

Современная диагностика микстгерпесвирусной инфекции у детей с вирусными энцефалитами

О.В. Голева¹, Е.А. Мурина¹, Н.В. Скрипченко^{1,3}, Е.Н. Имянитов³, Р.А. Иванова^{1,2}

¹ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Current diagnosis of mixed herpesvirus infection in children with viral encephalitis

O.V. Goleva¹, E.A. Murina¹, N.V. Skripchenko^{1,3}, E.N. Imyanitov³, R.A. Ivanova^{1,2}

¹Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Biomedical Agency, Saint Petersburg, Russia;

²Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia;

³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

Обследованы 65 детей в возрасте от 1 мес до 15 лет с диагнозом вирусного энцефалита, госпитализированных в клинику ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства в 2013–2016 гг.

Цель работы: установить частоту смешанного герпесвирусного инфицирования при вирусных энцефалитах у детей и с применением современных методов диагностики определить роль реактивации герпесвирусной инфекции в развитии вирусных энцефалитов.

Выявление антител к герпесвирусным инфекциям и авидности проводили с помощью иммуноферментных тест-систем; антител к специфическим антигенам цитомегаловируса — методом иммуноблота. Выявление ДНК герпесвирусов в биологическом материале (кровь, цереброспинальная жидкость) осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и с детекцией электрофорезом с использованием наборов для ПЦР диагностики производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва).

Показано, что у детей раннего возраста заболевание развивалось в результате первичного инфицирования, чаще в виде моноинфекции, в старших возрастных группах — на фоне персистенции одного или двух видов герпесвирусов в организме. При энцефалите, вызванном вирусом простого герпеса типов 1, 2, с помощью современного диагностического метода — иммуноблота доказана реактивация цитомегаловируса, который мог быть ко-фактором развития воспаления головного мозга. Применение комплексного лабораторного подхода к этиологической диагностике вирусных энцефалитов, включающего определение классов антител, авидности и антител к отдельным белковым детерминантам вирусных частиц, позволяет уточнять активность различных герпесвирусов при микстинфекции, определять стадию инфекционного процесса, что имеет значение для выбора терапевтической тактики.

Ключевые слова: вирусный энцефалит, герпесвирусы, микстинфицирование, реактивация, иммуноблот.

Для цитирования: Голева О.В., Мурина Е.А., Скрипченко Н.В., Имянитов Е.Н., Иванова Р.А. Современная диагностика микстгерпесвирусной инфекции у детей с вирусными энцефалитами. Рос вестн перинатол и педиатр 2017; 62:(2): 60–64. DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-2-60-64

Sixty-five children aged 1 month to 15 years with a diagnosis of viral encephalitis, who had been admitted to the Clinic of the Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Federal Biomedical Agency, in 2013-2016 were examined.

Objective: to establish the frequency of mixed herpesvirus infection in children with viral encephalitis, by using the current diagnostic methods to determine the role of reactivation of herpesvirus infection on the development of viral encephalitis.

The investigators identified anti-herpesvirus antibodies and their avidity using an enzyme immunoassay and anti-cytomegalovirus antibodies specific for antigens by immunoblotting applying the kits. Herpesvirus DNA was detected in the biological material (blood, cerebrospinal fluid) by real-time polymerase chain reaction (PCR) and by electrophoresis using the PCR kits (Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Moscow). Young children were shown to develop the disease as a result of primary infection more commonly as mono-infection in the old age groups during the persistence of one or two herpesviruses in the body. In encephalitis caused by herpes simplex virus type 1 and type 2, reactivation of cytomegalovirus that could be a cofactor in the development of brain inflammation was proven by the current diagnostic technique immunoblotting. The comprehensive laboratory approach to the etiological diagnosis of viral encephalitis, which encompasses the determination of antibody classes, avidity, and antibodies to individual protein determinants of viral particles, makes it possible to specify the activity of different herpesviruses in mixed infection and to determine the stage of the infectious process, which is important for the choice of therapeutic policy.

Key words: viral encephalitis, herpesviruses, mixed infection, reactivation, immunoblotting.

