

Metoda izolacji wirusa w algorytmie współczesnej diagnostyki laboratoryjnej opryszczki genitalnej

Virus isolation method in the modern diagnostic algorithm of the laboratory diagnosis of genital herpes

Anna Majewska, Grażyna Młynarczyk

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Dostępność skutecznych leków przeciwwirusowych zwiększa znaczenie prowadzenia diagnostyki laboratoryjnej opryszczki narządów płciowych. Objawy miejscowe nie zawsze pozwalają na właściwe rozpoznanie zakażenia. Wirus może być izolowany z próbek pobranych ze zmian w okolicy genitalnej, przy użyciu hodowli komórkowej. Metodę izolacji wirusa w hodowli komórek od wielu lat traktuje się jako referencyjną, do której porównywane są inne bezpośrednie testy wirusologiczne. Pozytywny wynik izolacji wirusa *in vitro* ma znaczącą wartość dowodową, negatywny nie wyklucza zakażenia. Obecnie coraz częściej w laboratoriach na całym świecie wykorzystywane są metody molekularne, na przykład klasyczny PCR i PCR w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR). Ważnymi zaletami tych metod są znacznie mniejszy wpływ czynności przedlaboratoryjnych na wynik badania oraz krótszy czas oczekiwania na wynik. Obie te metody, w określonym zakresie, umożliwiają detekcję lekoopornych szczepów wirusów opryszczki.

Słowa kluczowe: diagnostyka laboratoryjna, izolacja wirusa, opryszczka genitalna, PCR

Gin. Perinat. Prakt. 2018; 3, 1: 16–22

Wstęp

Opryszczka genitalna jest powszechnie występującą chorobą przenoszoną drogą płciową. Etiologicznie jest związana z wirusami opryszczki zwykłej typu 1 (HSV-1, *herpes simplex virus type 1*) i typu 2 (HSV-2, *herpes simplex virus type 2*). Obecnie HSV-1 jest częstym, a w niektórych populacjach dominującym, czynnikiem pierwotnej postaci opryszczki narządów płciowych. **Według WHO około 536 mln ludzi na świecie jest zakażonych typem 2 wirusa.** Wirus *herpes simplex* typu 1 (HSV-2) odpowiada za poważny przebieg zakażenia, z większą liczbą wtórnych epizodów i prawdopodobnie wyższym mianem wirusów w zmianach na skórze i błonach śluzowych. Objawy opryszczki mogą być bardziej nasilone u osób z obniżoną odpornością (po przeszczepieniu, zakażonych HIV), u kobiet w ciąży i noworodków [1–4].

Infekcja okołogenitalna, ze względu na występowanie zmian o charakterze nadżerek, ułatwia zakażenie innymi patogenami przenoszonymi drogą kontaktów płciowych, w tym HIV. Ponadto obecność wirusów w kanale rodym stwarza ryzyko wewnątrzmacicznego zakażenia płodu lub przeniesienia wirusa na noworodka podczas porodu drogami natury [2, 5–7].

Obecnie dostępnych jest kilka metod laboratoryjnych, które mogą być wykorzystane w rozpoznawaniu miejscowych zakażeń HSV. Coraz rzadziej wykorzystywana jest metoda izolacji wirusów w hodowli komórkowej, która w algorytmie diagnostycznym funkcjonuje nadal jako metoda referencyjna [8]. Pomimo wielu zalet, jest ona zastępowana przez metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych (NAATs, *nucleic acid amplification tests*). Wykorzystuje się zestawy komercyjne lub zaprojektowane w laboratoriach testy cechujące się zmienną czułością

Adres do korespondencji: Anna Majewska, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02–004 Warszawa, e-mail: amajewska@wum.edu.pl

i swoistością [9, 10]. Nie wszystkie testy molekularne posiadają akceptację Agencji Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) do wykrywania wirusów opryszczki zwykłej w próbkach pobranych z okolicy genitalnej [8]. **Postęp w dziedzinie biologii molekularnej oraz dostęp do najnowszych technik diagnostycznych sugerują konieczność zmiany algorytmu rozpoznawania opryszczki genitalnej w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych.**

