

14. Zhang J.Y., Zhang Z., Lin F., Zou Z.S., Xu R.N., Jin L. et al. Interleukin-17 — producing CD4⁺ T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010; 51(1): 81-91.
15. Hu X., Ma S., Huang X., Jiang X., Zhu X., Gao H. et al. Interleukin-21 is upregulated in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure and associated with severity of liver disease. *J. Viral Hepat.* 2011; 18(7): 458—67.
16. Zhai S., Zhang L., Dang S., Yu Y., Zhao Z., Zhao W. et al. The ratio of Th-17 to Treg cells is associated with survival of patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Viral Immunol.* 2011; 24(4): 303—10.
17. Wang X., Sun R., Wei H., Tian Z. High-mobility group box 1 (HMGB1) -toll-like receptor (TLR) 4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of $\gamma\delta$ T cells with macrophages. *Hepatology*. 2013; 57(1): 373—84.
18. Meng F., Wang K., Aoyama T., Grivennikov S.I., Paik Y., Scholten D. et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012; 143(3): 765—76.
19. Wang C., Collins M., Kuchroo V.K. Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters? *Curr. Opin. Immunol.* 2015; 37: 6—10.
20. Ye C.J., Feng T., Kwon H.K., Raj T., Wilson M.T., Asinowski N. et al. Intersection of population variation and autoimmunity genetics in human T cell activation. *Science*. 2014; 345(6202): 1254665.
21. Moisan J., Grenningloh R., Bettelli E., Oukka M., Ho I.C. Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 2825—35.
22. Nan Y.M., Zhang Y.G., Zheng H.W., An C.M., Li Y.S., Zhang Y. et al. Individualized treatment strategies and predictors of virological response for chronic hepatitis C: a multicenter prospective study from China. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14871—84.
23. Abramson J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2011; 8(1): 1.
24. Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods*. 2009; 41(4): 1149—60.
25. Dunn O.J. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 1964; 6(3): 241—52.

Поступила 25.02.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.98:578.825.11]-078.33-073.537:618.39

Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЕРТВОРОЖДЕННЫХ

Патологоанатомическое бюро Комитета здравоохранения Ленинградской области, 197110, г. Санкт Петербург

Врожденная герпетическая инфекция относится к разряду актуальных проблем перинатальной медицины. Патологоанатомическая диагностика этой инфекции неэффективна при рутинном методе аутопсийного исследования без использования вирусологических исследований. Цель исследования — определить значение метода флуоресцирующих антител в диагностике врожденной герпетической инфекции мертворожденных. В 96 случаях мертворождения проведено иммунофлуоресцентное определение вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и цитомегаловирусов (ЦМВ) в плаценте и внутренних органах (головной мозг, сердце, легкие, печень). Полученные данные сопоставлены с результатами расширенного гистологического исследования сердца, включая его ритмогенные центры. Герпетические вирусы обнаружены в 51 (53,1%) наблюдении, среди них ВПГ-1 — в 16 (16,7%), ВПГ-2 — в 19 (19,7%), ЦМВ — в 16 (16,7%). У 34 (35,8%) мертворожденных выявлены патоморфологические признаки герпетического атриального миокардита, которые были расценены в качестве причины смерти. Использование метода флуоресцирующих антител в аутопсийной практике является эффективным способом диагностики внутриутробной инфекции, обусловленной ВПГ и ЦМВ.

Ключевые слова: мертворожденный; метод флуоресцирующих антител; врожденная герпетическая инфекция.

Для цитирования: Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Белитченко Н.В., Сосунова О.А. Иммунофлуоресцентная диагностика герпесвирусной инфекции у мертворожденных. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 219-221.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-219-221

Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Belitchenko N.V., Sosunova O.A.