For citation: Goleva O.V., Murina E.A., Skripchenko N.V., Imyanitov E.N., Ivanova R.A. Current diagnosis of mixed herpesvirus infection in children with viral encephalitis. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2017; 62:(2): 60–64 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-2-60-64

Внастоящее время герпесвирусы по частоте распространения среди детского населения занимают второе место после гриппа и ОРВИ [1]. Широкое распространение герпесвирусов в человеческой популяции приобретает все более выраженные масштабы. Разнообразие клинических проявлений герпесвирусной инфекции обусловлено в том числе различным влиянием вирусов на иммунную систему человека [2]. Одним из самых распространенных «иммуносупрессоров» среди вирусов семейства *Herpesviridae* является цитомегаловирус, персистенция которого в организме может приводить к вторичным иммунодефицитам, особенно при наличии смешанного инфицирования, например, на фоне вирусов простого герпеса типов 1,2, Эпштейна–Барр и др. [3]. В связи с незрелостью гуморального и клеточного иммунитета у новорожденных и детей раннего возраста существует высокий риск развития тяжелых форм заболевания, вызванных цитомегаловирусом [4–6].

В научной литературе описаны острые диссеминированные энцефаломиелиты, имеющие однотипную клиническую картину, но вызываемые разными вирусами (кори, краснухи, ветряной оспы, цитомегаловирусами, респираторными вирусами и многими другими) [7]. В настоящее время отсутствует достаточная информация о степени участия персистирующих герпесвирусов в развитии демиелинизирующих процессов в тканях головного мозга на фоне острого инфекционного заболевания, вызванного другими вирусными агентами [8]. Однако известно, что в основе таких поражений лежат механизмы молекулярной мимикрии между белками вирусов и мозговыми белками, особенно основным белком миелина. Эти процессы связаны с аутоиммунными реакциями, важную роль в которых играет микроглия [9]. Опасность развития энцефалита возникает не только в остром периоде заболевания при первичном инфицировании герпесвирусом, но и во время его реак-

тивации в организме иммунокомпromетированных лиц, что вызывает глубокие органические поражения.

До сих пор не разработаны диагностические подходы к определению этиологической значимости реактивации цитомегаловирусной инфекции в развитии энцефалитов, особенно при смешанном герпесвирусном инфицировании. Поэтому использование новых, инновационных, высокоспецифичных и информативных диагностических приемов позволит приблизиться к решению этой проблемы.

Цель работы: установить частоту встречаемости смешанного герпесвирусного инфицирования при вирусных энцефалитах у детей и с применением современных методов диагностики определить степень влияния реактивации герпесвирусной инфекции на развитие вирусных энцефалитов.

Характеристика детей и методы исследования

Проведено исследование биологического материала (сыворотка крови, цереброспинальная жидкость) 65 детей в возрасте от 1 мес до 15 лет с диагнозом вирусного энцефалита. Дети были госпитализированы в отделения реанимации и нейроинфекций и органической патологии ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства в 2013–2016 гг.

Этиология вирусного энцефалита устанавливалась клинически и лабораторно; подтверждалась выделением ДНК вирусов герпеса из цереброспинальной жидкости и обнаружением в крови противогерпетических антител.

Выявление антител IgM и IgG к герпесвирусным инфекциям дополнительно с определением avidности проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Серопозитивными считались лица, в сыворотке крови которых определялись специфические IgM и/или IgG антитела, оптическая плотность которых превышала критическую оптическую плотность. Степень avidности антител выражалась расчетным значением индекса avidности антител [10]. Выявление ДНК герпесвирусов в биологическом материале (кровь, цереброспинальная жидкость) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и с детекцией электрофорезом.

Выявление антител IgG к специфическим антигенам цитомегаловируса проводили методом иммуноблоттинга. При учете результатов использовали положительные тестовые шаблоны. Обработку и анализ данных осуществляли с использованием прикладных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ результатов скринингового обследования по выявлению антител в крови у наблюдавшихся 65 детей с вирусным энцефалитом (см. рисунок). Анализ частоты встречаемости мар-

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: Голева Ольга Владимировна – к.б.н., ст. научн. сотр. лаборатории вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней ФМБА России

Мурина Елена Александровна – д.б.н., вед. научн. сотр., рук. лаборатории вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Детского научно-клинического центра инфекционных болезней ФМБА России
Скрипченко Наталья Викторовна – д.м.н., проф., зам. директора по науке Детского научно-клинического центра инфекционных болезней ФМБА России

Иванова Регина Анатольевна – к.м.н., научный сотрудник отдела врожденной инфекционной патологии Детского научно-клинического центра инфекционных болезней ФМБА России; доцент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова

197022 Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9

Имянитов Евгений Наумович – д.м.н. проф., чл.-корр. РАН, зав. кафедрой общей и молекулярной медицинской генетики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета
194100 Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

керов герпесвирусов у обследованных детей в возрасте до 1 года ($n=16$) показал, что в 63%* случаев в крови были выявлены маркеры только одного вида герпесвируса и в 37% случаев – двух видов герпесвирусов. У детей в возрасте от 1 года до 3 лет ($n=10$) частота выявления маркеров двух видов герпесвирусов превалировала и составила 70% случаев, еще в 10% случаев одновременно определялись маркеры трех видов герпесвирусов.