Rozpoznanie kliniczne opryszczki genitalnej

Rozpoznanie kliniczne zakażenia ma ograniczoną wartość dowodową. Typowe objawy występują u około 20% kobiet z pierwotną postacią zakażenia. Dodatkowo charakterystyczne wykwity w postaci cienkościennych pęcherzyków (wypełnionych płynem surowicznym zawierającym wiriony) mogą utrzymywać się krótko, na przykład kilka godzin, zwłaszcza wówczas, gdy są umiejscowione na błonach śluzowych. Ponadto u części chorych objawy występują w miejscach nietypowych lub niedostępnych podczas rutynowego badania ginekologicznego [11–13]. Wykwity sugerujące opryszczkę genitalną mogą być wywołane przez inne mikroorganizmy (np. *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*), czynniki niezakaźne (między innymi choroba Leśniowskiego-Crohna, chorobę Behçeta, nadwrażliwość na leki), a nawet sugerować zmiany nowotworowe, z tego względu istotną rolę w rozpoznaniu zakażenia odgrywa laboratoryjna diagnostyka wirusologiczna [8, 14–16].

Diagnostyka laboratoryjna zakażenia

Diagnostyka laboratoryjna umożliwia potwierdzenie rozpoznania klinicznego. Jest pomocna w zakażeniach atypowych, różnicuje infekcje wirusami opryszczki zwykłej z innymi patologiami występującymi na skórze i/lub błonach śluzowych. Umożliwia również identyfikację bezobjawowych nosicieli, którzy są źródłem wirusa. Na podstawie wyniku badania wirusologicznego wprowadza się leczenie przeciwwirusowe oraz planuje profilaktykę przeniesienia wirusów drogą płciową lub okołoporodową [5, 8, 14, 17].

Największe znaczenie w rozpoznaniu opryszczki genitalnej ma bezpośrednia diagnostyka laboratoryjna. Jest dostępnych kilka metod umożliwiających detekcję wirusów w próbce materiału, na przykład izolacja HSV w hodowli komórkowej lub metody oparte o amplifikację kwasów nukleinowych. Rzadziej stosowane są odczyn immunofluorescencji bezpośredniej (DIF, *direct immunofluorescence*) i immunoenzymatyczny (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Nie rekomenduje się wykrywania antygenów w klinicznym materiale bezpośrednim

za pomocą tych metod ze względu na niższą czułość przy akceptowalnej swoistości [8, 14, 17, 18]. Również badania serologiczne mają ograniczoną wartość diagnostyczną; pozwalają wprawdzie na potwierdzenie ekspozycji, jednak nie informują o miejscu zakażenia. Dodatkowo ograniczona przydatność związana jest z powszechną prevalencją. Seroprevalencja HSV-1 wynosi 50–70% w krajach rozwiniętych i blisko 100% w niektórych, ściśle zdefiniowanych populacjach [1, 4, 15, 19]. Seroprevalencja HSV-2 waha się w zakresie 10–40% i jest znamienne wyższa (60–95%) u osób zakażonych HIV i kobiet związanych z przemysłem seksualnym [15, 20, 21]. Według naszej wiedzy w Polsce dotychczas wykonano tylko jedno badanie seroepidemiologiczne. Zdaniem autorów wyniki, ze względu na dobór próbek surowicy, mogą nie być reprezentatywne dla całej populacji kraju; przeciwciała przeciw HSV-1 i HSV-2 wykryto u odpowiednio 89,9% i 9,1% badanych [21]. Wprawdzie detekcja przeciwciał przeciwko HSV-2 prawie zawsze świadczy o infekcji genitalnej, oznaczenie przeciwciał swoistych dla typu 1 wirusa nie przesądza o – tak często związanej z tym typem wirusa – opryszczce narządów płciowych, bowiem HSV-1 może powodować zakażenia o różnej lokalizacji [14, 22, 23].

Od lat izolacja wirusa w hodowli komórkowej uznawana jest za złoty standard w diagnozowaniu miejscowych zakażeń wywołanych wirusami opryszczki. Jest to metoda referencyjna, względem której porównuje się inne bezpośrednie testy wirusologiczne [8, 12, 14]. Na wynik badania metodą hodowli komórkowej wpływa w sposób istotny postępowanie przedlaboratoryjne. Obecnie brak jest ujednoliconej procedury izolacji HSV *in vitro*. Wiadomo, że należy zadbać o pobranie właściwej próbki, odpowiednią wymazówką, zabezpieczenie materiału przed kontaminacją oraz niekorzystnym działaniem środowiska (temperatura, promieniowanie, pH) oraz zastosować permissywną hodowlę komórkową [8, 14, 18].

