диагностика с HSV-гепатитом должна рассматриваться у больных, предъявляющих жалобы на боли в животе, имеющих повышенные параметры печеночных показателей и резко выраженные нарушения свертывания крови [89]. Даже в отсутствие поражений кожи и слизистых в этих случаях следует давать в качестве профилактики ацикловир IV в высоких дозах до тех пор, пока не будет установлен точный диагноз (см. табл. 27.1). При оролабиальной и генитальной реактивации может быть проведено лечение пероральным приемом ацикловира, если не появятся признаки более широкого распространения заболевания или его диссеминации.

Примерно 90% больных пожилого возраста сероположительны по VZV, у больных более младшего возраста повышены иммунные реакции в связи с введением в США вакцинации против ветряной оспы в детском возрасте. Реактивация VZV широко распространена среди трансплантированных больных, проявляясь в среднем в 5 мес. после HSCT [90] и через 9 мес. после пересадки органов [91]. Больные, у которых развивается первичная инфекция ветряной оспы в период трансплантации, находятся в группе высокого риска осложнений после трансплантации [92], поэтому необходимо серологическое обследование до операции трансплантации, особенно в связи с тем, что



2–3% взрослых реципиентов могут быть серонегативными [93]. Наиболее распространенной формой VZV у трансплантированных больных является опоясывающий лишай, который обычно проявляется как зудящие болезненные высыпания по ходу распределения по коже. Реципиенты при трансплантации также могут жаловаться на диссеминированные высыпания, напоминающие сыпь при ветрянке [94]. В 25–35% случаев после эпизода ветряной оспы может иметь место постгерпетическая невралгия, вызывая хронические боли и слабость [95, 96]. У больных, у которых развилась ветряная оспа, часто применяются высокие дозы валацикловира, который имеет удобный режим редкого дозированного приема (см. табл. 27.1). Трансплантированные больные имеют также высокий риск развития острых инвазивных заболеваний, включая пневмонит, висцеральную VZV-инфекцию и энцефалит. VZV-энцефалит и висцеральная VZV-инфекция — заболевания, угрожающие жизни, которые проявляются острыми абдоминальными болями, — значительно повышают показатели функции печени и вызывают синдром неадекватной секреции АДГ (SIADH), который может присутствовать как перед высыпанием, так и при его отсутствии [97, 98]. Такие необычные проявления редки, но когда симптомы позволяют предположить VZV-инфекцию, пациента следует подвергнуть ПЦР-тестированию на ранних стадиях после трансплантации. Не следует откладывать терапию высокими дозами ацикловира IV до получения результатов диагностики (см. табл. 27.1).

Несмотря на то что острая форма болезни встречается достаточно редко, заболеваемость HSV и VZV значительная. Чтобы избежать осложнений, используются оба подхода — как профилактически-упреждающий, так и симптоматический, которые имеют своих сторонников. Исследования применения средних и низких доз ацикловира в течение посттрансплантационного периода показали значительное снижение осложнений, вызванных как VZV, так и HSV вирусами [99, 100]. Рекомендуется применение ацикловира или валацикловира по крайней мере в течение первого года после трансплантации и шести месяцев после прекращения иммуносупрессионной терапии [101]. Долговременная профилактика также применяется для предупреждения развития ацикловир-резистентных штаммов HSV [102]. Сравнительные исследования профилактического действия VZV- и HSV-антивирусных препаратов при HSCT малочисленны и в настоящее время не существует рекомендаций по долговременному их применению [103].

## HHV-6

HHV-6 представляет собой герпесвирус человека, который был идентифицирован как возбудитель детской краснухи (которая также называется «внезапная экзантема» или «шестая болезнь»), — одной из распространенных детских болезней, связанных с фебрильными высыпаниями [104]. Существует два подтипа HHV-6: тип А и тип В. Эти два подтипа обладают сходными биологическими свойствами и вы-

соким уровнем гомологии последовательностей, но вирусологически и эпидемиологически отчетливо различаются [105]. Большинство болезней детского возраста и осложнений трансплантации происходит при инфицировании HHV-6b. Подобно другим герпесвирусам, после первичного инфицирования вирус сохраняется в латентном состоянии в организме хозяина. Безвредный для людей с нормальным иммунитетом, при трансплантации HHV-6 может привести к развитию отсроченного приживления трансплантата после HSCT, высыпаниям на коже и тяжелому энцефалиту у трансплантированных больных [106, 107]. У больных с энцефалитом могут быть неясные симптомы с высокой вариабельностью от кратковременной потери памяти до общих выраженных судорог и припадков. МРТ-диагностика может показать нормальные параметры либо может обнаружить нарушения в средневисочных долях или диффузные нарушения мозга. Больные с изменениями на МРТ имеют худший прогноз [108]. Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ) может быть взята для подтверждения диагноза инфекции HHV-6. Поскольку не у всех больных с заболеваниями ЦНС, вызванными HHV-6, наблюдается вирусемия, больные с высоким уровнем вирусов входят в группу риска при развитии болезни [45, 106]. Ганцикловир или фоскарнет в высоких дозах представляют собой терапию выбора (см. табл. 27.1). К сожалению, несмотря на агрессивное лечение, есть строгая связь между заболеваемостью и смертностью [105].

### **Герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV/HHV-8)**

KSHV — вирус, который вызывает развитие саркомы Капоши и ассоциирован также с многоочаговой болезнью Кастлемана (МКБ) и первичной эффузионной лимфомой [109]. KSHV не очень распространен как причина клинических осложнений при трансплантации, но саркома Капоши (KS) составляет примерно 5,7% всех злокачественных процессов у трансплантированных больных при пересадке органов [110]. Частота злокачественных заболеваний может быть выше в регионах, эндемичных по вирусу KSHV. Возможны региональные различия в клинических проявлениях, поскольку реципиенты органов в США чаще имеют кожные проявления KS, в то время как за рубежом чаще встречается висцеральная форма болезни [111]. Пациенты с HSCT также входят в группу риска развития посттрансплантационного KS [112], KSHV может также привести к незлокачественным осложнениям, включая костномозговой синдром, гепатит и фебрильные заболевания [112–115]. Предполагается, что передача KSHV может осуществляться через донорский материал при HSCT, поскольку CD34+ гематопоэтические клетки-предшественники могут быть резервуаром вируса [116]. Показано, что цидофовир и вальганцикловир представляют возможность противовирусного действия в терапии, хотя в настоящее время не разработано рекомендаций по их применению (см. табл. 27.1) [48].

## Респираторные вирусы

Респираторные заболевания широко распространены среди трансплантированных больных, поскольку эти вирусы встречаются повсеместно в мире. Синдромы, вызванные этими инфекциями, показывают высокую степень перекрытия клинических симптомов, и в целом не представляется возможности отчетливо определить принадлежность этиологического агента к некоторой отдельной клинической группе. К сожалению, в иммунокомпрометированной популяции эти вирусы могут вызывать широкий спектр болезней, включая инфекции верхних дыхательных путей, пневмонию и/или обструктивную болезнь [117], с высокой заболеваемостью и смертностью [118]. Вирусы гриппа А и В, парагриппа, метапневмовирус, респираторный синцитиальный вирус и аденовирус могут быть ассоциированы с большим количеством острых и часто смертельных заболеваний нижних дыхательных путей, они являются важнейшими респираторными вирусами, которые ответственны за большинство осложнений трансплантированных реципиентов (табл. 27.2) [118]. Другие респираторные вирусы иногда бывают ассоциированы с острыми легочными осложнениями, угрожающими жизни [119].

Таблица 27.2

Респираторные вирусы и риск заболевания нижних дыхательных путей

Наиболее высокий риск	Наименьший риск
Аденовирус Грипп А Грипп В Метапневмовирус Вирус парагриппа Респираторный синцитиальный вирус	Бокавирус Коронавирус Риновирус <sup>a</sup>
<sup>a</sup> Редко ассоциирован с заболеваниями нижних дыхательных путей [119]	

При умеренной выраженности болезни у иммунокомпетентных больных редко требуют лабораторной оценки, точный диагноз становится важным при ведении больных при иммуносупрессии, для которых лабораторная диагностика респираторных вирусов дает много преимуществ. В случае нескольких лабораторных вирусов в настоящее время доступна эффективная противовирусная терапия (см. табл. 27.1), откуда ясно повышение важности специфической диагностики. Например, респираторный синцитиальный вирус (RSV) — распространенная причина тяжелой пневмонии у иммуносупрессированных больных [120]. К счастью, RSV-инфекция хорошо отвечает на терапию аэрозолитованным рибавирином, которая снижает смертность примерно до 20% [121]. Выживаемость может быть повышена при использовании аэрозолитованного рибавирина вместе с внутривенным введением иммуноглобулина или RSV-специфических моноклональных антител — паливизумаба [118]. Аналогично диагности-

ка вируса гриппа позволяет ускорить начало терапии ингибиторами нейраминидазы (например, озельтамивиром), в то время как аденовирусная пневмония может отреагировать на цидофовир [122]. Хотя для большинства респираторных вирусов нет одобренных протоколов терапии, специфическая диагностика может уменьшить количество противовирусных препаратов, которым подвергается пациент и которые не будут эффективны, а также позволяет вести новые и экспериментальные стратегии терапии и предоставляет информацию для контроля за инфекционными болезнями и эпидемиологией госпитальных инфекций.

В случае иммунокомпрометированных больных может быть проведено традиционное вирусологическое исследование, но молекулярные исследования предоставляют наибольшую пользу и становятся стандартом ведения больных в этих условиях. Показана наибольшая чувствительность молекулярно-диагностических тестов для диагностики респираторных вирусов в данном случае [123]. Как было замечено выше, клинические синдромы, вызванные респираторными вирусами, перекрываются, и поэтому в нескольких лабораториях используются подробные панели и мультиплексные подходы для их диагностики [123]. Большое количество производителей в настоящее время разрабатывают такие подробные панели и мультиплексные подходы. Сейчас только несколько тест-систем получили одобрение FDA, включая панель для детекции респираторных вирусов xTAG Respiratory Viral Panel (производитель Luminex Molecular Diagnostic), которая определяет 12 различных респираторных вирусов, и набор ProFlu+Assay (Prodesse), который обнаруживает RSV и вирусы гриппа А и В. В настоящее время начинают применяться новые методы исследования резистентных штаммов вируса гриппа, и они, видимо, будут использоваться все шире, поскольку число таких штаммов продолжает возрастать [124].