В группе детей от 3 до 7 лет ($n=19$) в 63% случаев были выявлены маркеры трех видов герпесвирусов одновременно, такие же данные получены в группе детей от 7 до 15 лет ($n=20$). Таким образом, вирусные энцефалиты у детей раннего возраста чаще развивались на фоне первичного инфицирования герпесвирусом как моноинфекция, тогда как в старших возрастных группах имело место микстинфицирование на фоне персистенции одного или двух видов герпесвирусов, роль которых до конца не выяснена.

Для уточнения роли реактивации герпесвирусной инфекции при сочетанном инфицировании у детей с вирусными энцефалитами была отобрана группа детей ($n=28$), у которых заболевание обусловлено вирусом простого герпеса типов 1, 2 (см. таблицу). В обследуемой группе детей мононфицирование вирусом простого герпеса типов 1, 2 отмечалось лишь у 5 (17,9%) детей. Преваляло смешанное инфицирование, установленное у 23 (82,1%) детей, из них у 17 (73,8) детей выявлено микстинфицирование с цитомегаловирусом. Дополнительно было отмечено, что в этих же группах регистрировались самые длительные сроки госпитализации. Также у всех обследованных пациентов антитела к цитомегаловирусу в крови тестировались в основном IgG класса и в 88,2% случаев (у 15 детей) были высокоаavidными (индекс avidности от 70 до 90%), что подтверждало инфицирование данным вирусом на сроках более 3 нед от начала основного заболевания. Таким образом, в одних случаях вирусный энцефалит развивался при первичном

* Здесь и далее процент вычислен условно, так как количество детей меньше 100.

Таблица. Частота выявления различных маркеров герпесвирусов при вирусном энцефалите, вызванном вирусом простого герпеса типов 1, 2 ($n=28$)

Table. Frequency of detection of various herpes virus markers in case of viral encephalitis caused by 1, 2 types of herpes simplex ($n=28$)

Маркеры герпесвирусов	Частота обнаружения, %	Количество койко-дней
Моноинфицирование ($n=5$)	17,9	17,4±3,7
Микстинфицирование ($n=23$)	82,1	
В том числе:		
ВПГ 1,2 + ВЭБ ($n=6$)	26,1	20,3±5,4
ВПГ 1,2+ЦМВ ($n=9$)	39,1	30,5±7,3
ВПГ 1,2+ЦМВ+ВЭБ ($n=5$)	21,7	24,7± 4,9
ВПГ 1,2+ЦМВ+ВГЧ-6 ($n=3$)	13,0	30,3±7,3

Примечание. ВПГ1,2 – вирус простого герпеса типов 1, 2; ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ЦМВ – цитомегаловирус; ВГЧ-6 – вирус герпеса человека 6-го типа

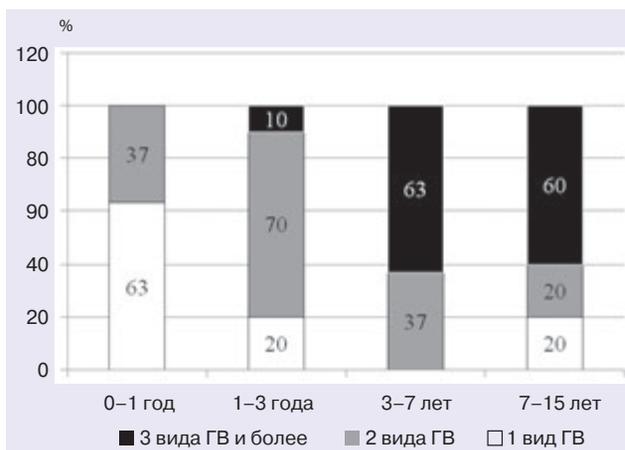


Рисунок. Частота выявления моно- и сочетанного инфицирования герпесвирусами (ГВ) при вирусных энцефалитах в период 2013–2015 гг. ($n=65$).

Figure. Frequency of detection of mono- and mixed herpes virus infection in case of viral encephalitis in the period 2013–2015 ($n=65$).