Niezależnie od wyboru metody badania w kierunku opryszczki genitalnej, konieczne jest pobranie materiału. W przypadku zakażeń objawowych próbkę uzyskuje się z chorobowo zmienionych miejsc. Objawy opryszczki genitalnej pojawiają się na skórze i/lub błonach śluzowych narządów płciowych, w cewce moczowej, okolicy okołoodbytniczej. Najwłaściwszym materiałem jest płyn zaaspirowany po przekłuciu pęcherzyka, ale także wymaz z podstawy zmiany na skórze, wymaz z błon śluzowych narządów płciowych (sromu, przedsionka pochwy, szczytu pochwy, kanału szyjki macicy, tarczy szyjki macicy), z cewki moczowej lub okolicy okołoodbytniczej. Przed pobraniem materiału diagnostycznego nie zaleca się dezynfekcji skóry środkami alkoholowymi i jodoformami [8, 14, 24]. Płyn pęcherzykowy należy aspirować za pomocą igły i strzykawki. Wymazy z podstawy zmian pobrać jałową wymazówką. Pobranie wymazu z cewki

moczowej powinno być poprzedzone wykonaniem czynności higienicznych za pomocą jałowego gazika (usuńnięcie nadmiaru wydzieliny), aby nie skontaminować nadmiernie próbki. Do pobrania materiału od mężczyzny należy stosować wymazówki z aluminiowym, plastikowym lub drewnianym aplikatorem, wsuwając wacik do cewki moczowej na głębokość około 0,5–2 cm. U kobiet należy stosować wyłącznie wymazówki z aplikatorem aluminiowym. Pobranie wymazu z szyjki macicy wymaga usunięcia nadmiaru wydzieliny. Stosując wziernik, należy pobrać próbkę z głębokości około 2 cm [8, 14, 18].

Dostępne są wymazówki zakończone wacikiem wykonanym z różnych materiałów. Nie zaleca się używania wymazówek z alginianem wapnia, niektórzy badacze polecają końcówki bawełniane [8]. Jednak częściej preferowane są dakronowe. W kilku pracach oceniono negatywnie wymazówki z bawełną i alginianem wapnia, które mogą oddziaływać toksycznie na wirusy, podobnie jak wykonana z drewna nasadka aplikatora [14, 25]. Podkreśla się również zalety aplikatorów z flocowanego nylonu [8, 26].

Wirusy opryszczki są wrażliwe na wysychanie oraz zmiany pH, konieczne jest zatem wprowadzenie pobranego materiału diagnostycznego do podłoża transportowego, na przykład do suplementowanego (2–10% płodową surowicą cielęcą (*FBS, fetal bovine serum*), 1% L-glutaminą i antybiotykami) podłoża Eagle lub Dulbecco [14, 27]. Dostępne są także komercyjne zestawy zawierające na przykład fosforan tryptozy, kwaśny fosforan dwusodowy, kwaśny fosforan jednosodowy z gentalamycyną i amfoterycyną. Na wynik izolacji wirusa z materiału od chorego wpływają istotnie warunki przechowywania próbki, jednak i w tej kwestii brak jest jednoznacznego stanowiska. Pożądane jest wprowadzenie wirusa do hodowli komórkowej w dniu pobrania materiału. Temperatura 22 °C oddziałująca do 12 godzin nie wpływa inhibycyjnie na wirusy. Eksperci utrzymują, że materiału przeznaczonego do analizy metodą hodowli nie należy przechowywać dłużej niż cztery godziny w temperaturze pokojowej, a optymalne jest zapewnienie 4 °C przez 24 do maksymalnie 48 godzin. Dłuższy czas przechowywania może wpłynąć na obniżenie czułości badania. Dopuszczalne jest mrożenie materiału od pacjenta w temperaturze -20 °C, jednak należy pamiętać o niekorzystnym wpływie zamrażania, a następnie rozmrażania na miano zakaźne wirusa w materiale klinicznym [8, 14].

Warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników badania jest umieszczenie próbki w permissywnej hodowli komórkowej. Do namnażania wirusów wykorzystywane są linie wywodzące się z różnych komórek (najczęściej nabłonkowych lub fibroblastycznych), ze zmian nowotworowych (HeLa, Hep-2, RD) lub prawidłowych (MRC-5, WI-38, BHK-21, LL-MK2, A549, Vero). Stosuje się komórki ludzkie lub pochodzące od zwierząt (np. *Mesocricetus auratus*, *Cercopithecus aethiops*, *Sus scrofa*,