## Аденовирус

Семейство аденовируса ассоциировано с большим количеством осложнений при трансплантации, включая геморрагический цистит (HC), энтероколит, пневмонию, гепатит, энцефалит и диссеминированные болезни. Когда больной с соответствующими клиническими симптомами имеет документально подтвержденный аденовирус, выделенный из одного органа-мишени, идентифицируются специфические подтипы аденовируса. Диссеминированной формой называется случай, при котором вирус выделяется из одного или более органов [126]. Факторами риска развития инвазивной формы аденовирусной инфекции являются различные случаи, включая Т-клеточное истощение, детский возраст реципиента и неправильный подбор трансплантата [50, 127]. Диссеминированная болезнь, пневмония и гепатит обычно имеют плохой прогноз даже при проведении противовирусной терапии, при этом для лечения острой аденовирусной инфекции могут применяться

другие, менее специфические препараты (см. табл. 27.1) [125]. В ретроспективных исследованиях было показано, что после лечения цидофовиром снижается смертность больных [130–132], проспективные исследования позволяют предположить, что ответ на это препарат связан с клиническим ответом [133, 134]. Существуют также исследования *in vitro*, которые подтверждают, что рибавирин может быть эффективным при лечении [135]; тем не менее по этому вопросу мнения противоречивы, поскольку нерандомизированные исследования у людей показали различные результаты [136]. Упреждающий мониторинг аденовируса отстаивается некоторыми специалистами [126, 127], однако и это мнение не однозначно.

## Полиомавирусы



ВК- и JC-вирусы наиболее распространенные полиомавирусы, которые обычно приводят к несимптоматическим инфекциям у детей. После трансплантации в условиях иммуносупрессии оба вируса представляют угрозу жизни. При HSCT и трансплантации паренхиматозных органов часто реактивируется ВК-вирус, что может привести к НС [138, 139]. НС проявляется у больных как раздражение мочевого пузыря, с частым мочеиспусканием, болью, выраженной гематурией, и в острых случаях развитие болезни приводит к образованию сгустков и обструкции мочевого пузыря. Выделение вируса может обнаруживаться путем выявления цитологически аномальных клеток в моче (эпителиальных клеток с внутриядерным включением, также называемых «клетки-ловушки»), культуре или методом ПЦР-теста пробы мочи. Уровень ВК вирусии, видимо, не является предиктивным фактором развития цистита при HSCT, но вирусия ВК более 10 000 копий, по-видимому, предполагает риск развития НС [140]. Помимо НС важной причиной дисфункции трансплантата и отторжения пересаженной почки является ВК-нефропатия. Реципиенты при пересадке почки должны проходить скрининг на ВК-вирусием или вирусии, и в большинстве центров обычно проводится профилактика против ВК-нефропатии [141]. Хотя ВК-нефропатия может иметь место у больных после HSCT, она отмечается значительно реже. Снижение уровня иммуносупрессии эффективно у многих больных с вирусией, однако у больных с острой формой инфекции в качестве терапевтического выбора предлагается проводить терапию цидофовиром, лефлуноomidом, IVIG и фторхинолонами (см. табл. 27.1) [49].

Вирус JC — менее распространенный возбудитель у трансплантированных больных, но он может быть связан с изнуряющими состояниями. Вирус JC был ассоциирован с НС и нефропатией, это возбудитель прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (PML). Больные с PML обычно жалуются на вновь возникшие очаговые неврологические симптомы и/или изменения ментального состояния. Исследования ЦНС различными методами показывают рассеянные многоочаговые области демиелинизированного белого вещества, ко-

торые не изменяются при добавлении контрастного вещества [142]. Золотым стандартом диагностики считается биопсия мозга, полезным исследованием также оказался для многих больных ПЦР-анализ пробы СМЖ на JC-вирус. Отрицательный результат анализа не исключает РМЛ, но положительный результат образца СМЖ подтверждает диагноз и может быть полезным для определения долгосрочного прогноза [143, 144]. Терапевтическое воздействие ограничено и должно включать снижение иммуносупрессивной терапии, насколько это возможно. По некоторым сообщениям, был успешно использован цидофовир [145], однако другие авторы не подтвердили его эффективность [146, 147]. Новые данные, полученные *in vitro*, позволяют предположить, что ингибиторы обратного захвата серотонина, блокирующие 5HT<sub>2A</sub>R — рецептор JC-вируса, который используется для проникновения в глиальные клетки, также может представлять собой потенциальную возможность терапии в будущем [148]. Хотя JC-вирус редко является причиной осложнений при трансплантации, многие больные погибают даже после уменьшения иммуносупрессии и агрессивной противовирусной терапии [149, 150].

### Папилломавирус человека (HPV)

HPV ассоциирован с немеланомным раком кожи, раком шейки матки и анального отверстия. Иммуносупрессия, связанная с трансплантацией, может повышать риск развития любой из этих HPV-ассоциированных форм рака. Исследования женщин после трансплантации показали повышенный риск цервикальной дисплазии и рака шейки матки [151–153]. Немеланомный рак кожи после трансплантации, например сквамозноклеточная карцинома кожи, сильно ассоциирован с HPV. Этот вирус также чаще обнаруживается при таких видах рака у больных после трансплантации по сравнению с нормальными «хозяевами» [154–157]. Риск HPV-ассоциированного рака анального отверстия у трансплантированных больных также повышен [158, 159]. Терапия HPV-связанных видов рака ограничена иссечением, облучением и системной химиотерапией. Поскольку антивирусная терапия неэффективна при HPV-связанных видах рака, некоторые перспективы связывают с местным применением цидофовира для раннего лечения предраковых образований [160]. Поскольку HPV-заболевания можно предупредить, посттрансплантационные больные должны проходить ежегодные обследования кожи и делать мазки по Папаниколау. Более того, HPV-вакцина может стать в будущем одной из возможностей предупреждения этой инфекции у трансплантированных больных [151, 161].

### Новые вирусные инфекции

Большинство инфекций, обнаруживаемых при трансплантации у больных, подробно описаны, однако эти больные также входят в группу риска развития новых и атипично протекающих вирусных инфекций.

Например, при обнаружении в США вируса Западного Нила в качестве нового возбудителя было показано, что все трансплантированные больные входят в группу риска развития острой нейроинвазивной болезни [162, 163]. Скрининг доноров также становится важным для предупреждения вирусных инфекций, поскольку замечено, что трансплантированные больные имеют повышенный риск развития вирусных инфекций в результате контакта с кровью и ее производными, а также органами других людей [163–165]. Вероятность переноса вируса с органами или кровью является важным моментом, поскольку донор может болеть бессимптомно или быть носителем вируса, находящегося в его организме в латентном состоянии. В случае трансплантации органа от трупа вирус может быть неидентифицированной причиной гибели. Недавние примеры таких ситуаций включают WNV, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) [166] и вирус бешенства [167]. Кроме того, реципиенты органов входят в значимую группу населения, которая может служить для идентификации новых возбудителей — служить как «канарейка в угольной шахте». Так, например, аренавирус был обнаружен в пробах органов после смерти от острого фебрильного заболевания всех больных после трансплантации от одного донора. Этот донор умер от неизвестной причины, и позже выяснилось, что он был поражен тем же вирусом [168]. По мере появления новых возбудителей, распространяющихся по всему миру, можно ожидать, что эти вирусы будут приводить к заболеванию реципиентов. Для клинической вирусологической лаборатории важно быть осведомленными и готовыми к появлению новых вирусов и быть в курсе новых испытаний и технических решений, разрабатываемых для этих возбудителей.



## РЕЗЮМЕ

Вирусные инфекции — одна из основных причин заболеваемости и смертности у пациентов с иммунодефицитом; клиническая вирусологическая лаборатория имеет большое значение для диагностики и лечения этих возбудителей. Основными вирусными угрозами в данный момент, как правило, являются процесс предрасполагающего основного заболевания и причины иммунодефицита. Так как сроки терапии особенно важны для пациентов с ослабленным иммунитетом, тщательный мониторинг пациентов на вирусную инфекцию, как правило, при помощи молекулярных исследований, является важным компонентом надлежащего ведения трансплантированных больных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, et al. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis* 2002; 185:147–152.
2. Gnann JW Jr., Whitley RJ. Clinical practice. Herpes zoster. *N Engl J Med* 2002; 347:340–346.

3. Jumaan AO, Yu O, Jackson LA, et al. Incidence of herpes zoster, before and after varicella-vaccination-associated decreases in the incidence of varicella, 1992–2002. *J Infect Dis* 2005; 191:2002–2007.
4. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11:279–295.
5. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 2008; 28:1190–1199.
6. McNeil S, Halperin B, MacDonald N. Influenza in pregnancy: the case for prevention. *Adv Exp Med Biol* 2009; 634:161–183.
7. Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, et al. Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2006; 70:371–376.
8. Pesanti EL. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15:813–832.
9. Cheong HJ, Song JY, Park JW, et al. Humoral and cellular immune responses to influenza vaccine in patients with advanced cirrhosis. *Vaccine* 2006; 24:2417–2422.
10. Casanova JL, Fieschi C, Zhang SY, et al. Revisiting human primary immunodeficiencies. *J Intern Med* 2008; 264:115–127.
11. Humault-Berger M, Ifrah N, Solal-Celigny P. Intensive therapies in follicular non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002; 100:1141–1152.
12. Harousseau JL, Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2009; 360:2645–2654.
13. Baron F, Storb R. Hematopoietic cell transplantation after reduced-intensity conditioning for older adults with acute myeloid leukemia in complete remission. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:145–151.
14. Sorrow ML, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2008; 26:4912–4920.
15. Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008; 30:425–437.
16. Roux E, Helg C, Chapuis B, et al. T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Immunol* 1996; 48:135–138.
17. Hakki M, Riddell SR, Storek J, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 2003; 102:3060–3067.
18. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007; 110:4543–4551.
19. Abrahamsen IW, Somme S, Heldal D, et al. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica* 2005; 90:86–93.
20. Storek J, Ferrara S, Ku N, et al. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:387–398.
21. Buser A, Stern M, Arber C, et al. Impaired B-cell reconstitution in lymphoma patients undergoing allogeneic HSCT: an effect of pretreatment with rituximab? *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 483–487.