IMMUNOFLUORESCENCE DIAGNOSIS OF THE HERPESVIRUS STILLBORN INFECTION

Pathological Anatomy Bureau, Committee of Health of the Leningrad Region, St. Petersburg, 197110, Russian Federation

Congenital herpes infection belongs to the category of actual problems of Perinatal Medicine. Pathological diagnosis of this disease is not effective in the routine method of autopsy studies without virological research. Objective. Determination of the value of the fluorescent antibody technique in the diagnosis of congenital herpes infection of the stillborn is a promising approach to medical diagnosis. Subjects and methods. In 96 cases of stillbirth immunofluorescent identification of herpes simplex virus types 1 and 2 and cytomegalovirus in the placenta and internal organs (brain, heart, lungs, and liver) was implemented. The findings were compared with the results of a complete histological examination of the heart, including its rhythmogenic centers. Results. The herpes viruses were found in 51 observations (53.1%). Among them, HSV-1 were found in 16 observations (16.7%), HSV-2, in 19 (19.7%), CMV, in 16 (16.7%). In 34 stillbirths (35.8%) the pathological signs of herpetic atrial

Для корреспонденции: Глуховец Борис Ильич, д-р мед. наук, Патологоанатомическое бюро Комитета здравоохранения Ленинградской области, 197110, г. Санкт Петербург. E-mail: 2307165@yandex.ru

myocarditis were observed, which were regarded as the cause of death. Conclusion. The use of the fluorescent antibody technique in the autopsy practice is an effective way of diagnosis of intrauterine infection caused by the herpes simplex virus and cytomegalovirus.

Key words: stillborn; fluorescent antibody technique; congenital herpes infection.

For citation: Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Belitchenko N.V., Sosunova O.A. Immunofluorescence diagnosis of the herpesvirus stillborn infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 219-221. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-219-221

For correspondence: Boris I. Glukhovets, MD, PhD, DSc, Pathological Anatomy Bureau, Committee of Health of the Leningrad Region, St. Petersburg, 197110, Russian Federation. E-mail: b2307165@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 02 October 2015
Accepted 19 November 2015

Герпетическая инфекция, обусловленная вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и цитомегалии (ЦМВ), представляет серьезную угрозу для развития беременности при любом сроке гестации и нередко служит причиной ранних и поздних выкидышей, а также внутриутробной гибели жизнеспособных плодов [1—5]. В то же время в большинстве подобных случаев при аутопсийном исследовании мертворожденных патоморфологическая диагностика вирусной патологии не имеет должной основы в связи с рутинной методикой вскрытия без использования целенаправленных вирусологических методов [6]. На этом основании в подавляющем большинстве регионов Российской Федерации в структуре причин перинатальной смертности до настоящего времени преобладает диагноз «внутриутробная гипоксия», в то время как герпесвирусная инфекция относится к числу казуистических явлений [7].

Цель исследования — определить возможность применения и значение метода флуоресцирующих антител (МФА) в аутопсийной практике для диагностики внутриутробного инфицирования ВПГ и ЦМВ.

Материал и методы

Проведено комплексное исследование в 96 случаях мертворождения, имевших место в родовспомогательных учреждениях Ленинградской области. 68 плодов были недоношенными с массой тела от 500 до 2500 г и сроком гестации от 22 до 37 нед, остальные 28 — доношенными с массой тела свыше 2500 г и сроком гестации 38—41 нед.

В работе использованы иммунофлуоресцентный и топографогистологический методы.

МФА в его прямой и непрямой модификации имеет широкое распространение в лабораторной диагностике различных вирусных заболеваний. Достоинства метода включают приемлемую стоимость, высокую специфичность (90%) и значительную чувствительность (55—75%), быстроту получения результатов; недостатками являются зависимость от качества забора материала и стадии заболевания, а также от квалификации врача-вирусолога [1, 2].

В нашей практике иммунофлуоресцентные исследования на вирусные агенты осуществлялись с некоторыми модификациями. С целью повышения эффективности применяли расширенную методику забора исследуемого материала, включающую приготовление мазков-соскобов базальной (материнской) поверхности плаценты, конвексимальной поверхности мягких мозговых оболочек, эндокарда правого предсердия, а также поверхности разреза легких и печени. Существенным

условием успешного выявления флуоресцирующих антигенов в аутопсийном материале оказалось наличие в мазке достаточного количества (не менее 10—15) эпителиальных (эндотелиальных) клеток. Кроме того, каждая локализация требовала забора на 3 отдельных предметных стекла по числу искомым вирусам (ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ). В связи с этим проводилось иммунофлуоресцентное исследование не менее 15 препаратов в каждом наблюдении, и лишь при таком объеме можно было рассчитывать на максимальную эффективность лабораторной верификации вирусных антигенов в органах умершего плода. В работе использовали люминесцентный микроскоп ЕС ЛЮМАМ-РПО 11 и диагностические тест-системы производства «ЛабДиагностика» (Москва), а также иммуноглобулины флуоресцирующие для быстрой диагностики вирусных инфекций, выпускаемые «Предприятием по производству диагностических препаратов НИИ гриппа» (Санкт-Петербург).