Macaca mulatta) [14, 22, 23, 28]. Wirusy opryszczki wykazują tropizm do wielu typów komórek. Wykorzystują różne receptory powierzchniowe, na przykład siarczan heparanu (HSPGs, *heparan sulfate proteoglycans*), mediator wejścia wirusa opryszczki (HveM, *herpesvirus entry mediator*), HveB (*herpesvirus entry activity*, nektyna-2), HveC (*herpesvirus entry mediator C*, nektyna-1). Wirusy *herpes simplex* (HSV) zakażają komórki poprzez bezpośrednią fuzję osłonki wirusa z błoną komórkową na drodze endocytozy zależnej lub niezależnej od pH lub przedostają się bezpośrednio z zakażonej komórki do komórki sąsiedniej [20, 29, 30]. Skutkiem namnażania wirusów w hodowli komórek jest wystąpienie charakterystycznych dla wirusa i rodzaju zakażonych komórek zmian cytopatycznych (CPE, *cytopathic effect*). Czas pojawienia się CPE jest zależny od liczby wirionów w próbce. Pierwsze nieprawidłowości można zaobserwować w odwróconym mikroskopie świetlnym lub mikroskopie kontrastowo-fazowym już po kilkunastu godzinach od wprowadzenia zakażonego materiału klinicznego. Materiały skąpe w zakaźne wiriony muszą być obserwowane odpowiednio dłużej lub kilkakrotnie pasażowane. Charakterystyczne dla wirusów opryszczki zmiany w morfologii zakażonych komórek to: obecność ognisk balonowato powiększonych, specyficznie załamujących światło komórek z pyknotycznym jądrem, obecność wtretów wewnątrzjądrowych oraz obszarów zlizowanych komórek. Obserwuje się również wielojądrowe (od kilku do kilkudziesięciu lub kilkuset), pozbawione osłon komórkowych zespólnie (syncytia) [8, 22, 24, 28, 31]. Wykazano, że zespólnie mogą powstawać w następstwie wielokrotnego pasażowania izolatu. Tworzone są tylko w niektórych liniach na przykład Vero. Efekt cytopatyczny w postaci syncytiów charakterystyczny jest dla fenotypu *syn* (przypuszcza się, że są to szczepy atenuowane) i jest skutkiem mutacji punktowej w wysoce konserwatywnym, hydrofilowym, α -helikalnym regionie domeny cytoplazmatycznej glikoproteiny B [27].

Dodatni wynik izolacji wirusa ma istotną wartość dowodową. Metoda ta cechuje się około 15–33-procentową wyższą czułością w porównaniu z testami wykrywającymi antygeny wirusowe w bezpośrednim materiale klinicznym. Nie pozwala jednak na odróżnienie HSV-1 od HSV-2, co więcej wszystkie alfaherpeswirusy mogą powodować podobne zmiany w zakażonych komórkach, dlatego konieczne jest wykonanie dodatkowych testów identyfikacyjnych namnożonych wirusów, na przykład metodą immunofluorescencji, immunoenzymatyczną lub molekularną [8, 12, 24, 32].

Metoda hodowli jest polecana do diagnozowania opryszczki we wczesnym stadium zakażenia. Możliwość wykrycia wirusa zmniejsza się wraz z czasem trwania choroby.

Zgodnie z opinią specjalistów najwyższą wartość diagnostyczną ma badanie materiału pobranego ze świeżych zmian, to jest aspiratu z pęcherzyka lub z podstawy nadżerki powstałej po pęknięciu cienkościennego pęcherzyka. W takich próbkach należy spodziewać się największej liczby zakaźnych wirionów. Pobranie płynu pęcherzykowego pozwala wykryć 94% przypadków opryszczki. W wymazie z nadżerki w przebiegu opryszczki narządów płciowych u 70% osób badanych stwierdza się obecność wirusa. Jeśli zmiany ulegają regresji i pokrywają się strupem, prawdopodobieństwo izolacji wynosi zaledwie 27% [8, 12, 14, 18, 24]. Hodowla komórkowa umożliwia namnożenie wirusów nawet wtedy, kiedy liczba wirionów w próbce klinicznej jest niewielka, na przykład u osób z supresją układu immunologicznego, u których powszechnie są zakażenia przewlekłe, dodatkowo w części przypadków, wywołane szczepami opornymi lub o obniżonej wrażliwości na leki przeciwwirusowe [12].