инфицировании вирусом простого герпеса типов 1, 2 как моноинфекция, в других – на фоне смешанной герпесвирусной инфекции, среди которой преобладала цитомегаловирусная инфекция.

Высокое диагностическое значение в лабораторной практике в настоящее время имеет высокочувствительный и специфичный метод – иммуноблот (вестернблот, лайнблот). Известно, что данную технологию с высокой эффективностью можно применять в том числе у лиц с выраженным иммунодефицитом, а также для дифференциальной диагностики врожденной и приобретенной цитомегаловирусной инфекции [11]. Использование теста позволяет точно установить сроки и период инфекционного процесса. Так, при первичной цитомегаловирусной инфекции тестируются IgG-антитела только к ранним белкам (MIE) и p65; при позднем периоде (более 6 мес) возникает IgG-реактивность против белка тегиента p150 и гликопротеинов (gB1 и/или gB2). На реактивацию инфекции может указывать наличие IgG-антител к белку тегиента p150 в сочетании с антителами к мембранным

гликопротеинам (gB1, gB2) и к предраннему белку М1Е и раннему белку р65. Описанная блот-технология была выбрана нами для дополнительного изучения степени влияния персистирующей микстинфекции на течение основного заболевания, вызванного вирусом простого герпеса типов 1, 2.

У 9 детей с герпетическим энцефалитом методом ИФА провели исследование сыворотки крови на антитела IgM и IgG к цитомегаловирусу. Антитела острой фазы в крови у детей отсутствовали; выявлены только иммуноглобулины, характеризовавшие поздний период инфекционного процесса. Индекс avidности IgG-антител был в пределах 60 – 83%, подтверждающая, что инфицирование цитомегаловирусом произошло в прошлом. При применении блот-технологии у данной группы пациентов обнаружены маркеры реактивации цитомегаловирусной инфекции. Доказательством реактивации инфекции на фоне основного заболевания служили положительные отклики IgG-антител к предраннему белку М1Е, антитела к которому появляются уже через 14–18 дней после инфицирования, и отклики IgG антител к мембранным гликопротеинам (gB1 и gB2). Данные маркеры появлялись на фоне сохраняющихся в высоких титрах «поздних» IgG-антител к основному белку тегумента р150, указывающих на давнее инфицирование. Таким образом, реактивация цитомегаловирусной инфекции предшествовала инфицированию вирусом простого герпеса типов 1, 2 и, скорее всего, служила усугубляющим фактором при развитии тяжелого поражения головного мозга. Проведенные исследования позволили уточнить одну из причин тяжелого течения герпетической инфекции у детей. Определение стадии

инфекционного процесса, вклада каждого инфекционного агента в развитие и течение заболевания позволило обосновать целесообразность адекватной этиологической и патогенетической терапии.

Выводы

Развитие герпетического энцефалита может быть результатом как моно-, так и микст-инфицирования герпесвирусами. У детей до года в 63% случаев имела место моногерпетическая инфекция (вирус простого герпеса типов 1, 2). У детей в возрасте от 1 года до 3 лет частота выявления смешанного инфицирования (два вида герпесвируса) достигала 70%. В группе детей от 3 до 7 лет в 63% случаев были выявлены маркеры трех видов герпесвирусов одновременно, такие же данные получены в группе детей более старшего возраста (от 7 до 15 лет).

У детей с вирусными энцефалитами, вызванными вирусом простого герпеса типов 1, 2, возможна реактивация цитомегаловирусной инфекции, что подтверждено выявлением в иммуноблоте антител к предраннему белку (М1Е) и ранним гликопротеинам (gB1 и gB2) цитомегаловируса на фоне циркуляции антител к позднему белку тегумента р150. В случае микстинфицирования имело место более тяжелое повреждение головного мозга.