Топографогистологический метод заключался в анатомической препаровке сердца с последующим микроскопическим исследованием препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, состояния левого и правого желудочков, межжелудочковой перегородки, а также купола правого предсердия и нижнего сегмента межпредсердной перегородки, в которых соответственно располагаются синоатриальный и атриовентрикулярный биоэлектрические узлы. Подобным образом обеспечивалась возможность прицельного исследования сократительной, проводящей и ритмогенной систем миокарда, что имело принципиальное значение в связи с ведущей ролью *асистолии* в танатогенезе антенатальной гибели плода [8].

Результаты

В исследованной группе антигены герпетических вирусов были выявлены у 51 (53,1%) мертворожденного, в том числе ВПГ-1 — у 16 (16,7%), ВПГ-2 — у 19 (19,7%), ЦМВ — у 16 (16,7%). Чаще всего вирусы определялись в плаценте (64,7%), мягких мозговых оболочках (35,3%) и эндокарде (15,7%) в основном в изолированном (68,6%) и реже (31,4%) в сочетанном вариантах. В отличие от этого в мазках-соскобах из печени и легких антигены выявлялись в единичных случаях.

При сопоставлении результатов иммунофлуоресцентной диагностики с гестационным сроком было установлено, что в целом относительная частота инфицирования недоношенных и доношенных мертворожденных находилась на одном статистическом уровне (соответственно 52,9 и 53,6%). При этом в группе недоношенных плодов отмечено некоторое преобладание частоты обнаружения антигенов ВПГ-1 (20,5%) по сравнению

со сходными показателями ВПГ-2 и ЦМВ (по 16,2%). В отличие от этого у доношенных плодов преобладали антигены ВПГ-2 (28,6%) и ЦМВ (17,9%), в то время как антигены ВПГ-1 были обнаружены всего у 7,1%.

При патоморфологическом исследовании мертворожденных в 34 (35,8%) наблюдениях герпетической инфекции, возбудители которой были выявлены в плаценте и органах плода, обнаружены патоморфологические признаки поражения сердца. Эти изменения не имели существенных вирусотипических различий и локализовались преимущественно в атриальном отделе, в связи с чем были обозначены как «атриальный миокардит». Основные проявления герпетического поражения сердца включали повреждение эндотелия дистальных ветвей коронарных артерий, некробиотические изменения кардиомиоцитов и вегетативных ганглиев, мелкоочаговые моноцитарные инфильтраты и острое нарушение микроциркуляторного кровоснабжения в стенке правого предсердия. Развитие атриального миокардита в 24 (22,1%) наблюдениях внутриутробной смерти плодов имело изолированный характер. Генерализация инфекционного процесса, обнаруженная в остальных 10 (10,5%) наблюдениях герпетической инфекции, наряду с поражением сердца документировалась как моноцитарная инфильтрация мягких мозговых оболочек и очаговые проявления гигантоклеточного гепатита. У 17 (17,9%) мертворожденных антигены герпетических вирусов были выявлены исключительно в базальной пластине плаценты на фоне декомпенсированной хронической плацентарной недостаточности, которая и была расценена в качестве основной причины внутриутробной гибели плода в связи с отсутствием признаков атриального миокардита.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности МФА в диагностике врожденной инфекции, обусловленной ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ. Достоверность использованного метода в определенной мере подтверждается опубликованными ранее результатами вирусологического обследования внутренних органов 48 мертворожденных, проведенного с помощью ПЦР [9]. ВПГ верифицированы в 23,8%, а ЦМВ — в 23,1% случаев, что в целом составило 46,9%. Эти данные, с одной стороны, сопоставимы с полученными нами показателями (53,1%), а с другой — свидетельствуют о возможности ложноположительных результатов при использовании люминесцентного выявления флуоресцирующих иммунных комплексов.