Wirusy izolowane są z chorobowo zmienionych miejsc, ale również od bezobjawowych nosicieli. Wykazano, że średnia liczba kopii DNA HSV w próbkach pobranych z błon śluzowych od osób bez objawów zakażenia i zakażonych objawowo może być porównywalna ($10^{4.4}$ vs. $10^{4.9}$) [25]. Podobnie w analizie wymazów pobranych z błon śluzowych narządów płciowych, wykazano, że liczba kopii DNA HSV-2 wynosi średnio $10^{4.1}$ i $10^{4.8}$ w materiałach pobranych odpowiednio od osób bez cech zakażenia i z klinicznymi objawami infekcji genitalnej [33]. W badaniach prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM, wirus opryszczki zwykłej wyizolowano z hodowli oraz potwierdzono obecność wirusowego materiału genetycznego (PCR, *polymerase chain reaction*) u blisko 45% kobiet z niespecyficznymi objawami, które wskazywały na opryszczkę narządów płciowych oraz u 55% kobiet bez cech klinicznych zakażenia. Stosując metodę immunofluorescencji bezpośredniej do badania tych samych próbek klinicznych, wykazano obecność antygenów wirusów u odpowiednio 43% kobiet z objawami przypominającymi opryszczkę i u 35% kobiet zakażonych bezobjawowo [12]. Dwustopniowa diagnostyka polegająca na izolacji wirusa i jego identyfikacji metodą genetyczną (PCR) wydaje się być dobrym rozwiązaniem diagnostycznym. Wprawdzie podwyższone koszty jednostkowego badania oraz wydłużony czas oczekiwania na wynik nie zachęcają do wykorzystania takiego schematu w rutynowej diagnostyce, jednak może być on wykorzystany w laboratoriach o podwyższonym stopniu referencyjności.

Metoda hodowli umożliwia wyizolowanie powielonych wirusów, które mogą być także wykorzystane do oznaczania wrażliwości na leki przeciwwirusowe. Nie sprawdza się jednak u osób leczonych preparatami przeciwwirusowymi, z uwagi na inhibicyjny wpływ leków przeciwherpeswirusowych na namnażanie wirusów [17].

Istotną wadą izolacji wirusów jest czas badania. Zajmuje 7–10 dni, a w skrajnych przypadkach kilka tygodni [14]. Pewną alternatywą jest wykonanie po 24 lub 48 godzinach inkubacji (nawet jeśli brak widocznego CPE) wirowania hodowli (40 min, $700 \times g$), a następnie oznaczenie antygenów lub wirusowego DNA. Takie postępowanie skraca czas badania, jednak może wpłynąć na obniżenie jego czułości. Dostępny jest również test ELVIS (*enzyme-linked virus-inducible system*), w którym wykorzystywana jest genetycznie zmodyfikowana permissywna linia komórkowa transfekowana genem reporterowym *E. coli lacZ* pod kontrolą promotora HSV. Gen *lacZ*, wchodzący w skład operonu laktozowego *E. coli*, koduje β -galaktozydazę, tetrameryczny enzym hydrolizujący laktozę (β -galaktozyd) do galaktozy i glukozy. Replikacja wirusów opryszczki zwykłej indukuje wytwarzanie i magazynowanie β -galaktozydazy. Tkanki zawierające β -galaktozydazę, po dodaniu do nich odpowiednich substratów, wybarwiają się na niebiesko [8, 17]. Wynik ujemny izolacji wirusa w hodowli komórkowej ma umiarkowaną wartość dowodową, nie przesądza o braku wirusa w pobranym materiale klinicznym [4, 17].

Mimo że izolacja wirusów uznawana jest od lat za tak zwany złoty standard w diagnostyce zakażeń miejscowych wywołanych wirusami opryszczki zwykłej, coraz częściej wykorzystuje się metody molekularne. W rozpoznawaniu opryszczki stosuje się klasyczny PCR oraz test zmodyfikowany, czyli *real-time* PCR. W metodach opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych czynności przedlaboratoryjne mają mniejszy wpływ na wynik badania, ponieważ wykrywane jest również DNA wirusów niezdolnych do replikowania się. W takich przypadkach nie ma wskazań do wprowadzenia leczenia przeciwwirusowego. Czas wykonania badania jest znacznie krótszy (w zależności od metody kilka-, kilkanaście godzin). Badanie może być wykonane z różnych materiałów pobranych ze skóry i błon śluzowych. Istnieje również możliwość wykrywania mutacji związanych z lekoopornością w izolatach pobranych od chorych [17, 32, 34].

International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) rekomenduje technikę *real-time* PCR do potwierdzania opryszczki genitalnej. Badanie może być wykonane w czasie 2–4 godzin. Technika ta zwiększa wskaźnik detekcji wirusa o 11–71% w porównaniu do hodowli komórkowej. Analiza dokonywana jest w układzie zamkniętym, co minimalizuje ryzyko kontaminacji, a warunki transportu nie wpływają tak silnie na wynik, jak w przypadku badania metodą hodowli komórkowej [10]. *Real-time* PCR, dzięki możliwości oznaczenia liczby kopii wirusa, może być wykorzystywane do monitorowania przebiegu zakażenia, prognozowania i jest użyteczny do podejmowania decyzji terapeutycznych.