22. Hambach L, Stadler M, Dammanrt E, et al. Increased risk of complicated CMV infection with the use of mycophenolate mofetil in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:903-906.
23. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, et al. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:543-558.
24. Issa NC, ГГибридизация in situman JA. Infectious complications of anti-lymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; 48:772-786.
25. Mueller NJ. New immunosuppressive strategies and the risk of infection. *Transpl Infect Dis* 2008; 10:379-384.
26. Charpentier B, Rostaing L, Berthou X, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75:844-851.
27. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant* 2006; 6:1111-1131.
28. Schadde E, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Alemtuzumab induction and triple maintenance immunotherapy in kidney transplantation from donors after cardiac death. *Transpl Int* 2008; 21:625-636.
29. Taherimahmoudi M, Ahmadi H, Baradaran N, et al. Cytomegalovirus infection and disease following renal transplantation: preliminary report of incidence and potential risk factors. *Transplant Proc* 2009; 41:2841-2844.
30. Brerman DC, Daller JA, Lake KD, et al. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355:1967-1977.
31. Husain S, Singh N. The impact of novel immunosuppressive agents on infections in organ transplant recipients and the interactions of these agents with antimicrobials. *Clin Infect Dis* 2002; 35:53-61.
32. Mattei MF, Redornet M, Gandjbakhch I, et al. Lower risk of infectious deaths in cardiac transplant patients receiving basiliximab versus anti-thymocyte globulin as induction therapy. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26:693-699.
33. Filipe R, Mota A, Alves R, et al. Kidney transplantation with corticosteroid-free maintenance immunosuppression: a single center analysis of graft and patient survivals. *Transplant Proc* 2009; 41:843-845.
34. Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008; 134:1789-1801.
35. Liu J, Farmer JD Jr., Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66:807-815.
36. Morath C, Arns W, Schwenger V, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (suppl 8):viii61-viii65.
37. Strangfeld A, Listing J, Herzer P, et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA* 2009; 301:737-744.
38. Lill J, Bauer LA, Horn JR, et al. Cyclosporine-drug interactions and the influence of patient age. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57:1579-1584.
39. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, et al. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose require-

- ments in Caucasian liver transplant patients. *Ann Transplant* 2009; 14:23–31.
40. Marty FM, Lowry CM, Cutler CS, et al. Voriconazole and sirolimus coadministration after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:552–559.
41. Nowack R. Herb-drug interactions in nephrology: documented and theoretical. *Clin Nephrol* 2008; 69:319–325.
42. Kuypers DR. Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring. *Ann Transplant* 2008; 13:11–18.
43. Wavamunno MD, Chapman JR. Individualization of immunosuppression: concepts and rationale. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13:604–608.
44. Sanchez Fructuoso AI, de la Higuera MA, Garcia-Ledesma P, et al. Graft outcome and mycophenolic acid trough level monitoring in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41:2102–2103.
45. Zerr DM, Gupta D, Huang ML, et al. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:309–317.
46. Casper C, Krantz EM, Corey L, et al. Valganciclovir for suppression of human herpesvirus-8 replication: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Infect Dis* 2008; 198:23–30.
47. De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, et al. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol* 2001; 11:381–395.
48. Mazzi R, Parisi SG, Sarmati L, et al. Efficacy of cidofovir on human herpesvirus 8 viraemia and Kaposi's sarcoma progression in two patients with AIDS. *AIDS* 2001; 15:2061–2062.
49. Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, et al. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation* 2009; 87:621–630.
50. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:704–715.
51. Deffrasnes C, Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28:213–221.
52. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004; 103:2003–2008.
53. Bacigalupo A, Tedone E, Sanna MA, et al. CMV infections following allogeneic BMT: risk factors, early treatment and correlation with transplant related mortality. *Haematologica* 1992; 77:507–513.
54. Boeckh M. Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis* 1999; 1:165–178.
55. Cornelissen JJ, Carston M, Kollman C, et al. Unrelated marrow transplantation for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome. *Blood* 2001; 97:1572–1577.
56. Broers AE, van der Holt R, van Esser JW, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95:2240–2245.
57. Kanter J, Pallardo L, Gavela E, et al. Cytomegalovirus infection renal transplant recipients: risk factors and outcome. *Transplant Proc* 2009; 41:2156–2158.

58. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 2001; 98:2043-2051.
59. Boeckh M, Ljungman R. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113:5711-5719.
60. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003; 101:407-414.
61. Zaia JA, Gallez-Hawkins GM, Tegtmeier BR, et al. Late cytomegalovirus disease in marrow transplantation is predicted by virus load in plasma. *J Infect Dis* 1997; 176:782-785.
62. Krause H, Hebart H, Jahn G, et al. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:1111-1116.
63. Fisher RA. Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 2009; 11:195-202.
64. Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, et al. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation* 2004; 78:1390-1396.
65. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, et al. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 47:875-882.
66. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1094-1097.
67. Ljungman P, Engelhard D, Link H, et al. Treatment of interstitial pneumonia due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin Infect Dis* 1992; 14:831-835.
68. Enright H, Haake R, Weisdorf D, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* 1993; 55:1339-1346.
69. Kalil AC, Levitaky J, Lyden E, et al. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med* 2005; 143:870-880.
70. Small LN, Lau J, Snyderman DR. Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clin Infect Dis* 2006; 43:869-880.
71. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, et al. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood* 1997; 90:2502-2508.
72. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, et al. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant* 2008; 22:162-170.
73. Limaye AP. Antiviral resistance in cytomegalovirus: an emerging problem in organ transplant recipients. *Semin Respir Infect* 2002; 17:265-273.
74. Perrottet N, Decosterd LA, Meylan P, et al. Valganciclovir in adult solid organ transplant recipients: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and clinical interpretation of plasma concentration measurements. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48:399-418.
75. Boeckh M, Nichols WG. Immunosuppressive effects of beta-herpesviruses. *Herpes* 2003; 10:12-16.

76. Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 350:1328–1337.
77. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56:155–167.
78. Penn I. Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 2000; 23:101–113.
79. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4 (suppl) 10:59–65.
80. Manez R, Breinig MK, Linden P, et al. Factors associated with the development of post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) in Epstein-Barr virus (EBV)-seronegative adult liver transplant recipients. *Transpl Int* 1994; 7 (suppl 1):S235-S237.
81. Everly MJ, Bloom RD, Tsai DE, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder. *Ann Pharmacother* 2007; 41:1850–1858.
82. Meijer E, Cornelissen JJ. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients. *Curr Opin Hematol* 2008; 15:576–585.
83. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, et al. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. *Transplantation* 1999; 67:990–998.
84. Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, et al. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 2001; 72: 1012–1019.
85. Frias C, Lauzurica R, Bayes B, et al. Prospective follow-up of Epstein-Barr virus load in adult kidney transplant recipients by semiquantitative polymerase chain reaction in blood and saliva samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:892–895.
86. Meerbach A, Wutzler P, Hafer R, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 2008; 80:441–154.
87. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004; 103:3979–3981.
88. Young JA. Infectious complications of acute and chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21:343–356.
89. Basse G, Mengelle C, Kamar N, et al. Disseminated herpes simplex type-2 (HSV-2) infection after solid-organ transplantation. *Infection* 2008; 36:62–64.
90. Steer CB, Szer J, Sasadeusz J, et al. Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:657–964.
91. Gourishankar S, McDermid JC, Jhangri GS, et al. Herpes zoster infection following solid organ transplantation: incidence, risk factors and outcomes in the current immunosuppressive era. *Am J Transplant* 2004; 4:108–115.
92. Pandya A, Wasfy S, Hebert D, et al. Varicella-zoster infection in pediatric solid-organ transplant recipients: a hospital-based study in the prevaricella vaccine era. *Pediatr Transplant* 2001; 5:153–159.

93. Geel AL, Landman TS, Kal JA, et al. Varicella zoster virus serostatus before and after kidney transplantation, and vaccination of adult kidney transplant candidates. *Transplant Proc* 2006; 38:3418-3419.
94. Fehr T, Bossart W, Wahl C, et al. Disseminated varicella infection in adult renal allograft recipients: four cases and a review of the literature. *Transplantation* 2002; 73:608-611.
95. Onozawa M, Hashino S, Haseyama Y, et al. Incidence and risk of postherpetic neuralgia after varicella zoster virus infection in hematopoietic cell transplantation recipients: Hokkaido Hematology Study Group. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15:724-729.
96. Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, et al. Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6:44-49.
97. Rau R, Fitzhugh CD, Baird K, et al. Triad of severe abdominal pain, inappropriate antidiuretic hormone secretion, and disseminated varicella-zoster virus infection preceding cutaneous manifestations after hematopoietic stem cell transplantation: utility of PCR for early recognition and therapy. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:265-268.
98. Pergam S, Erard V, Delaney C, et al. Varicella zoster virus CNS disease in hematopoietic cell transplantation: a single center experience. *Int J Infect Dis* 2008; 12:S21-S21.
99. Erard V, Guthrie KA, Varley C, et al. One-year acyclovir prophylaxis for preventing varicella-zoster virus disease after hematopoietic cell transplantation: no evidence of rebound varicella-zoster virus disease after drug discontinuation. *Blood* 2007; 110:3071-3077.
100. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, et al. Long-term ultra-low-dose acyclovir against varicella-zoster virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2008; 83:472-476.
101. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15:1143-1238.
102. Erard V, Wald A, Corey L, et al. Use of long-term suppressive acyclovir after hematopoietic stem-cell transplantation: impact on herpes simplex virus (HSV) disease and drug-resistant HSV disease. *J Infect Dis* 2007; 196:266-270.
103. Miller GG, Dummer JS. Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *Am J Transplant* 2007; 7:741-747.
104. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005; 352:768-776.
105. Zerr DM. Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 2006; 37 (suppl 1):S52-S56.
106. Zerr DM, Corey L, Kim HW, et al. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005; 40:932-940.
107. Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 2002; 185:847-853.
108. Noguchi T, Mihara F, Yoshiura T, et al. MR imaging of human herpesvirus-6 encephalopathy after hematopoietic stem cell transplantation in adults. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27:2191-2195.
109. Casper C. New approaches to the treatment of human herpesvirus 8-associated disease. *Rev Med Virol* 2008; 18:321-329.

