

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

Разрешено Минздравом Республики  
Беларусь для практического использования

Министр здравоохранения



В.А. Остапенко

5 января 2002 г.

Регистрационный № 89-0601

**Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции  
у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом  
простого герпеса 2 типа**

**Учреждения-разработчики:** Гомельский государственный медицинский институт, Витебский филиал НИКИ радиационной медицины и эндокринологии

**Авторы:** д-р мед. наук, проф. С.В. Жаворонок, канд. мед. наук, доц. Е.И. Барановская, канд. мед. наук, доц. А.Н. Воронецкий, Л.Н. Мельникова, канд. мед. наук Е.В. Воропаев, А.В. Мишин, Ю.И. Фролов, М.М. Макаров, И.И. Стахович, Н.С. Павленко

**[Перейти к оглавлению](#)**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ .....</b>	<b>8</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ .....</b>	<b>9</b>
<b>СИСТЕМА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, МЕТОДИКА ВЗЯТИЯ БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>11</b>
<b>ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ .....</b>	<b>14</b>

В настоящее время отмечается тенденция к увеличению частоты заболеваний, передаваемых половым путем, в том числе генитального герпеса. Особенности герпесвирусных инфекций являются возможное атипичное или бессимптомное латентное течение, сопутствующие иммунные нарушения, возможность внутриутробного инфицирования плода и возникающая при этом перинатальная патология.

У беременных, составляющих группу риска в отношении внутриутробного инфицирования плода, в соскобах из цервикального канала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружен геном вируса простого герпеса (ВПГ) у 29,5%, цитомегаловирус (ЦМВ) — у 24%, микстинфекция выявлена у 48,8% беременных. В околоплодных водах, полученных путем амниоцентеза, геном ВПГ обнаружен у 5,9%, ЦМВ — у 11,7%, что свидетельствует о внутриутробном инфицировании плода (Сидорова И.С. и соавт., 1998). У женщин, перенесших ту или иную форму генитального герпеса, по сравнению со здоровыми ранние выкидыши наблюдались чаще в 1,78 раза, поздние — в 2,3, антенатальная смерть плода — в 1,8, гипотрофии плода — в 2,68, преждевременные роды — в 1,59, мертворождения и гибель детей — в 18 раз (Малевич Ю.К., 1996).

В настоящее время наиболее распространены серологические методы для выявления специфических JgM и JgG против ВПГ, определение вирусного антигена в биоматериалах методом иммуноферментного анализа (ИФА), выделение специфических ДНК и выявление их с помощью ПЦР. Однако при асимптомном латентном течении заболевания диагностика не всегда бывает успешной. Отсутствует алгоритм диагностики этих заболеваний с учетом современных лабораторных методов.

Остается нерешенным вопрос о вирусах семейства герпесов как причине врожденных пороков развития плода. По данным НИИ охраны материнства и детства, в настоящее время в Республике Беларусь четко прослеживается тенденция роста ВПР, заболеваний новорожденных, связанных с инфекциями перинатального периода.

Данные литературы о частоте и структуре перинатальной патологии, связанной с внутриутробными инфекциями, разноречивы, и данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении. Отсутствует система диагностики, учета, профилактики герпесвирусной инфекции. Не всегда удовлетворяют результаты лечения хронического рецидивирующего генитального герпеса.

Клинические проявления генитального герпеса у беременных наблюдаются у 25–37% пациентов, в остальных случаях симптомы отчетливо не выражены или отсутствуют. Атипичная форма генитального герпеса может протекать с клинической картиной хронического неспецифического воспалительного заболевания половых органов и требует обязательной лабораторной диагностики. При типичных проявлениях заболевания в виде везикул и язв следует проводить дифференциальную диагностику с первичным сифилисом, мягким шанкром. При локализации элементов на коже промежности герпес необходимо дифференцировать с заболеваниями кожи. Атипичный генитальный герпес маскируется клиникой других инфекций, передаваемых половым путем: хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз или сочетается с этими заболеваниями.