Eksperti z CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) zalecają laboratoryjne rozpoznanie zakażenia

u wszystkich osób zgłaszających się na konsultację lekarską z powodu opryszczki genitalnej. Rekomendują zastosowanie PCR [8, 10]. Jako metoda alternatywna wymieniana jest hodowla, a następnie ustalenie gatunku wirusa poprzez detekcję specyficznych antygenów lub DNA [8, 10, 16, 17, 32]. Obecnie do badań genetycznych wykorzystuje się zwalidowane testy komercyjne, na przykład IsoAmp HSV Assay, BioHelix Corporation; MultiCode-RTx Herpes Simplex Virus 1 & 2 Kit, EraGen Biosciences, Inc.; BD ProbeTec Herpes Simplex Viruses (HSV 1 & 2) QX Amplified DNA Assays, BD Diagnostic Systems. Część laboratoriów stosuje samodzielnie opracowane testy, które charakteryzują się zmienną czułością i swoistością [8–10, 14, 32, 35]. Nie zaleca się natomiast poszukiwania antygenów wirusów w materiale klinicznym oraz wykonywania popularnych w latach 70. XX wieku badań mikroskopowych z rozmazów ze zmian (np. testu Tzancka, metody Papanicolaou) w diagnozowaniu opryszczki genitalnej [34].

Wnioski

Ponieważ typowe objawy kliniczne opryszczki genitalnej występują tylko u części zakażonych, w rozpoznaniu istotną rolę odgrywają laboratoryjne badania wirusologiczne. Izolacja wirusów w hodowli komórkowej od lat uznawana jest za złoty standard w rozpoznawaniu miejscowego zakażenia wirusami opryszczki zwykłej. Charakteryzuje

się wysoką swoistością, jednak jej czułość zależy od jakości próbki pobranej od pacjenta oraz postępowania przedlaboratoryjnego. Metoda ta umożliwia namnożenie wirusów, które w przypadku niepowodzenia leczenia przeciwherpeswirusowego mogą być wykorzystane do fenotypowego lub genotypowego badania lekooporności. Wprawdzie algorytm diagnostyczny opryszczki genitalnej nie został zmieniony od kilku dekad, to obecnie coraz częściej izolację wirusów zastępują metody wykrywające DNA wirusa w próbce od pacjenta, które są obecnie standardem diagnostycznym tylko w rozpoznaniu opryszczkowego zakażenia układu nerwowego.

W Polsce problem opryszczki genitalnej nie jest traktowany z należytą atencją. Brak jest wiarygodnych danych epidemiologicznych dotyczących seroprevalencji i liczby zachorowań. Mimo że laboratoria w kraju deklarują możliwość wykonywania badań laboratoryjnych diagnozujących opryszczkę genitalną, większość z nich ocenia wyłącznie obecność przeciwciał przeciw HSV-1 i HSV-2 [7]. Jurkowska i wsp., oceniając możliwości diagnostyczne zakażeń opryszczki genitalnej, wykazali, że metodę hodowli stosuje jedno z 30 krajowych laboratoriów, które w badaniu ankietowym zgłosiły możliwość diagnostyki zakażeń wirusami opryszczki zwykłej [7]. Istotna jest zatem rewizja schematu diagnostycznego opryszczki genitalnej w Polsce, biorąc pod uwagę dostępność metod, charakterystykę pacjentów, dobór materiału klinicznego oraz epidemiologię zakażeń w Polsce.

Abstract

The availability of effective antiviral drugs increases the importance of performing diagnosis of genital herpes. Local symptoms do not always allow to accurate diagnosis of infection. Virus can be isolated from samples taken from the lesions located on the genital area using a cell culture. This method is considered for years as the reference method, to which are compared the other direct virological tests. A positive result of the virus isolation *in vitro* has significant probative value, negative result does not exclude the infection. Currently, molecular methods eg. classical PCR and real-time PCR are increasingly being used in laboratories worldwide. Important advantages of these methods are much less impact of pre-analytic procedures and shorter waiting times for the results. Both of these methods allow to the detection of drug-resistant strains of herpes viruses.