110. Perm I. Kaposi's sarcoma in transplant recipients. *Transplantation* 1997; 64:669-673.
111. Woodle ES, Hanaway M, Buell J, et al. Kaposi sarcoma: an analysis of the US and international experiences from the Israel Perm International Transplant Tumor Registry. *Transplant Proc* 2001; 33:3660-3661.
112. Luppi M, Barozzi P, Rasini V, et al. HHV-8 infection in the transplantation setting: a concern only for solid organ transplant patients? *Leuk Lymphoma* 2002; 43:517-522.
113. Luppi M, Barozzi P, Schulz TF, et al. Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343:1378-1385.
114. Luppi M, Barozzi P, Schulz TF, et al. Nonmalignant disease associated with human herpesvirus 8 reactivation in patients who have undergone autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2000; 96:2355-2357.
115. Palencia SI, Rodriguez-Peralto JL, Castano E, et al. Kaposi's sarcoma after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Int J Dermatol* 2003; 42:647-649.
116. Wu W, Vieira J, Fiore N, et al. KSHV/HHV-8 infection of human hematopoietic progenitor (CD34+) cells: persistence of infection during hematopoiesis in vitro and in vivo. *Blood* 2006; 108:141-151.
117. Erard V, Chien JW, Kim HW, et al. Airflow decline after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation: the role of community respiratory viruses. *J Infect Dis* 2006; 193:1619-1625.
118. Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2008; 143:455-467.
119. Gutman JA, Peck AJ, Kuypers J, et al. Rhinovirus as a cause of fatal lower respiratory tract infection in adult stem cell transplantation patients: a report of two cases. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:809-811.
120. Ebbert JO, Limper AH. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration* 2005; 72:263-269.
121. Boeckh M, Englund J, Li Y, et al. Randomized controlled multicenter trial of aerosolized ribavirin for respiratory syncytial virus upper respiratory tract infection in hematopoietic cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007; 44:245-249.
122. Yusuf U, Hale GA, Carr J, et al. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 2006; 81:1398-1404.
123. Kuypers J, Campbell AP, Cent A, et al. Comparison of conventional and molecular detection of respiratory viruses in hematopoietic cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11:298-303.
124. Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients -Seattle, Washington, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:893-896.
125. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2006; 43:331-339.
126. Chakrabarti S, Milligan DW, Moss PA, et al. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:873-885.
127. Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, et al. Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis* 2007; 9:108-113.

128. Wang WH, Wang HL. Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:e246-e248.
129. Bertheau P, Parquet N, Ferchal F, et al. Fulminant adenovirus hepatitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17:295-298.
130. Bordigoni P, Carret AS, Venard V, et al. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1290-1297.
131. Nagafuji K, Aoki K, Henzan H, et al. Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34:909-914.
132. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:481-486.
133. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, et al. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38:45-52.
134. Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, et al. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7:388-394.
135. Morfin F, Dupuis-Girod S, Frobert E, et al. Differential susceptibility of adenovirus clinical isolates to cidofovir and ribavirin is not related to species alone. *Antivir Ther* 2009; 14:55-61.
136. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res* 2006; 71:172-180.
137. Anderson EJ, Guzman-Cottrill JA, Kletzel M, et al. High-risk adenovirus-infected pediatric allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients and preemptive cidofovir therapy. *Pediatr Transplant* 2008; 12:219-227.
138. Erard V, Storer B, Corey L, et al. BK virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients: frequency, risk factors, and association with postengraftment hemorrhagic cystitis. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1861-1865.
139. de Bruyn G, Limaye AP. BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients. *Rev Med Virol* 2004; 14:193-205.
140. Erard V, Kim HW, Corey L, et al. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2005; 106:1130-1132.
141. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79:1277-1286.
142. Lima MA, Hanto DW, Curry MP, et al. Atypical radiological presentation of progressive multifocal leukoencephalopathy following liver transplantation. *J Neurovirol* 2005; 11:46-50.
143. Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, et al. Relation of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in acquired immunodeficiency syndrome patients with biopsy-proven progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1999; 45:816-821.
144. Bossolasco S, Calori G, Moretti F, et al. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis* 2005; 40:738-744.

145. Viillard JF, Lazaro E, Lafon ME, et al. Successful cidofovir therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy preceding angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005; 46:1659–1662.
146. Marra CM, Rajicic N, Barker DE, et al. A pilot study of cidofovir for progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. 2002; 16:1791–1797.
147. Osorio S, de la Camara R, Golbano N, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after stem cell transplantation, unsuccessfully treated with cidofovir. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30:963–966.
148. Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, et al. Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. *Microbiol Immunol* 2009; 53:496–501.
149. Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Greene J, et al. Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39:101–107.
150. Shitrit D, Lev N, Bar-Gil-Shitrit A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Transpl Int* 2005; 17:658–665.
151. Savani BN, Stratton P, Shenoy A, et al. Increased risk of cervical dysplasia in long-term survivors of allogeneic stem cell transplantation-implications for screening and HPV vaccination. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:1072–1075.
152. Paternoster DM, Cester M, Resente C, et al. Human papilloma virus infection and cervical intraepithelial neoplasia in transplanted patients. *Transplant Proc* 2008; 40:1877–1880.
153. Ozsaran AA, Ates T, Dikmen Y, et al. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20:127–130.
154. Stockfleth E, Nindl I, Sterry W, et al. Human papillomaviruses in transplant-associated skin cancers. *Dermatol Surg* 2004; 30:604–609.
155. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000; 61:289–297.
156. Purdie KJ, Suretheran T, Sterling JC, et al. Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 2005; 125:98–107.
157. Meyer T, Arndt R, Nindl I, et al. Association of human papillomavirus infections with cutaneous tumors in immunosuppressed patients. *Transpl Int* 2003; 16:146–153.
158. Albright JB, Bonatti H, Stauffer J, et al. Colorectal and anal neoplasms following liver transplantation [published online ahead of print March 26, 2009]. *Colorectal Dis*.
159. Patel HS, Silver AR, Northover JM. Anal cancer in renal transplant patients. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:1–5.
160. Coremans G, Snoeck R. Cidofovir: clinical experience and future perspectives on an acyclic nucleoside phosphonate analog of cytosine in the treatment of refractory and premalignant HPV-associated anal lesions. *Expert Opin Pharmacother* 2009; 10:1343–1352.
161. Savani BN, Goodman S, Barrett AJ. Can routine posttransplant HPV vaccination prevent commonly occurring epithelial cancers after allogeneic stem cell transplantation? *Clin Cancer Res* 2009; 15:2219–2221.



162. DeSalvo D, Roy-Chaudhury P, Peddi R, et al. West Nile virus encephalitis in organ transplant recipients: another high-risk group for meningoencephalitis and death. *Transplantation* 2004; 77: 466–469.
163. Hong DS, Jacobson KL, Raad II, et al. West Nile encephalitis in 2 hematopoietic stem cell transplant recipients: case series and literature review. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1044–1049.
164. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus infections in organ transplant recipients—New York and Pennsylvania, August–September, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54:1021–1023.
165. Stramer SL, Fang CT, Foster GA, et al. West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004. *N Engl J Med* 2005; 353:451–459.
166. Brief report: lymphocytic choriomeningitis virus transmitted through solid organ transplantation—Massachusetts, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:799–801.
167. Lapierre V, Tiberghien P. Transmission of rabies from an organ donor. *N Engl J Med* 2005; 352:2552; author reply 2552.
168. Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 2008; 358:991–998.



# ОГЛАВЛЕНИЕ

Краткое оглавление . . . . .	3
Авторы . . . . .	5
Посвящение Эдвину А. Леннету . . . . .	9
Введение . . . . .	11
<b>1. Проверка точности и достоверности лабораторных вирусологических тестов в клинической диагностической лаборатории . . . . .</b>	<b>13</b>
Введение . . . . .	13
Контроль качества и проверка результатов . . . . .	14
Проверка точности и достоверности тестов или тест-систем, применяемых в диагностической лаборатории . . . . .	14
Минимальные требования к проверке достоверности результатов регламентированных FDA и/или IVD/CE тестов и тест-систем, предназначенных для определения вирусспецифичных антител, вирусных антигенов и нуклеиновых кислот вирусов . . . . .	18
Минимальные требования к проверке точности результатов разработанных в лаборатории тестов и тест-систем, предназначенных для определения вирусспецифичных антител, вирусных антигенов и нуклеиновых кислот . . . . .	20
Процедуры, необходимые для внедрения разработанного в лаборатории теста для выявления нуклеиновых кислот в диагностическую практику . . . . .	22
Дополнительные этапы проверки точности результатов разработанных в лаборатории тестов или тест-систем . . . . .	23
Проверка достоверности выделения вирусов на клеточных культурах . . . . .	24
Заключение . . . . .	24
Литература . . . . .	25
<b>2. Статистический анализ результатов диагностических тестов . . . . .</b>	<b>26</b>
Введение . . . . .	26
Статистический анализ бинарных тестов . . . . .	27
Вероятности классификации . . . . .	27
Прогностическая ценность . . . . .	29
Другие показатели качества данных . . . . .	31
Сравнение бинарных тестов . . . . .	32
Статистический анализ непрерывных (параметрических) тестов . . . . .	33
Кривая ошибок (ROC-кривая) . . . . .	33
Суммарная оценка кривой ошибок . . . . .	35
Другие способы оценки качества теста . . . . .	36
Сравнение непрерывных тестов . . . . .	36
Неоднозначные результаты теста . . . . .	37
Рекомендации по планированию эксперимента . . . . .	38
Стадии исследования . . . . .	38

План исследования . . . . .	38
Вопросы, не рассмотренные в главе . . . . .	39
Литература . . . . .	40
<b>3. Методы молекулярной амплификации в диагностике</b>	
<b>вирусных инфекций . . . . .</b>	<b>42</b>
Введение . . . . .	42
Циклические методы амплификации . . . . .	43
Полимеразная цепная реакция . . . . .	43
Методы регистрации результата ПЦР . . . . .	44
ПЦР в реальном времени . . . . .	45
Каскадная (вложенная) ПЦР . . . . .	46
Мультиплексная ПЦР . . . . .	48
Количественная ПЦР . . . . .	48
Другие методы направленной амплификации . . . . .	49
Амплификация, основанная на последовательности нуклеотидов . . . . .	49
Амплификация, опосредованная транскрипцией . . . . .	51
Амплификация с вытеснением цепи . . . . .	51
Амплификация по типу катящегося кольца . . . . .	54
Изотермическая амплификация, опосредованная петлей . . . . .	54
Методы амплификации зондов . . . . .	55
Лигазная цепная реакция . . . . .	55
Технология зондового цикла . . . . .	56
Методы амплификации сигнала . . . . .	57
Разветвленная ДНК . . . . .	57
Гибридный захват . . . . .	59
Метод защиты гибридизацией . . . . .	59
Выделение новых вирусов . . . . .	61
Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов кДНК, позволяющий обнаружить новые вирусы . . . . .	62
ДНК-микрочипы широкой специфичности . . . . .	63
Неспецифичная ПЦР-амплификация и высокопроизводительное секвенирование . . . . .	63
Ограничения применения молекулярной амплификации в вирусологической диагностике . . . . .	65
Заключение . . . . .	66
Литература . . . . .	68
<b>4. Генотипирование вирусов и секвенирование вирусных геномов</b>	<b>73</b>
Введение . . . . .	73
Мутации вирусов . . . . .	73
Определение генотипов . . . . .	75
Рекомбинация . . . . .	77
Филогенетический анализ . . . . .	78
Методология генотипирования. Традиционные методики . . . . .	79
Традиционные методы секвенирования . . . . .	81
Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов . . . . .	81