Для прогнозирования течения и исхода беременности, выбора методов диагностики необходимо учитывать стадию развития герпесвирусной инфекции. В клиническом течении герпесвирусной инфекции различают первый эпизод первичной инфекции, когда происходит контакт с вирусом впервые в жизни, первый эпизод вторичной инфекции, когда впервые проявляется клиническая картина заболевания при наличии анамнестических антител и рецидив заболевания. Наиболее опасен для плода первый эпизод первичной инфекции у матери во время беременности, когда в организме матери нет антител JgG против ВПГ-2 и плод иммунологически не защищен от инфекции.

Латентное состояние герпетической инфекции может быть обусловлено иммуносупрессией, характерной для физиологической беременности и направленной на подавление иммунной реакции отторжения плода. Вместе с тем, быстро размножающиеся клетки и ткани эмбриона и плода являются благоприятной средой для репликации вирусов. Подобные условия в организме беременной благоприятны для внутриутробного инфицирования эмбриона и плода, развитию его патологии.

## *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

Заражение плода ВПГ антенатально от матери возможно гематогенным (трансплацентарным) или восходящим путем. При латентном бессимптомном течении герпесвирусной инфекции в ранние сроки беременности проявлениями внутриматочной инфекции может быть спонтанный аборт, неразвивающаяся беременность, пороки развития плода (Brown Z.A. et. al., 1987). Во втором и третьем триместрах беременности инфицирование плаценты и плодных оболочек ведет к их воспалительным изменениям. Эти изменения диагностируются при УЗИ: толстая, отечная плацента, несоответствие степени зрелости плаценты сроку беременности, кистозные образования в плаценте, а также недостаточное или избыточное количество околоплодных вод. Воспаление плаценты (плацентит, хориоамнионит) сопровождается нарушением функции плаценты, формируется плацентарная недостаточность. В поздние сроки беременности формирование органов и систем плода в основном завершено, внутриутробное инфицирование приводит к задержке его роста. Клинически эта патология проявляется синдромом задержки внутриутробного развития — симметричная или асимметричная гипотрофия плода. Накануне родов первичная инфекция опасна тем, что в организме матери не успевает образоваться достаточное количество антител IgG против ВПГ для защиты плода, есть высокий риск инфицирования плода во время родов при прохождении через родовые пути.

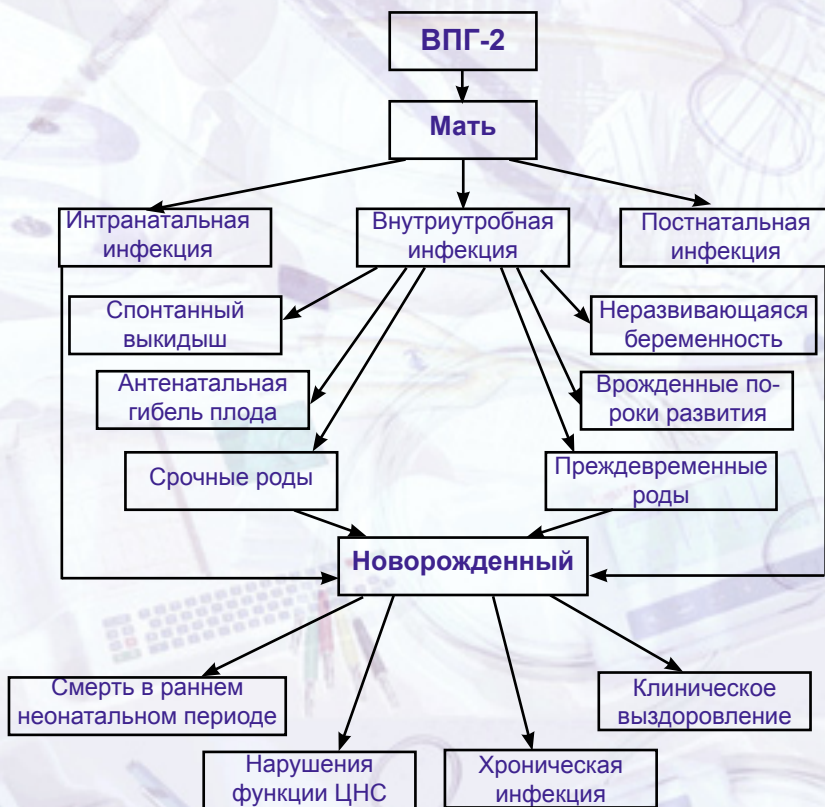
При генитальном герпесе есть высокий риск восходящей инфекции, преждевременного разрыва амниотических оболочек, инфицирования плода в родах при прохождении через родовые пути. Нами установлено, что в случаях ранней неонатальной смерти 69% новорожденных инфицированы вирусом простого герпеса внутриутробно, причем 12 новорожденных из 13 исследованных родились в сроке гестации 26–36 недель. При этом беременность осложнилась истмико-цервикальной недостаточностью, многоводием, преждевременным вскрытием плодных оболочек, а роды осложнились длительным безводным промежутком.