Применение комплексного лабораторного подхода к этиологической диагностике вирусных энцефалитов, включающего определение классов антител, avidности и антител к отдельным белковым детерминантам вирусных частиц, позволяет уточнить активность различных герпесвирусов при микстинфекции, определить стадию инфекционного процесса, что является значимым при выборе терапевтической тактики.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. *Виколов Г.Х.* Герпесвирусные инфекции человека в новом тысячелетии: классификация, эпидемиология и медико-социальное значение. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы 2014; 3: 35–40. [Vikulov G.H. Human herpes virus infections of a new millennium: classification, epidemiology and medical-social value. *Jepidemiologija i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy* 2014; 3: 35–40. (in Russ)]
2. *Долгих Т.И., Минакова Е.Ю., Сербаяев Д.А.* Герпесвирусные инфекции: стратегия диагностики. Лабораторная диагностика 2014; 5: 4–7. [Dolghih T.I., Minakova E.Ju., Serbaev D.A. Herpes virus infections: diagnostics strategy. *Laboratornaja diagnostika* 2014; 5: 4–7. (in Russ)]
3. *Бабаченко И.В., Мельник О.В., Левина А.С.* Цитомегаловирусная инфекция у часто болеющих детей. Инфекционные болезни 2012; 3(4): 19–24. [Babachenko I.V., Mel'nik O.V., Levina A.S. Cytomegalovirus infection in frequently ill children. *Infekcionnye bolezni* 2012; 3(4): 19–24. (in Russ)]
4. *Орехов К.В., Голубева М.В., Барычева Л.Ю.* Врожденная цитомегаловирусная инфекция. Детские инфекции 2004; 1: 49–55. [Orehov K.V., Golubeva M.V., Barycheva L.Ju. Congenital cytomegalovirus infection. *Detskie infekcii* 2004; 1: 49–55. (in Russ)]
5. *Ефремова Н.А., Горячева Л.Г., Рогозина Н.В., Алексеева Л.А., Котив М.Я.* Клинико-лабораторные особенности неонатальных гепатитов различной этиологии. Детские инфекции 2012; 11(2): 8–11. [Efremova N.A., Gorjacheva L.G., Rogozina N.V., Alekseeva L.A., Kotiv M.Ja. Clinical and laboratory features of neonatal hepatitis of various aetiology. *Detskie infekcii* 2012; 11(2): 8–11. (in Russ)]
6. *Иванова Р.А., Васильев В.В., Вихнина С.М., Бобошко М.Ю., Ушакова Г.М.* Проблема врожденной цитомегаловирусной инфекции. Журнал инфектологии 2016; 8(2): 26–31. [Ivanova R.A., Vasil'ev V.V., Vihnina S.M., Boboshko M.Yu., Ushakova G.M. Problem of congenital cytomegalovirus infection. *Zhurnal infektologii* 2016; 8(2): 26–31. (in Russ)]
7. *Идрисова Ж.Р., Воробьева Н.Л., Гервазиева В.Б., Деконенко Е.П., Петрухин А.С.* Прогностическая роль антител к основному белку миелина при вирусных энцефалитах. Альманах клинической медицины 2001; 4: 60–62. [Idrisova Zh.R., Vorob'eva N.L., Gervazieva V.B., Dekonenko E.P., Petruhin A.S. Prognostic role of antibodies to myelin basic protein in case of viral encephalitis. *Al'manah klinicheskoy mediciny* 2001; 4: 60–62. (in Russ)]
8. *Спириин Н.Н., Степанов И.О., Касаткин Д.С., Шипова Е.Г.* Диагностика, дифференциальная диагностика и прин-

- ципы терапии острого рассеянного энцефаломиелита. Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum 2008; 2: 23–28. [Spirin N.N., Stepanov I.O., Kasatkin D.S., Shipova E.G. Diagnostics, differential diagnostics and principles of acute disseminated encephalitis therapy. Nevrologiya i revmatologiya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum 2008; 2: 23–28. (in Russ)]
9. Adenot M., Frobert E., Blanchard G., Morel B., Perrot L., Floret D., Javouhey E. Clinical presentation of severe viral encephalitis with known causative agents in children. J Child Neurol 2014; 29: 1508–1518. DOI: 10.1177/0883073813513330.
10. Обрядина А.П., Корнина Е.О. Использование метода определения avidности IgG в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний. Дальневосточный журнал инфекционной патологии 2006; 9: 98–99. [Obryadina A.P., Kornina E.O. Use of IgG avidity determination method in laboratory diagnostics of infectious diseases. Dalnevostochniy zhurnal infektsionnoy patologii 2006; 9: 98–99. (in Russ)]
11. Долгих Т.И. Современные возможности лабораторной диагностики инфекционных заболеваний (методы, алгоритмы, интерпретация результатов). Омск 2005; 40. [Dolgiy T.I. Modern possibilities of laboratory diagnostics of infectious diseases (methods, algorithms, interpretation of results). Omsk 2005; 40. (in Russ)]

Поступила 12.12.16

Received on 2016.12.12

Работа поддержана грантом РФФИ 15–15–00079.

The investigation was supported by Russian Science Foundation grant 15-05-00079.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие иного конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

The authors declare no other conflict of interest, which should be reported.