ПЦР и специфичные к генотипу праймеры . . . . .	82
Обращенно-фазная гибридизация . . . . .	82
Анализ подвижности гетеродуплексов . . . . .	82
Новые методы генотипирования . . . . .	83
Масс-спектрометрия . . . . .	83
Микрочипы . . . . .	84
Массовое высокопроизводительное секвенирование . . . . .	84
Высокопроизводительное пиросеквенирование . . . . .	88
Патогенез вирусных заболеваний . . . . .	89
Ответ на лечение . . . . .	90
Анализ квазивидов вирусов . . . . .	90
Выявление устойчивости к терапии . . . . .	91
Описание новых вирусов . . . . .	94
Молекулярная эпидемиология . . . . .	95
Заключение . . . . .	95
Благодарности . . . . .	95
Литература . . . . .	96
<b>5. Разработка молекулярных вирусологических тестов . . . . .</b>	<b>103</b>
Введение . . . . .	103
Биологические причины вариации геномных последовательностей . . . . .	103
Цели и методология тестирования . . . . .	105
Основные проблемы молекулярных тестов . . . . .	107
Стратегии отбора потенциальных целевых последовательностей . . . . .	109
Источники данных о секвенированных вирусных геномах . . . . .	110
Курируемые базы данных нуклеотидных последовательностей вирусов . . . . .	110
Прочие открытые базы данных нуклеотидных последовательностей . . . . .	111
Анализ последовательностей . . . . .	114
Оценка качества определения последовательности . . . . .	115
Построение множественных выравниваний . . . . .	115
Создание репрезентативного набора последовательностей . . . . .	117
Прочие инструменты биоинформатики . . . . .	121
Разрешение проблем, связанных с неизбежной гетерогенностью целевых последовательностей . . . . .	122
Заключение . . . . .	123
Литература . . . . .	124
<b>6. Обнаружение вирусов при помощи микрочипов . . . . .</b>	<b>127</b>
Введение в метод микрочипов . . . . .	127
Форматы микрочипов, используемые для диагностики . . . . .	129
Методики амплификации и внесения метки . . . . .	129
Подложки для микрочипов и синтез зондов . . . . .	132
Выявление нуклеиновых кислот при помощи твердофазных микрочипов . . . . .	133
Секвенирующие микрочипы . . . . .	138

Проточные и 3D/4D микрочипы . . . . .	140
Суспензионные микрочипы . . . . .	140
Универсальные микрочипы . . . . .	142
Юридические аспекты использования диагностических методов, основанных на применении микрочипов . . . . .	142
Контроль качества и проверка получаемых результатов . . . . .	143
Примеры использования микрочипов для обнаружения и диагностики вирусов . . . . .	143
Скрининг вирусов в крови . . . . .	144
Обнаружение респираторных вирусов . . . . .	144
Вирусные инфекции центральной нервной системы . . . . .	147
Выявление и дифференциация герпесвирусов . . . . .	147
Выявление и дифференциация поксвирусов и герпесвирусов . . . . .	148
Вирусные инфекции желудочно-кишечного тракта . . . . .	148
Анализ серотипов, вариантов и генотипов вирусов при помощи микрочипов . . . . .	148
Дифференциация типов папилломавируса человека . . . . .	148
Анализ гематогенных вирусов при помощи микрочипов . . . . .	149
Анализ и надзор за респираторными вирусами при помощи микрочипов . . . . .	151
Идентификация штаммов вируса гриппа В . . . . .	152
Серотипирование пикорнавирусов . . . . .	154
Серотипирование ADV . . . . .	154
Анализ вирусов желудочно-кишечного тракта при помощи микрочипов . . . . .	155
Генотипирование вируса кори . . . . .	156
Генотипирование VZV . . . . .	157
Анализ вируса оспы . . . . .	157
Заключение . . . . .	157
Литература . . . . .	158
<b>7. Выделение вирусов . . . . .</b>	<b>163</b>
Введение . . . . .	163
Традиционные культуральные методы . . . . .	164
Типы клеточных культур . . . . .	164
Отбор, транспортировка и обработка образцов . . . . .	165
Инокуляция и инкубация . . . . .	166
Микроскопические исследования монослоев клеточных культур . . . . .	167
Гемадсорбция . . . . .	168
Точная идентификация штамма вируса . . . . .	169
Вирусы, выделенные в клеточных культурах . . . . .	170
Случайная контаминация клеточных культур . . . . .	174
Выявление неизвестных возбудителей инфекций . . . . .	174
Преимущества и недостатки выделения вирусов с использованием традиционных клеточных культур . . . . .	175
Ускоренные культуральные методы . . . . .	176
Центрифугированные культуры (однослойные культуры клеток) . . . . .	176

Смешанные клеточные культуры и смеси антител . . . . .	178
Генетически модифицированные клеточные линии . . . . .	181
Криоконсервированные клетки . . . . .	182
Заключение . . . . .	182
Литература . . . . .	184
<b>8. Диагностика при помощи обнаружения вирусных антигенов . . . . .</b>	<b>189</b>
Введение . . . . .	189
Теоретические основы взаимодействия антител с антигенами . . . . .	190
Антиген . . . . .	190
Основы кинетики иммунных методов . . . . .	191
Описание методик выявления вирусных антигенов . . . . .	192
Выявление вирусных антигенов при помощи реакции иммунофлуоресценции . . . . .	192
Выявление вирусных антигенов с использованием радиоиммунного анализа . . . . .	194
Выявление вирусных антигенов при помощи иммуноферментных методов . . . . .	195
Системы на основе авидина—биотина . . . . .	199
Метод агглютинации латексных частиц . . . . .	200
Выявление вирусных антигенов при помощи мембранного иммуноферментного анализа . . . . .	200
Иммунофлуориметрия в реальном времени . . . . .	203
Белковые чипы . . . . .	203
Диагностические методики на основе нанотехнологий . . . . .	204
Факторы, влияющие на работу иммунологических методов . . . . .	205
Отбор образцов . . . . .	205
Антитела . . . . .	205
Конъюгаты . . . . .	206
Флуоресцентная микроскопия . . . . .	207
Твердые подложки . . . . .	207
Ферменты . . . . .	208
Субстраты . . . . .	209
Неспецифические реакции . . . . .	210
Фиксация и фиксирующие реактивы . . . . .	213
Заливочная среда . . . . .	213
Автоматизация . . . . .	214
Отчеты о результатах диагностики при помощи иммунологических методов . . . . .	215
Отказ от правовой ответственности . . . . .	216
Литература . . . . .	216
<b>9. Серологические тесты в клинической вирусологии . . . . .</b>	<b>222</b>
Введение . . . . .	222
Антительный ответ на вирусные инфекции . . . . .	224
Процедуры обнаружения противовирусных антител . . . . .	225
Сбор и обработка образцов . . . . .	226

Твердофазный иммуноанализ . . . . .	227
Иммунофлуоресцентный анализ . . . . .	230
Пробы агглютинации . . . . .	232
Иммуноблотинг . . . . .	233
Пробы avidности IgG . . . . .	235
Пробы со сложными микросферами . . . . .	236
Автоматизация . . . . .	238
Интерпретация серологических результатов . . . . .	240
Литература . . . . .	242
<b>10. Хирургическая патология и цитология вирусных инфекций . . . . .</b>	<b>247</b>
Введение . . . . .	247
Подготовка и деление образцов . . . . .	248
Сравнение гистопатологии и цитопатологии . . . . .	248
Общий подход к выявлению вирусов в тканях . . . . .	250
Гистологические и цитологические признаки инфекции специфическими вирусами . . . . .	254
ДНК-вирусы . . . . .	254
РНК-вирусы . . . . .	264
Системные заболевания, связанные с различными группами вирусов . . . . .	269
Благодарности . . . . .	273
Литература . . . . .	273
<b>11. Электронная микроскопия вирусных инфекций . . . . .</b>	<b>278</b>
Введение . . . . .	278
Методы . . . . .	278
Негативное окрашивание . . . . .	278
Изготовление тонких срезов . . . . .	281
Клинические образцы . . . . .	286
Стул . . . . .	286
Моча . . . . .	292
Жидкость волдырей . . . . .	293
Кровь и сыворотка крови . . . . .	295
Назофарингеальные жидкости, легочные смывы, плевральные выпоты . . . . .	295
Спинальная жидкость . . . . .	297
Другие жидкости . . . . .	297
Ткани . . . . .	298
ЭМ при новых вирусных болезнях и надзор за биотерроризмом . . . . .	305
Клеточные культуры . . . . .	306
Мониторинг . . . . .	306
Процедуры . . . . .	306
Структуры, которые можно принять за вирусы . . . . .	307
Безопасность . . . . .	307
Заключение . . . . .	307
Литература . . . . .	308

<b>12. Лабораторная диагностика вирусов в условиях ограниченных ресурсов . . . . .</b>	<b>312</b>
Вирусы, передаваемые с кровью . . . . .	313
ВИЧ . . . . .	313
Вирусы гепатита В и С . . . . .	315
Скрининг банка крови на вирусы . . . . .	316
Респираторные вирусы . . . . .	316
Вирус гриппа . . . . .	318
Желудочно-кишечные вирусы . . . . .	319
Вирусы, ассоциированные с гастроэнтеритом . . . . .	319
Вирусы гепатитов А и Е . . . . .	320
Вирус полиомиелита . . . . .	320
Вирусы кожи и слизистых оболочек . . . . .	320
Вирус простого герпеса . . . . .	320
Вирус варицелла зостер . . . . .	322
Онкогенные вирусы . . . . .	322
Вирус Эпштейна—Барр . . . . .	322
Вирус папилломы человека . . . . .	322
Вирусные болезни детского возраста: корь, эпидемический паротит и краснуха . . . . .	323
Вирусы, передаваемые членистоногими . . . . .	324
Общие соображения о лабораторной практике . . . . .	324
Выводы . . . . .	326
Литература . . . . .	326
<b>13. Противовирусная терапия . . . . .</b>	<b>332</b>
Введение . . . . .	332
Терапия респираторных вирусных инфекций . . . . .	333
Грипп . . . . .	333
Амантадин, римантадин: адамантаны . . . . .	333
Занамивир, озелтамивир: ингибиторы нейраминидазы . . . . .	334
Респираторно-синцитиальный вирус . . . . .	335
Рибавирин . . . . .	335
Терапия вирусного герпеса . . . . .	336
Ацикловир, валацикловир . . . . .	336
Пенцикловир, фамцикловир . . . . .	338
Ганцикловир, валганцикловир . . . . .	338
Цидофовир . . . . .	339
Фоскарнет . . . . .	340
Трифлуридин . . . . .	341
Терапия вирусного гепатита . . . . .	341
Ламивудин . . . . .	341
Адефовир . . . . .	342
Тенофовир . . . . .	343
Энтекавир . . . . .	343