Анализ исхода беременности у женщин с диагностированной инфекцией ВПГ-2 показал, что в половине случаев роды были преждевременными, масса плода  $2690 \pm 140$  г. У всех женщин с латентной формой герпетической инфекции беременность протекала с преходящей угрозой ее прерывания.

Таким образом, неспецифическими проявлениями внутриутробной герпетической инфекции являются невынашивание беременности, плацентарная недостаточность, задержка внутриутробного развития плода, рождение маловесных детей.

*Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

Исход беременности при герпесвирусной инфекции (рис. 1) во многом определяется сроком беременности, состоянием иммунной системы матери и другими, возможно, неизученными факторами. В ранние сроки гестации, когда происходит дифференциальное развитие тканей и органов плода, есть высокий риск формирования пороков развития в результате трансформирующего влияния вирусов на хромосомный аппарат клетки. При таком поражении плода возможен спонтанный выкидыш, замершая беременность или плод с аномалиями органов продолжает развиваться. В более поздние сроки беременности инфицирование плаценты и плода приводит к недостаточности фетоплацентарной системы, хронической гипоксии или асфиксии плода.



*Рис. 1. Исходы беременности при хронической латентной инфекции ВПГ-2 у матери и инфицировании плода ВПГ-2*

### *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

Длительно текущая хроническая внутриматочная гипоксия плода на фоне нарушенной функции плаценты может быть причиной антенатальной гибели плода или функциональных нарушений центральной нервной системы новорожденного. При внутриутробной герпесвирусной инфекции беременность может продлиться до физиологического срока родов с последующими осложнениями для новорожденного. Если у роженицы инфекция локализована в родовых путях, плод может инфицироваться в родах. Также новорожденный может быть инфицирован в неонатальном периоде при тесном контакте с матерью.

Перинатально приобретенная герпетическая инфекция у новорожденных протекает в виде локального поражения кожи и слизистых оболочек, с клинической картиной энцефалита или симптоматикой энцефалопатии гипоксического генеза, в генерализованной форме с изменениями висцеральных органов. Первые признаки герпетической инфекции часто принимаются за постгипоксические или травматические повреждения и ребенку не проводится этиотропная терапия, так как диагноз не установлен. Летальность при генерализованной герпетической инфекции новорожденных при отсутствии противовирусной химиотерапии составляет 60–95%, более половины выживших детей в последующем имеют психоневрологические отклонения (Зайдиева З.С. и соавт., 1999). Значительно чаще герпес новорожденных развивается, если во время беременности был перенесен первичный эпизод инфекции в отличие от рецидива заболевания (Brown A.Z., 1991). Это можно объяснить отсутствием в крови матери и плода антител IgG против ВПГ-2 при первичном инфицировании. По этой причине серологическое исследование у новорожденных не имеет высокой информативности, а обследование матери на антитела IgG и IgM против ВПГ-2 становится обязательным.

Вирусологические и серологические обследования новорожденных с различной врожденной патологией, проведенные в НИИ педиатрии РАМН (Москва), показали, что в пуповинной крови новорожденных специфические антитела IgM против вирусов краснухи, ЦМВ, ВПГ-1 и 2 типа обнаруживаются значительно реже, чем вирусные антигены на культуре ткани с последующей идентификацией в реакции нейтрализации (Нисевич Л.Л. и соавт., 1998). Это связано с незрелостью иммунной системы новорожденного. Исследованиями Н.И. Кудашова и соавт. (1998) также показана малая диагностическая ценность определения специфических антител IgM против ВПГ и ЦМВ в крови новорожденных. Так, при врожденной пневмонии антитела IgM против ВПГ в крови новорожденных отсутствовали, а IgM против ЦМВ были обнаружены у 13%. Методом ПЦР в буккальных клетках, ликворе или моче ДНК ВПГ обнаружена у 58,3%, ДНК ЦМВ — у 69,2%.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Проведенные нами исследования показали, что в группу высокого риска внутриутробного инфицирования плода необходимо включать женщин по следующим признакам:

1. Отягощенный акушерский анамнез:
  - преждевременные роды,
  - спонтанные выкидыши,
  - рождение детей с низким по отношению к сроку гестации весом,
  - антенатальная гибель плода,
  - постнатальная гибель плода,
  - прерывание беременности по медикогенетическим показаниям или рождение детей с врожденными пороками развития,
  - рождение детей в состоянии асфиксии тяжелой степени или с признаками гипоксической энцефалопатии.
2. Клинические проявления герпеса гениталий или другой локализации в анамнезе или в течение настоящей беременности:
  - везикулярная сыпь кожи лица в течение беременности,
  - герпес гениталий в анамнезе или в течение беременности.
3. Отягощенное течение настоящей беременности:
  - истмико-цервикальная недостаточность,
  - перманентная угроза прерывания беременности,
  - острые респираторные вирусные заболевания,
  - морфологические или функциональные изменения плаценты,
  - синдром задержки внутриутробного развития плода,
  - многоводие,
  - маловодие.
4. Осложнения в родах и послеродовом периоде, заболевания новорожденного:
  - несвоевременное вскрытие плодных оболочек,
  - аномалии родовой деятельности,
  - нарушение обратного развития матки после родов,



## *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

- морфологические воспалительные изменения последа,
  - нарушение функции ЦНС у новорожденного,
  - признаки инфекции любой локализации у новорожденного.
5. Хронические воспалительные заболевания половых путей.
  6. Бесплодие первичное или вторичное.
  7. Эктопическая беременность.
  8. Инфекция, передаваемая половым путем, обнаруженная у полового партнера или у членов семьи.
  9. Клинические признаки вторичного иммунодефицита:
    - частые острые респираторные вирусные заболевания,
    - герпес лица,
    - конъюнктивит.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ**

1. Оборудование и реактивы для ИФА:
  - анализатор иммуноферментный;
  - автоматические пипетки на 1–10, 5–40, 40–200, 200–1000 мкл;
  - одноразовые наконечники к автоматическим пипеткам;
  - планшеты одноразовые полистироловые;
  - бумага фильтровальная;
  - посуда лабораторная мерная;
  - пробирки стеклянные;
  - штативы для пробирок стеклянных;
  - камера морозильная;
  - центрифуга на 1000–2000 об./мин;
  - тест-системы иммуноферментные для выявления IgM к ВПГ-2;
  - тест-системы иммуноферментные для выявления IgG к ВПГ-2;
  - тест-системы иммуноферментные для выявления антигена ВПГ-2.

2. Оборудование и реактивы для метода иммунофлуоресценции:

- микроскоп люминесцентный с системой фильтров для ФИТЦ (возбуждающий свет длиной волны 490 нм и эмиссией 520 нм);
- стекла предметные;
- стекла покровные;
- антитела диагностические для выявления антигенов ВПГ-2 методом реакции непрямой иммунофлуоресценции, сухие;
- жидкость монтирующая;
- масло иммерсионное;
- этанол;
- дистиллированная вода.

3. Оборудование и реактивы для метода ПЦР:

- амплификатор (программируемый термостат);
- микроцентрифуга на 10–12 тыс. с роторами для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 и 0,5 мл;
- камера для электрофореза в гелях и источник напряжения до 1000 В/1000 мА/200 Вт;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый;
- встряхиватель пробирок типа «Эппендорф» («Вортекс»);
- настольный микротермостат для пробирок типа «Эппендорф»;
- штативы для пробирок типа «Эппендорф»;
- автоматические пипетки на 1–10, 5–40, 40–200, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники к автоматическим пипеткам;
- пробирки типа «Эппендорф» на 1,5, 0,5 и 0,2 мл;
- рН-метр;
- аналитические весы;
- спектрофотометр или спектрофлуориметр;
- фотоаппарат;
- лабораторный вакуумный насос;
- персональный компьютер;
- тест-системы для выделения ДНК ВПГ-2;
- тест-системы для детекции ДНК ВПГ-2.