Обнаружение антигенов герпетических вирусов в плаценте и органах мертворожденных безусловно свидетельствует о наличии соответствующей врожденной инфекции, но не объясняет причину внутриутробной гибели плода. Для этого требуются целенаправленные поиски патоморфологических эквивалентов заболевания, в ходе которых особое внимание следует обращать на наличие признаков вирусного поражения ритмогенных зон сердца, что, по нашим данным, служит ведущей причиной антенатальной смерти плодов, инфицированных ВПГ и ЦМВ.

Некоторые различия в частоте верификации различных видов простого герпеса у недоношенных и доношенных мертворожденных, вероятнее всего, связаны с вирусным фоном материнского организма и особенностями иммунного статуса фетоплацентарной системы у незрелых и зрелых плодов [5]. Врожденных пороков

развития в исследованной группе мертворожденных с герпесвирусной инфекцией не обнаружено.

Заключение

Использование МФА в аутопсийной практике является достаточно эффективным способом диагностики внутриутробной инфекции, обусловленной ВПГ и ЦМВ. При этом наибольшей информативностью отличаются исследования мазков-соскобов базальной поверхности плаценты, мягких мозговых оболочек и эндокарда. Полученные данные служат основанием для прицельного поиска патоморфологических проявлений врожденной вирусной болезни, среди которых наибольшее значение имеют признаки атриального миокардита. В целом проведенные исследования имеют прямое отношение к решению важнейшей проблемы современного акушерства — достоверной диагностике причины внутриутробной смерти плодов и свидетельствуют о целесообразности внедрения МФА в практическую деятельность патолого-анатомической службы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3—5 см. REFERENCES)

1. Баринский И.Ф., Чешик С.Г. Герпесвирусные инфекции. В кн.: Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: Медицинское информационное Агентство; 2008: 412—34.
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. *Герпесвирусные болезни человека*. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г., Перетятко Л.П. Введение в фетальную нозологию. *Архив патологии*. 2010; (6): 9—11.
4. Фролова О.Г., Шувалова М.П., Гребенник Т.К., Долгушина Н.В. Перинатальная смертность в Российской Федерации. Возможные пути ее снижения. *Акушерство и гинекология*. 2012; (6): 47—51.
5. Глуховец Б.И. Миокардиодистрофия с точки зрения детского патологоанатома. *Вопросы современной педиатрии*. 2011; 10(1): 103—5.
6. Адиева А.А., Нисевич Л.Л., Гаджиева З.С., Цибилов А.С., Талалаев А.Г., Каск Л.Н. и др. ПЦР in situ для выявления ДНК вируса простого герпеса и цитомегаловируса в материалах аутопсии плодов и умерших новорожденных. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2010; (2): 20—5.

REFERENCES

1. Barinskiy I.F., Cheshik S.G. Herpesvirus infections. In: L'vov D.K., ed. *Medical Virology [Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe Agentstvo; 2008: 412—34. (in Russian)
2. Isakov V.A., Arkhipov E.I., Isakov D.V. *Herpesvirus Disease in Humans [Gerpesvirusnye bolezni cheloveka]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
3. Kimberlin D.W., Lin C.Y., Jacobs R.F. Neonatal herpes simplex infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(1): 1—13.
4. Malm G., Engman M.L. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12 (3): 154—9.
5. Rudnick C.M., Hoekzema G.S. Neonatal herpes simplex virus infections (Revege). *Am. Fam. Physician.* 2002; 65 (6): 1138—43.
6. Glukhovets B.I., Glukhovets N.G., Peretyat'ko L.P. Introduction to fetal nosology. *Arkhiv patologii*. 2010; (6): 9—11. (in Russian)
7. Frolova O.G., Shuvalov M.P., Grebennik T.K., Dolgushina N.V. Perinatal mortality in the Russian Federation. Possible ways to reduce it. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2012; (6): 47—51. (in Russian)
8. Glukhovets B.I. Myocardiodystrophy in terms of child pathologist. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2011; 10(1): 103—5. (in Russian)
9. Adieva A.A., Nisevich L.L., Gadzhieva Z.S., Tsibizov A.S., Talalaev A.G., Kask L.N. et al. In situ PCR to detect DNA of the herpes simplex virus and cytomegalovirus in material autopsy of dead fetuses and newborns. *Voprosy diagnostiki v pediatrii*. 2010; (2): 20—5. (in Russian)

Поступила 02.10.15

Принята в печать 19.11.15