Телбивудин . . . . .	344
Интерфероны . . . . .	344
Терапия пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека . . . . .	346
Нуклеотидные и нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы: зидовудин, диданозин, ставудин, ламивудин, абакавир, тенофовир, эмтриктабин . . . . .	347
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы: невирапин, делвирдин, эфавиренц, этравирин . . . . .	347
Ингибиторы протеазы: саквинавир, ритонавир, индинавир, нелфинавир, лопинавир/ритонавир, атазанавир, фосампренавир, типранавир, дарунавир . . . . .	348
Новые классы: энфувиритид, маравирок, ралтегравир . . . . .	349
Заключение . . . . .	349
Литература . . . . .	350
<b>14. Распространенные детские инфекции . . . . .</b>	<b>357</b>
Введение . . . . .	357
Патогены и специфические синдромы . . . . .	358
Врожденные вирусные инфекции . . . . .	358
Парвовирус человека В19 . . . . .	368
Герпесвирусы человека . . . . .	370
Корь . . . . .	376
Эпидемический паротит . . . . .	379
Краснуха . . . . .	380
Литература . . . . .	381
<b>15. Респираторные вирусные инфекции . . . . .</b>	<b>386</b>
Введение . . . . .	386
Клинические синдромы . . . . .	386
Простуда (ОРВИ) . . . . .	386
Фарингит . . . . .	389
Острый отит среднего уха . . . . .	389
Круп (острый ларинготрахеобронхит) . . . . .	390
Трахеобронхит . . . . .	391
Бронхиолит . . . . .	391
Пневмония . . . . .	391
Вирусы-возбудители респираторных инфекций . . . . .	392
РНК-вирусы . . . . .	392
ДНК-вирусы . . . . .	394
Эпидемиология . . . . .	395
Риновирус и другие пикорнавирусы . . . . .	395
Вирус парагриппа . . . . .	397
Респираторный синцитиальный вирус . . . . .	398
Метапневмовирус человека . . . . .	399
Вирус гриппа . . . . .	399
Аденовирус . . . . .	400

Дифференциальная диагностика . . . . .	400
Лабораторные исследования . . . . .	401
Типы образцов и методов исследования . . . . .	401
Прямое исследование . . . . .	402
Микроскопия . . . . .	402
Обнаружение нуклеиновых кислот . . . . .	409
Выделение вирусов . . . . .	412
Серология . . . . .	415
Исследование чувствительности к противовирусным препаратам . . . . .	417
Выбор методов лабораторных исследований . . . . .	418
Литература . . . . .	419
<b>16. Инфекции желудочно-кишечного тракта . . . . .</b>	<b>428</b>
Введение . . . . .	428
Клинические проявления . . . . .	428
Вирусы-возбудители . . . . .	429
Ротавирус . . . . .	429
Кальцивирус . . . . .	429
Аденовирус . . . . .	430
Астровирус . . . . .	431
Эпидемиология . . . . .	431
Лабораторное тестирование . . . . .	432
Типы образцов и их обработка . . . . .	432
Прямое выявление вируса . . . . .	433
Выделение вируса . . . . .	438
Тестирование противовирусной резистентности . . . . .	441
Оценка результатов лабораторных исследований . . . . .	441
Литература . . . . .	442
<b>17. Инфекции кожи и слизистых оболочек . . . . .</b>	<b>447</b>
Введение . . . . .	447
ДНК-вирусы . . . . .	447
Вирус папилломы человека . . . . .	447
Вирусы оспы . . . . .	448
Вирус натуральной оспы . . . . .	448
Коровья оспа (вакциния) . . . . .	450
Оспа обезьян . . . . .	450
Контагиозный пустулезный дерматит . . . . .	452
Вирусы герпеса человека (HSV) . . . . .	452
Вирусы простого герпеса 1 и 2 . . . . .	452
Вирусологические исследования . . . . .	453
Вирус варицелла зостер (HSV-3) . . . . .	454
Вирус Эпштейна—Барр (HGV-4) . . . . .	457
Цитомегаловирус (HGV-5) . . . . .	459
Вирус герпеса человека-6 (HGV-6) . . . . .	461
Вирус герпеса человека-7 (HGV-7) . . . . .	462

Вирус герпеса человека-8 (HGV-8) . . . . .	462
Парвовирус В-19 . . . . .	463
РНК-вирусы . . . . .	466
Энтеровирусы . . . . .	466
Резюме . . . . .	467
Литература . . . . .	467
<b>18. Вирусные инфекции сердца и сосудов . . . . .</b>	<b>471</b>
Введение . . . . .	471
Эпидемиология вирусных заболеваний сердца . . . . .	472
Патогенез . . . . .	473
Клиническое течение и прогноз хронических вирусных заболеваний сердца . . . . .	475
Вирусологическая диагностика в кардиологии . . . . .	479
Вирусная серология и прямое выделение вируса . . . . .	479
Выделение вируса . . . . .	479
Молекулярно-биологическое выявление вирусных геномов в миокарде . . . . .	479
Гибридизация <i>in situ</i> . . . . .	479
Качественное выявление вируса в каскадной полимеразной цепной реакции . . . . .	480
Репликация вируса . . . . .	480
Количественное выявление вируса с помощью ПЦР в реальном времени . . . . .	480
Идентификация подтипов вируса методом секвенирования генома . . . . .	482
Интерпретация молекулярно-биологических находок . . . . .	483
Литература . . . . .	484
<b>19. Вирусные гепатиты . . . . .</b>	<b>491</b>
Введение . . . . .	491
Клинические проявления . . . . .	491
Возбудители . . . . .	492
Эпидемиология . . . . .	492
Дифференциальная диагностика . . . . .	494
Лабораторная диагностика . . . . .	494
Виды образцов и их обработка . . . . .	495
Прямое изучение (микроскопия, выявление антигена и нуклеиновых кислот) . . . . .	495
Изоляция вируса . . . . .	498
Идентификация . . . . .	498
Системы типирования . . . . .	498
Серологическое исследование . . . . .	499
Резистентность к противовирусным препаратам . . . . .	503
Оценка и отчет о результатах лабораторных исследований . . . . .	504
Литература . . . . .	506

<b>20. Вирусные геморрагические лихорадки</b> . . . . .	<b>511</b>
Введение . . . . .	511
Эпидемиология . . . . .	512
Ареновирусная геморрагическая лихорадка . . . . .	512
Буньявирусные геморрагические лихорадки . . . . .	514
Флавивирусные геморрагические лихорадки . . . . .	515
Филовирусные геморрагические лихорадки . . . . .	515
Клинические проявления . . . . .	516
Лихорадка Ласса . . . . .	516
Ареновирусные геморрагические лихорадки Нового Света . . . . .	517
Конго-Крымская геморрагическая лихорадка . . . . .	517
Геморрагическая лихорадка Алхурма, болезнь кьясанурского леса и омская геморрагическая лихорадка . . . . .	518
Филовирусные геморрагические лихорадки . . . . .	518
Молекулярные характеристики . . . . .	519
Ареновирусы . . . . .	519
Вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки . . . . .	519
Флавивирусы . . . . .	519
Филовирусы . . . . .	520
Клиническая диагностика вирусных геморрагических лихорадок . . . . .	520
Лабораторная диагностика вирусных геморрагических лихорадок . . . . .	521
Опасности . . . . .	521
Сбор клинических образцов . . . . .	522
Лабораторная диагностика . . . . .	523
Заключение . . . . .	527
Литература . . . . .	528
<b>21. Инфекции центральной нервной системы</b> . . . . .	<b>537</b>
Введение . . . . .	537
Клинические проявления . . . . .	538
Острый вирусный менингит . . . . .	538
Вирусный энцефалит . . . . .	538
Эпидемиология . . . . .	539
Вирусный менингит . . . . .	539
Вирусный энцефалит . . . . .	540
Дифференциальный диагноз . . . . .	544
Клиническое диагностическое обследование . . . . .	545
Сбор анамнеза и осмотр больного . . . . .	545
Общая диагностическая оценка . . . . .	546
Томография . . . . .	546
Анализ спинномозговой жидкости . . . . .	547
Прямое микроскопическое исследование СМЖ . . . . .	548
Вирусные культуры СМЖ . . . . .	548
Серология СМЖ . . . . .	549
Молекулярные исследования СМЖ . . . . .	549
Оценка и предоставление результатов лабораторного исследования . . . . .	550

Молекулярно-диагностические исследования вне ЦНС . . . . .	553
Биопсия мозга . . . . .	554
Вирусы-возбудители . . . . .	554
Вирусы герпеса . . . . .	554
Арбовирусы . . . . .	561
Энтеровирусы . . . . .	566
Бешенство . . . . .	568
Заключение . . . . .	569
Литература . . . . .	569
<b>22. Инфекции, передающиеся половым путем . . . . .</b>	<b>578</b>
Введение . . . . .	578
Вирус простого герпеса . . . . .	578
Клинические проявления . . . . .	578
Выделение вирусов . . . . .	581
Эпидемиология . . . . .	582
Лабораторные исследования и дифференциальный диагноз . . . . .	584
Типоспецифические серологические тесты . . . . .	585
Папилломавирус человека . . . . .	589
Клинические проявления . . . . .	589
Эпидемиология . . . . .	590
Лабораторная диагностика . . . . .	591
Контагиозный моллюск . . . . .	595
Литература . . . . .	596
<b>23. Вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2 . . . . .</b>	<b>601</b>
Введение . . . . .	601
Клиническая картина и лабораторная диагностика . . . . .	601
Общие положения . . . . .	601
Острая инфекция . . . . .	603
Анализы на антитела к ВИЧ . . . . .	604
Общие положения . . . . .	604
Иммуноферментные анализы . . . . .	606
Иммуноблот . . . . .	606
Другие подтверждающие методы . . . . .	607
Неопределенные иммуноблоты . . . . .	608
Простое и быстрое серологическое тестирование . . . . .	609
Обнаружение антител к ВИЧ-1 в слюне . . . . .	610
Тест на антитела ВИЧ в условиях ограниченных ресурсов . . . . .	610
Выявление подтипов ВИЧ-1 . . . . .	611
Выявление антител к ВИЧ-2 . . . . .	612
Выявление вируса иммунодефицита человека . . . . .	614
Культура . . . . .	614
Антиген р24 ВИЧ-1 . . . . .	614
Вирусная нуклеиновая кислота . . . . .	615
Вирусные ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови . . . . .	615