## СИСТЕМА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, МЕТОДИКА ВЗЯТИЯ БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные исследования для диагностики инфекции, вызванной ВПГ-2, проводятся с учетом характера клинического течения и локализации заболевания. При исследовании сыворотки крови на наличие специфических антител JgG и/или JgM против ВПГ-2 необходимо учитывать последовательность появления и возрастание титра антител в крови, схематично это отражено на рис. 2.

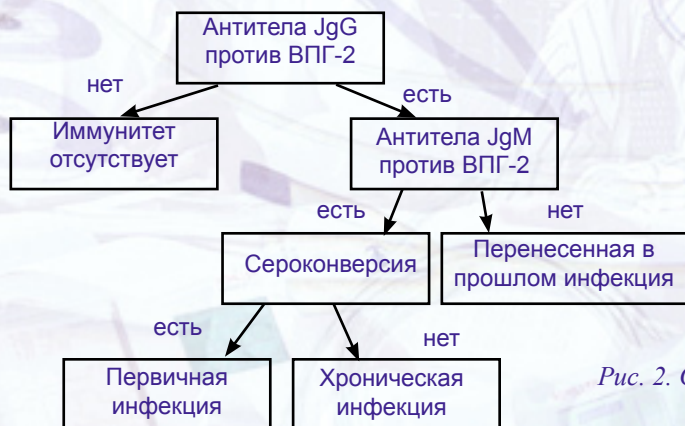


Рис. 2. Схема серологических исследований для диагностики герпесвирусных инфекций

## *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

1. Массовые скрининговые обследования проводят для определения в крови специфических антител JgG и/или JgM против ВПГ-2 методом ИФА.

Специфические антитела IgG в крови выявляются после перенесенной в прошлом инфекции, антитела IgM — маркер продуктивной инфекции. Антитела IgM в крови могут быть выявлены при первичном инфицировании и при рецидиве герпетической инфекции, но неизвестной остается локализация инфекционного процесса. Отсутствие в крови антител JgG против ВПГ-2 является риском первичного инфицирования ВПГ-2 во время беременности. При первичном инфицировании ВПГ-2 иммунитет против герпеса отсутствует, и внутриутробный плод оказывается иммунологически не защищенным, многократно возрастает риск внутриутробной герпесвирусной инфекции.

2. Титр антител JgG и JgM против ВПГ-2 определяют в динамике для диагностики сероконверсии.

Наличие в крови одновременно специфических антител обоих классов JgG и JgM против ВПГ-2 может указывать как на хроническую латентную инфекцию, так и на первичную инфекцию. Сероконверсия происходит при иммунном ответе на первичную герпесвирусную инфекцию. В начале иммунного ответа при первичном инфицировании ВПГ-2 нарастает титр антител JgM, затем начинается продукция антител JgG и рост их титра, а титр антител JgM снижается. Дифференциальная диагностика активации хронической герпесвирусной инфекции от первичного инфицирования имеет принципиально важное значение для прогноза течения беременности и осложнений у плода.

3. Для уточнения локализации инфекции в половых путях исследуют соскоб эпителиальных клеток канала шейки матки и/или содержимое везикул на наличие антигена ВПГ-2 методом ИФА. При положительном результате исследования подтверждается диагноз продуктивной генитальной герпесвирусной инфекции.

4. Определение ДНК ВПГ-2 методом ПЦР в эпителиальных клетках канала шейки матки проводится для подтверждения диагноза или контроля излеченности. Применение ПЦР возможно на базе крупных клиник и научно-исследовательских учреждений, так как требует специальной подготовки персонала и оснащения лаборатории оборудованием.

5. Определение ДНК ВПГ-2 методом ПЦР в амниотической жидкости возможно при проведении диагностического амниоцентеза по медикогенетическим показаниям для подтверждения внутриутробной герпетической инфекции.