Key words: laboratory diagnosis, virus isolation, genital herpes, PCR

Gin. Perinat. Prakt. 2018; 3, 1: 16–22

Piśmiennictwo

- Majewska A, Romejko-Wolniewicz E, Zaręba-Szczudlik J, et al. Wirus opryszczki pospolitej typu 1: epidemiologia i udział wirusa w zakażeniach narządów płciowych. *Nowa Med.* 2011; 1: 16–19.
- Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, et al. Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part I: HSV, HPV. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13(13): 1837–1845, doi: [10.2174/13895575113136660088](https://doi.org/10.2174/13895575113136660088), indexed in Pubmed: [24032509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24032509/).
- Ramaswamy M, Smith M, Geretti AM. Detection and typing of herpes simplex DNA in genital swabs by real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2005; 126(1-2): 203–206, doi: [10.1016/j.jviromet.2005.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.012), indexed in Pubmed: [15847938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15847938/).
- Strand A. Diagnosis of genital herpes: the role and place of HSV testing in clinical practice. *Eur Clinics Obstet Gynaecol.* 2007; 2(4): 181–189, doi: [10.1007/s11296-006-0057-2](https://doi.org/10.1007/s11296-006-0057-2).
- Biało-Wójcicka E, Majewski S, Łoza K. Opryszczka genitalna – profilaktyka zakażeń wirusem opryszczki. *Przegl Dermatol.* 2015; 102: 1–7, doi: [10.5114/dr.2015.49200](https://doi.org/10.5114/dr.2015.49200).
- Jurkowska U, Dmoch-Gajzlerska E, Wyrozębska A. Zakażenie wirusem opryszczki pospolitej u kobiet ciężarnych z uwzględnieniem możliwości diagnostycznych w Polsce. *Gin Pol Med Project.* 2015; 1: 30–42.
- Liu J, Yi Y, Chen W, et al. Development and evaluation of the quantitative real-time PCR assay in detection and typing of herpes simplex virus in swab specimens from patients with genital herpes. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(10): 18758–18764, indexed in Pubmed: [26770492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26770492/).
- LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol J.* 2014; 11: 83, doi: [10.1186/1743-422X-11-83](https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-83), indexed in Pubmed: [24885431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885431/).
- Majewska A, Przybylski M, Machura P, et al. Porównanie trzech testów multiplex real-time PCR do wykrywania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2. *Med Dośw Mikrobiol.* 2016; 68: 119–125.
- Młynarczyk-Bonikowska B, Skulska E, Malejczyk M, et al. Metody oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce wybranych chorób przenoszonych drogą płciową. *Post Mikrobiol.* 2015; 54: 407–414.
- Groves MJo. Genital Herpes: A Review. *Am Fam Physician.* 2016; 93(11): 928–934, indexed in Pubmed: [27281837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27281837/).
- Majewska A, Romejko-Wolniewicz E, Zaręba-Szczudlik J, et al. [Laboratory diagnosis of genital herpes–direct immunofluorescence method]. *Ginekol Pol.* 2013; 84(7): 615–619, doi: [10.17772/gp/1613](https://doi.org/10.17772/gp/1613), indexed in Pubmed: [24032273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24032273/).
- Stoopler ET, Pinto A, DeRossi SS, et al. Herpes simplex and varicella-zoster infections: clinical and laboratory diagnosis. *Gen Dent.* 2003; 51(3): 281–6; quiz 287, indexed in Pubmed: [15055715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15055715/).
- Domeika M, Bashmakova M, Savicheva A, et al. Eastern European Network for Sexual and Reproductive Health (EE SRH Network). Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries. *Euro Surveill.* 2010; 15(44): pii: 19703, doi: [10.2807/ese.15.44.19703-en](https://doi.org/10.2807/ese.15.44.19703-en), indexed in Pubmed: [21087585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087585/).
- Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet.* 2007; 370(9605): 2127–2137, doi: [10.1016/s0140-6736\(07\)61908-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61908-4), indexed in Pubmed: [18156035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18156035/).
- Tomkins A, White C, Higgins SP. Primary herpes simplex virus infection mimicking cervical cancer. *BMJ Case Rep.* 2015; 2015, doi: [10.1136/bcr-2015-210194](https://doi.org/10.1136/bcr-2015-210194), indexed in Pubmed: [26038382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26038382/).
- Gnann J, Whitley RJ. Clinical Practice. Genital Herpes. *N Engl J Med.* 2016; 375(7): 666–674, doi: [10.1056/NEJMcp1603178](https://doi.org/10.1056/NEJMcp1603178), indexed in Pubmed: [27532832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27532832/).
- Biškup UG, Uršič T, Petrovec M. Laboratory diagnosis and epidemiology of herpes simplex 1 and 2 genital infections. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2015; 24(2): 31–35, doi: [10.15570/actaapa.2015.9](https://doi.org/10.15570/actaapa.2015.9), indexed in Pubmed: [26086165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26086165/).
- Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 57(5): 737–63; quiz 764, doi: [10.1016/j.jaad.2007.06.027](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.06.027), indexed in Pubmed: [17939933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17939933/).
- Mwansasu A, Mwakagile D, Haarr L, et al. Detection of HSV-2 in genital ulcers from STD patients in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin Virol.* 2002; 24(3): 183–192, doi: [10.1016/s1386-6532\(01\)00248-7](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(01)00248-7), indexed in Pubmed: [11856619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11856619/).
- Smith JS, Rosinska M, Trzcinska A, et al. Type specific seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 in four geographical regions of Poland. *Sex Transm Infect.* 2006; 82(2): 159–163, doi: [10.1136/sti.2005.015446](https://doi.org/10.1136/sti.2005.015446), indexed in Pubmed: [16581747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16581747/).
- Costello MT, Sabatini L, Yungbluth P. Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection. *Clin Microbiol Newsl.* 2006; 28(24): 185–192, doi: [10.1016/j.clinmic-news.2006.11.005](https://doi.org/10.1016/j.clinmic-news.2006.11.005).
- Dzieciatkowski T, Majewska A, Krawczyk E, et al. Postacie kliniczne i diagnostyka herpeswirusowych zakażeń skóry. *Przegl Dermatol.* 2007; 94: 195–200.
- Anderson NW, Buchan BW, Ledebner NA. Light microscopy, culture, molecular, and serologic methods for detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(1): 2–8, doi: [10.1128/JCM.01966-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01966-13), indexed in Pubmed: [24131689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24131689/).
- 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, doi: [10.1086/379043](https://doi.org/10.1086/379043), indexed in Pubmed: [14593592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14593592/).
- Vare P, Hedman K, Lappalainen M. Comparison of nylon swabs versus cotton swabs for the diagnosis of herpes simplex virus. *ESCV 2008, Clinical Virology Annual Meeting, Finland 12–15.03.2008.*
- Fan Z, Grantham ML, Smith MS, et al. Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J Virol.* 2002; 76(18): 9271–9283, doi: [10.1128/jvi.76.18.9271-9283.2002](https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9271-9283.2002), indexed in Pubmed: [12186911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12186911/).
- Athmanathan S, Reddy SB, Nutheti R, et al. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line with Vero cells in the isolation of Herpes simplex virus-1 for the laboratory diagnosis of Herpes simplex keratitis. *BMC Ophthalmol.* 2002; 2(1), doi: [10.1186/1471-2415-2-3](https://doi.org/10.1186/1471-2415-2-3), indexed in Pubmed: [11983023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11983023/).
- Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009; 276(24):