Вирусные РНК в плазме крови . . . . .	616
Количественные анализы на ВИЧ-1 РНК . . . . .	617
Рекомендации к количественному анализу образцов РНК на ВИЧ-1 . . . . .	617
Обнаружение подтипов ВИЧ-1 . . . . .	618
Обнаружение ВИЧ-2 . . . . .	618
Генотип и фенотип лекарственной чувствительности к антиретровирусным препаратам . . . . .	619
Использование РНК ВИЧ-1 для мониторинга инфекции . . . . .	621
Уровень РНК ВИЧ-1 у зараженных взрослых людей . . . . .	621
Наблюдение за уровнями РНК ВИЧ-1 у беременных . . . . .	622
Использование вирусной РНК в плазме для определения причин неудачи антивирусной терапии . . . . .	622
Заключение . . . . .	625
Благодарности . . . . .	626
Литература . . . . .	626
<b>24. Полиомавирус. Диагностика, репликация вируса и ход болезни . . . . .</b>	<b>632</b>
Введение . . . . .	632
Вирусологические аспекты . . . . .	633
Полиомавирус. Эпидемиология, репликация вируса и течение болезни . . . . .	636
Диагностические исследования ВКВ . . . . .	637
Серология ВКВ . . . . .	637
ВКВ-специфический клеточный иммунитет . . . . .	640
Культура ВКВ-клеток . . . . .	640
Выявление ВКВ-антигенов . . . . .	641
Микроскопия ВКВ в моче . . . . .	641
Молекулярно-генетическое исследование ВКВ . . . . .	642
Диагностика полиомавирус-ассоциированной нефропатии . . . . .	646
Диагностические тесты на JCV . . . . .	648
Серология JCV . . . . .	648
JCV-специфический клеточный иммунитет . . . . .	649
Выделение JCV в клеточной культуре . . . . .	649
Молекулярно-генетическое исследование JCV . . . . .	650
Диагностика полиомавирус-ассоциированной многоочаговой лейкоэнцефалопатии . . . . .	654
Диагностика полиомавирус-ассоциированной инфекции дыхательных путей . . . . .	655
Молекулярно-диагностическое исследование KIV и WUV . . . . .	656
Диагностика MCV-ассоциированных заболеваний . . . . .	658
Молекулярно-диагностические исследования MCV . . . . .	658
Диагностика SV40-ассоциированных заболеваний . . . . .	658
Молекулярно-диагностические исследования SV40 . . . . .	660
Заключение . . . . .	661
Литература . . . . .	661

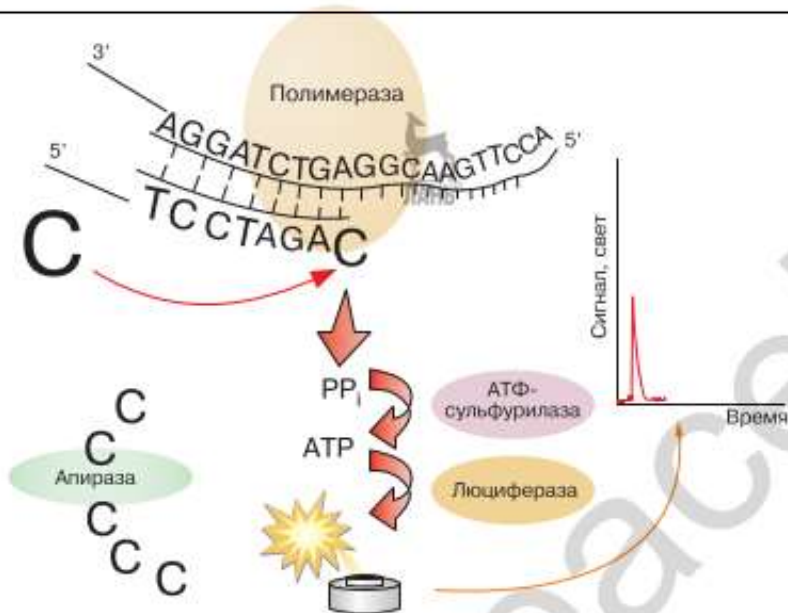
<b>25. Вирусные заболевания глаз</b> . . . . .	<b>670</b>
Аденовирус . . . . .	671
Глазные инфекции, вызванные аденовирусом . . . . .	671
Диагностика и профилактика аденовирусной инфекции . . . . .	673
Вирус простого герпеса . . . . .	674
Герпесвирусная болезнь глаз человека . . . . .	675
Диагностика и профилактика герпетической инфекции . . . . .	676
Вирус ветряной оспы (герпес зостер) . . . . .	678
Ветряная оспа . . . . .	678
Болезни глаз, связанные с ветряной оспой . . . . .	679
Синдром врожденной ветряной оспы . . . . .	679
Диагностика и профилактика ветряной оспы . . . . .	679
Болезнь опоясывающего лишая . . . . .	680
Заболевания глаз, ассоциированные с опоясывающим лишаем . . . . .	681
Диагностика и профилактика опоясывающего лишая . . . . .	683
Вирус Эпштейна—Барр . . . . .	684
Глазные болезни, вызванные вирусом Эпштейна—Барр . . . . .	684
Диагностика и профилактика болезни, вызванной вирусом Эпштейна—Барр . . . . .	685
Цитомегаловирус . . . . .	685
Врожденные и перинатальные инфекции, вызванные CMV . . . . .	686
Глазные болезни, вызванные цитомегаловирусом у больных с ослабленным иммунитетом . . . . .	687
Лабораторная диагностика и профилактика цитомегаловирусной болезни . . . . .	688
Вирус папилломы . . . . .	689
Заболевания глаз человека, вызванные вирусом папилломы . . . . .	689
Диагностика и предупреждение заболеваний, вызванных папилломавирусом человека . . . . .	690
Вирус натуральной оспы . . . . .	691
Заболевания глаз, вызванные натуральной оспой . . . . .	691
Вирус коровьей оспы . . . . .	692
Заболевание глаз, вызванное вирусом коровьей оспы . . . . .	692
Лабораторная диагностика и профилактика инфицирования вирусом коровьей оспы . . . . .	693
Вирус контагиозного моллюска . . . . .	693
Болезни глаз, вызванные вирусом контагиозного моллюска . . . . .	694
Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом контагиозного моллюска . . . . .	695
Вирус эпидемического паротита . . . . .	695
Инфекции глаз, вызванные паротитом . . . . .	695
Диагностика и профилактика заболеваний, связанных с вирусом эпидемического паротита . . . . .	695
Вирус кори . . . . .	696
Заболевания глаз, вызванные вирусом кори . . . . .	696
Врожденные глазные заболевания, вызванные вирусом кори . . . . .	697

Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом кори . . . . .	697
Вирус иммунодефицита человека . . . . .	697
Глазные заболевания, вызванные вирусом иммунодефицита человека . . . . .	698
Лабораторная диагностика и профилактика ВИЧ-инфекции . . . . .	700
Энтеровирус . . . . .	701
Глазные заболевания, вызванные энтеровирусом и вирусом Коксаки . . . . .	702
Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных энтеровирусом или вирусом Коксаки . . . . .	702
Вирус денге . . . . .	703
Глазные заболевания, вызванные вирусом денге . . . . .	703
Диагностика и профилактика заболеваний глаз, вызванных вирусом денге . . . . .	704
Вирус лихорадки Западного Нила . . . . .	704
Глазные инфекции, вызванные вирусом лихорадки Западного Нила . . . . .	704
Диагностика и профилактика инфекций, вызванных вирусом лихорадки Западного Нила . . . . .	705
Вирус гепатита С . . . . .	705
Заболевания глаз, вызванные гепатитом С . . . . .	705
Диагностика и профилактика вирусных заболеваний, вызванных гепатитом С . . . . .	706
Вирус краснухи . . . . .	706
Заболевания глаз, связанные с вирусом краснухи . . . . .	706
Врожденные заболевания, вызванные вирусом краснухи . . . . .	707
Заболевания глаз, вызванные врожденной краснухой . . . . .	707
Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом краснухи . . . . .	708
Вирус Чикунгунья . . . . .	709
Заболевания глаз, вызванные вирусом Чикунгунья . . . . .	709
Диагностика и профилактика заболеваний, вызванных вирусом Чикунгунья . . . . .	709
Вирус бешенства . . . . .	709
Заболевание глаз, вызванное вирусом бешенства . . . . .	710
Диагностика и профилактика бешенства . . . . .	710
Литература . . . . .	710
<b>26. Арбовирусы . . . . .</b>	<b>714</b>
Литература . . . . .	725
<b>27. Вирусные инфекции у пациентов с нарушениями иммунной системы . . . . .</b>	<b>730</b>
Введение . . . . .	730
Иммуносупрессия у больных при трансплантации . . . . .	731
Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток . . . . .	731
Трансплантация паренхиматозных органов . . . . .	733

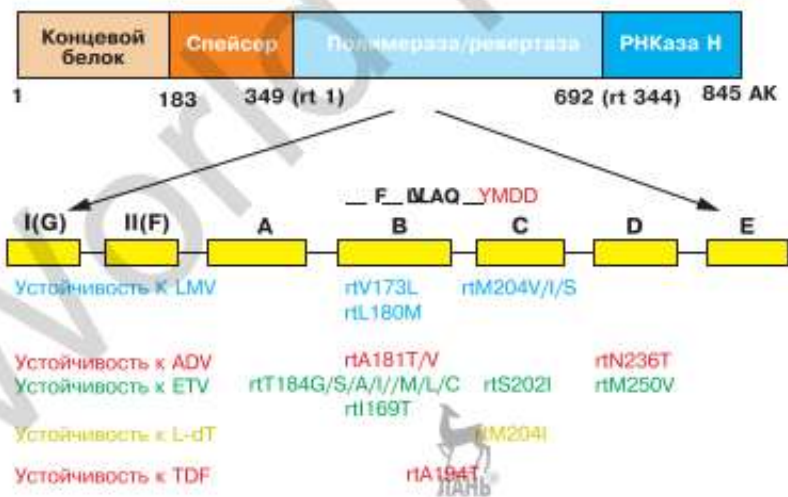


Иммуносупрессорные препараты при трансплантации . . . . .	733
Вирусные инфекции в трансплантологии . . . . .	734
Цитомегаловирус (CMV) . . . . .	735
Вирус Эпштейна—Барр (EBV) . . . . .	739
Вирусы простого герпеса 1 и 2 и вирус опоясывающего лишая (VZV)	741
HHV-6 . . . . .	742
Герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV/HHV-8)	743
Респираторные вирусы . . . . .	744
Аденовирус . . . . .	745
Полиомавирусы . . . . .	746
Папилломавирус человека (HPV) . . . . .	747
Новые вирусные инфекции . . . . .	747
Резюме . . . . .	748
Литература . . . . .	748