## *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

6. Биопсийные ткани (биопсия псевдоэрозии шейки матки, кондиломы аногенитальной области, плацента при внутриутробной инфекции новорожденных) подлежат исследованию методом ПЦР для определения ДНК ВПГ-2 или методом иммунофлуоресценции для определения антигена ВПГ-2.

7. Диагностика неонатальной герпесвирусной инфекции проводится хотя бы двумя методами одновременно и включает исследование в крови новорожденных (или в пуповинной крови) специфических антител JgM, выявление ДНК вирусов методом ПЦР в моче, отделяемом дыхательных путей, ликворе, материале из очагов поражений (везикулярная сыпь на коже, отделяемое из глаз).

Антитела JgG против ВПГ-2 у новорожденного имеют материнское происхождение, и их концентрация зависит от проницаемости плацентарного барьера, так как JgG проникают через плаценту от матери к плоду. Определение специфических антител JgM в крови новорожденных является весьма ненадежным тестом по причине незрелости иммунной системы. Диагностика герпеса у новорожденных не должна занимать длительное время, так как своевременно начатое лечение значительно улучшает прогноз.

8. В случаях перинатальной гибели плода и новорожденного исследуют аутопсийные ткани различных органов, обязательно исследование ткани головного мозга, сердца, печени, легких, почек. При спонтанных выкидышах исследованию подлежат ткани абортированного плодного яйца. В данных случаях в качестве экспресс-метода может быть использован метод непрямой иммунофлуоресценции для определения антигена ВПГ-2. Более точная диагностика достигается при использовании метода ПЦР для определения ДНК ВПГ-2 в образцах ткани.

### **Методика взятия биоматериала для исследования**

1. Для исследования антител в сыворотке крови методом ИФА берут кровь из локтевой вены, центрифугируют 20 мин при 1000 об./мин. Сыворотку крови отбирают микропипеткой для исследования. Полученная сыворотка может храниться в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мес.

## *Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

2. Для определения антигена ВПГ-2 в половых путях берут мазок-соскоб цилиндрического эпителия цервикального канала с помощью ложки Фолькмана или одноразовыми ершиками, предназначенными для взятия биоматериала из шейки матки. Перед взятием материала марлевым шариком удаляют слизь из наружного зева цервикального канала. Обязательным условием является наличие эпителиальных клеток в исследуемом материале, для этого ложкой Фолькмана легким движением соскабливают эпителий канала влажной части шейки матки или вращательным движением ершика снимают поверхностный эпителий. Дистальный конец инструмента, которым проводилось взятие клеток, окунают и ополаскивают в 0,5 мл среды 199, помещенной в эппендорф, плотно закрывается крышкой. Полученный материал может храниться в среде 199 при  $-4^{\circ}\text{C}$  в течение 3 сут.

3. Взятие материала для определения ДНК ВПГ-2 проводится аналогично, как указано в п. 2. Обязательными условиями является наличие клеток эпителия во взятом биоматериале и отсутствие контаминации другими микроорганизмами. Материал для исследования помещают в 0,5–1,0 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия в пробирку эппендорф. Материал может храниться в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 нед.

4. Для определения антигена ВПГ-2 в образцах ткани готовят микросрезы исследуемой ткани на предметном стекле. Если срезы готовят из парафиновых блоков, после нанесения на предметное стекло проводят депарафинизацию. Микропрепараты обрабатывают диагностическими антителами согласно прилагаемой инструкции.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

1. При исследовании специфических антител в сыворотке крови может быть получен отрицательный результат, если кровь взята в короткие сроки после инфицирования до наступления иммунологической реакции в организме.

2. Отрицательный результат определения ДНК или антигена ВПГ-2 в биоматериале может быть получен при отсутствии клеток эпителия во взятом для исследования материале.

3. Клинически герпес гениталий сходен с клиникой сифилиса и может сопутствовать ему. Поэтому у больных генитальным герпесом лабораторная диагностика сифилиса обязательна.

*Диагностика хронической латентной герпесвирусной инфекции у беременных и внутриутробного инфицирования плода вирусом простого герпеса 2 типа*

4. Ложные результаты исследований могут быть получены при несоблюдении правил и сроков хранения биоматериалов.

Противопоказаний для использования описываемых методов исследования не установлено.