- 7228–7236, doi: [10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x), indexed in Pubmed: [19878306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19878306/).
30. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Virology*. 2011; 8: 481, doi: [10.1186/1743-422X-8-481](https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-481), indexed in Pubmed: [22029482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22029482/).
 31. Muggerridge MI, Grantham ML, Johnson FB. Identification of syncytial mutations in a clinical isolate of herpes simplex virus 2. *Virology*. 2004; 328(2): 244–253, doi: [10.1016/j.virol.2004.07.027](https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.027), indexed in Pubmed: [15464844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15464844/).
 32. Ustaçelebi S. Diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Virol*. 2001; 21(3): 255–259, doi: [10.1016/s1386-6532\(00\)00168-2](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00168-2), indexed in Pubmed: [11397662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11397662/).
 33. Tronstein E, Johnston C, Huang ML, et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA*. 2011; 305(14): 1441–1449, doi: [10.1001/jama.2011.420](https://doi.org/10.1001/jama.2011.420), indexed in Pubmed: [21486977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21486977/).
 34. Johnston C, Corey L. Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29(1): 149–161, doi: [10.1128/CMR.00043-15](https://doi.org/10.1128/CMR.00043-15), indexed in Pubmed: [26561565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26561565/).
 35. Machura P, Górka E, Młynarczyk-Bonikowska B, et al. Wykorzystanie nowej techniki multiplex real-time PCR do wykrywania i różnicowania DNA wirusów opryszczki typu 1 i 2. *Med Dośw Mikrobiol*. 2015; 67(2): 125–132, indexed in Pubmed: [26591664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26591664/).