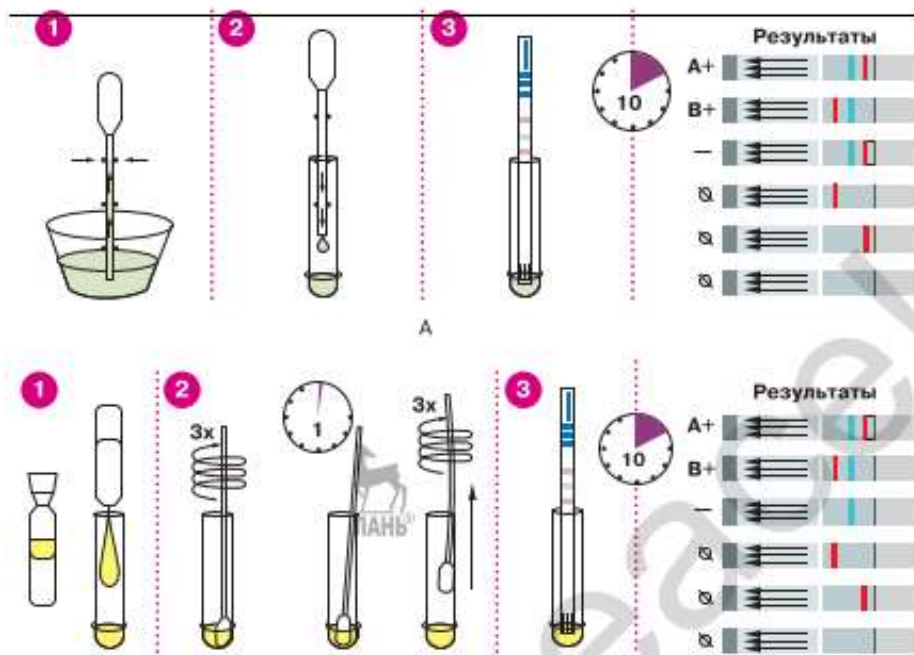




**Рис. 4.3.** Пиросеквенирование, в ходе которого высвобождается один остаток пирофосфата (PP<sub>i</sub>) на каждый включившийся нуклеотид. Это приводит к синтезу АТФ, используемого люциферазой для генерации светового сигнала



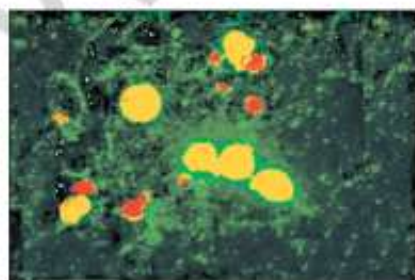
**Рис. 4.4.** Основные мутации полимеразы HBV (домены с А по G), ассоциированные с устойчивостью к противовирусным препаратам при хронической инфекции HBV. LMV — ламивудин, ADV — адефовир, ETV — энтекавир, L-dT — телбивудин, TDF — тенофовир. Мотив YMD, ассоциированный с устойчивостью к ламивудину и телбивудину, включает остатки с 203 по 206



**Рис. 8.6.** Использование системы QuickVue для выявления присутствия антигенов вирусов гриппа А и В в мазках или смывах из носоглотки

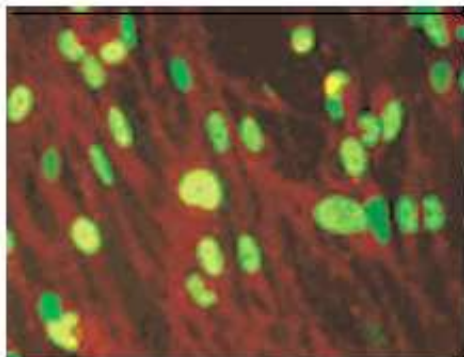


А



Б

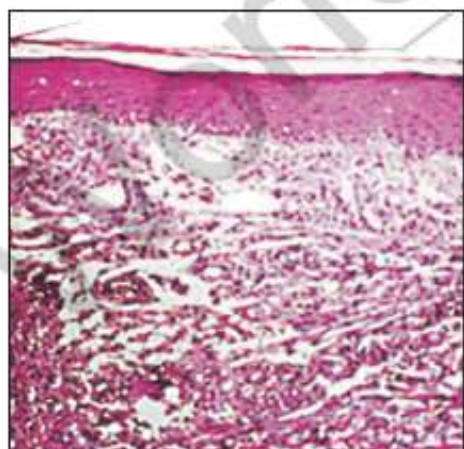
**Рис. 17.2.** Диагностика герпеса зостер. На панели **А** показан положительный мазок Цанка ( $\times 400$ ). Окрашивание по Райту позволяет выявить гигантские многоядерные клетки. На панели **Б** показана положительная проба прямой иммунофлуоресценции ( $\times 400$ ). Клетки окрашены моноклональными антителами к вирусу варицелла зостер, конъюгированными с флуоресцеином; зеленая флуоресценция указывает на наличие антигенов вируса варицелла зостер. Источник: [27]



**Рис. 17.3.** Однослойная микрокультура для цитомегаловируса (иммунофлуоресцентный краситель,  $\times 400$ ). Источник: [36]



А



Б



**Рис. 17.4.** Саркома Капоши. На панели **А** показаны поражения классической саркомы Капоши. На панели **Б** показаны характерные гистологические признаки (гематоксилин-эозин,  $\times 20$ ). Прлиферация веретеновидных опухолевых клеток привела к образованию аномальных сосудистых щелей (в некоторых есть эритроциты). В этом поражении нет митотической активности, степень плеоморфизма опухолевых клеток слабая. Источник: [50]



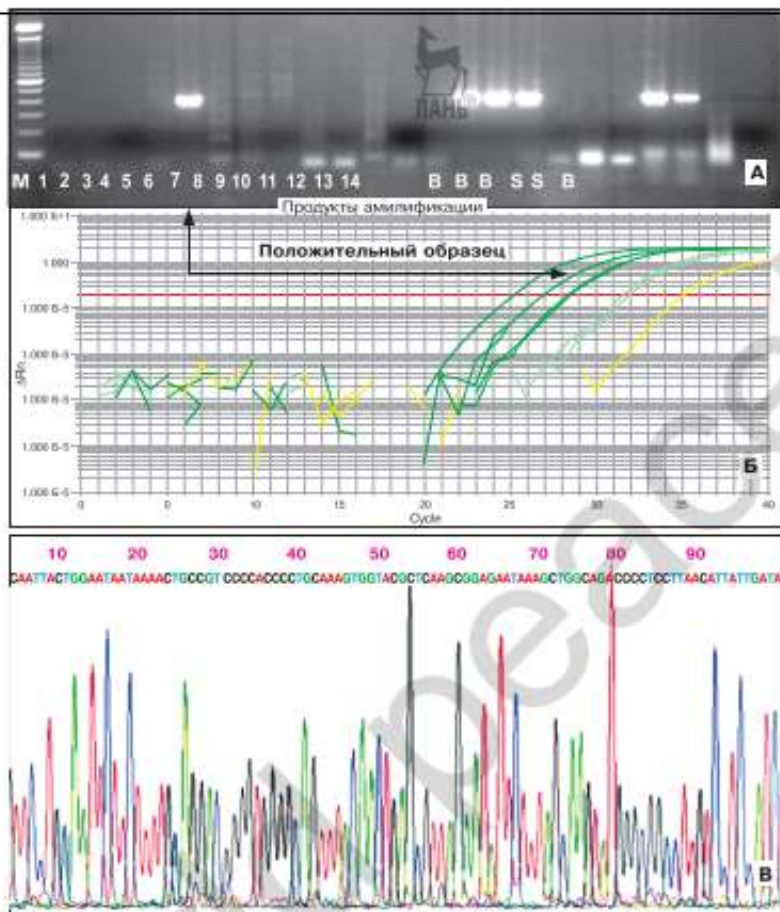


Рис. 18.3. Молекулярная диагностика в сердечной ткани



Рис. 26.1. Схема диагностики вирусных инфекций



*Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"*

*Научное электронное издание*

## **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПО ЛЕННЕТУ**

Ведущий редактор канд. биол. наук *В. В. Гейдебрехт*

Редактор канд. биол. наук *Т. Е. Толстихина*

Художественный редактор *В. А. Прокудин*

Технический редактор *Т. Ю. Федорова*

Корректор *И. Н. Панкова*

Компьютерная верстка: *В. И. Савельев*

Подписано к использованию 09.06.21.

Формат 145×225 мм

Издательство «Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: [info@pilotLZ.ru](mailto:info@pilotLZ.ru), <http://www.pilotLZ.ru>



**Эдвин Леннет** — автор, редактор и идейный вдохновитель первых англоязычных изданий этой книги, разработчик столь удобного практикующему врачу синдромного подхода к диагностике вирусных инфекций. Более 30 лет возглавлял лабораторию вирусных и риккетсиозных заболеваний в Беркли. Автор множества научных статей, редактор классических книг, посвященных вирусным заболеваниям. Был председателем Калифорнийского фонда здравоохранения, директор Центра клеточной биологии им. Алтона Джонса в Лейк-Плэсиде, США.



**Кит Джером** — известный вирусолог, директор отделения диагностической молекулярной вирусологии Университета Вашингтона и Центра изучения рака имени Фреда Хатчинсона в Сиэтле, США. Лауреат нескольких премий в области вирусологических исследований, автор 53 монографий, редактор классических книг по медицинской микробиологии и вирусологии.

Читателю предлагается перевод четвертого английского издания, ставшего бестселлером в США. На русском языке публикуется впервые.

Книга содержит исчерпывающую информацию о возбудителях вирусных инфекций и методах вирусологической лабораторной диагностики на основе синдромного подхода. Подробно описаны теоретические основы уже используемых в вирусологии молекулярно-генетических методов (серологические, ПЦР и другие) и технологически новых, только входящих в медицинскую практику (микрочипы и электронно-микроскопические исследования). Достаточное внимание уделено проверке результатов исследований, а также их правильной статистической обработке. Предложены способы адаптации некоторых методов диагностики при ограниченных финансовых возможностях лабораторий.

*Для специалистов-вирусологов научных и практических диагностических центров, повышающих квалификацию врачей-инфекционистов, эпидемиологов, педиатров и врачей общей практики, а также студентов-медиков, ординаторов и аспирантов.*