

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»

Навчально-науковий інститут природокористування
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього середовища

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА
кваліфікаційної роботи ступеня бакалавра

Студента Сидорчука Павла Сергійовича

академічної групи 091-20-1 III

спеціальності 091 «Біологія»

за освітньо-професійною програмою «Біологія»

на тему: «Порівняння методів дослідження герпесвірусів та частота їх виявлення серед населення»

Керівники	Прізвище, ініціали	Оцінка	Підпис
кваліфікаційної роботи	Воронкова Ю.С.		
розділів:			
Теоретичного	Воронкова Ю.С.		
Практичного	Воронкова Ю.С.		
Охорона праці	Столбченко О.В.		
Рецензент	Вінніков А.І.		
Нормоконтролер	Грунтова В.Ю.		

Дніпро
2024

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»

ЗАТВЕРДЖЕНО:
 завідувачка кафедри ЕТЗНС
 _____ «__» _____ 2024 року

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу ступеня бакалавра
студенту Сидорчуку П.С. академічної групи 091-20-1 III
спеціальності – 091 «Біологія»
за освітньо-професійною програмою – «Біологія»
на тему Порівняння методів дослідження герпесвірусів та частота їх
виявлення серед населення

Затверджену наказом ректора НТУ «Дніпровська політехніка» від 21.05.2024 № 453-с

	Розділ	Зміст	Термін виконання
1	Теоретичний	Обґрунтувати актуальність теми дослідження. Навести існуючі методи дослідження герпесвірусів, надати їм характеристику, вказати переваги й недоліки. Навести характеристику вірусів родини <i>Herpesviridae</i> ; патогенетичні і клінічні прояви герпетичної інфекції; діагностичні критерії основних клінічних форм герпесвірусних інфекцій	10.01.2024 – 08.04.2024
2	Практичний	Описати матеріали і методи досліджень. Навести основні методи та методики, що використані в ході роботи; навести розподіл на експериментальні групи та критерії їх оцінки; навести результати досліджень. Провести аналіз отриманих даних та вказати на доцільність використання методів в ході досліджень. Дослідити частоту виявлення вірусів герпесу різних типів. Зіставити отримані результати досліджень із вже існуючими даними в літературі. Провести аналіз частоти виявлення герпесвірусів серед населення з урахуванням різних вікових категорій.	09.04.2024 – 20.05.2024
3	Техніка безпеки	Визначити шкідливі та небезпечні фактори у біохімічному та мікробіологічному відділах лабораторії при проведенні досліджень та надати їм характеристику. Навести загальні вимоги до роботи в лабораторії з біологічним матеріалом (кров, плазма, сироватка); скласти перелік необхідних засобів індивідуального захисту.	21.05.2024 – 01.06.2024

Завдання видано _____

(підпис керівника)

Воронкова Ю.С.

(прізвище, ініціали)

Дата видачі _____

06.12.2023

Дата подання до екзаменаційної комісії _____

Прийнято до виконання _____

(підпис студента)

Сидорчук П.С.

(прізвище, ініціали)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 103 с., 9 рис., 4 табл., 5 додатків, 60 літературних джерел.

Мета роботи: дослідити окремі лабораторні показники крові для диференціальної діагностики герпесвірусних інфекцій та обґрунтування пропозицій та рекомендацій, що базуються на отриманих результатах досліджень.

У вступі визначено актуальність дослідження лабораторних показників для диференціальної діагностики герпесвірусних інфекцій, сформульовані задачі кваліфікаційної роботи.

Теоретичний розділ містить опис існуючих методів дослідження герпесвірусів, їх характеристик. Виконаний огляд патогенетичних і клінічних проявів герпетичної інфекції; опис діагностичних критеріїв основних клінічних форм герпесвірусних інфекцій.

У практичному розділі наведений опис процесу виконання експериментів здобувача, опис матеріалів, основних методів дослідження, наведений розподіл на експериментальні групи та критерії їх оцінки. Досліджено частоту виявлення вірусів герпесу різних типів, проведений аналіз частоти виявлення герпесвірусів серед населення з урахуванням різних вікових категорій.

В останньому розділі проаналізовані шкідливі та небезпечні фактори у біохімічному та мікробіологічному відділах лабораторії при проведенні досліджень. Наведені загальні вимоги до роботи в лабораторії з біологічним матеріалом; перелік необхідних засобів індивідуального захисту.

У висновках наведені основні результати виконаної роботи.

ГЕРПЕСВІРУСИ, СИРОВАТКА КРОВІ, ІМУНОФЕРМЕТНИЙ АНАЛІЗ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ВПГ-1, ВПГ-2, ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ, ПОШИРЕННЯ

ЗМІСТ

ВСТУП	6
1 ГЕРПЕСВІРУСИ ТА МЕТОДИКА ЇХ БІОДОСЛІДЖЕНЬ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВИЯВЛЕННЯ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ	9
1.1 Характеристика вірусів родини Herpesviridae (епідеміологія, біологічні властивості тощо)	9
1.1.1 Групи вірусів всередині родини Herpesviridae (класифікація, особливості)	10
1.2 Патогенетичні і клінічні прояви герпетичної інфекції (по кожному з вірусів)	12
1.3 Діагностика герпесвірусних уражень	20
1.4. Метод імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA): основні характеристики, класифікація, описання	25
1.4.1 ІФА як інструмент для контролю специфічної імунопрофілактики проти інфекційних хвороб людини	29
1.5 Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): описання, основні принципи	30
1.6 Висновки до теоретичного розділу	31
2 ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ ТА ПОШИРЕННЯ ГЕРПЕСВІРУСІВ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ	33
2.1 Об'єкт досліджень	33
2.2 Методи дослідження	33
2.2.1 Методика проведення імуноферментного аналізу (ІФА)	33
2.2.2 Методика проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	38
2.3 Поширення герпесвірусних інфекцій 1-4 типів серед вагітних	40
2.4 Поширення вірусів герпесу 1-8 типів серед населення м. Дніпро	43
2.5 Частота виявлення герпесвірусів серед населення м. Дніпро у 2023 р.	48

2.6 Висновки до практичного розділу	52
3. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ В ЛАБОРАТОРІЇ	53
3.1 Охорона праці в клініко-діагностичній лабораторії	53
3.2 Організація роботи в клініко-діагностичній лабораторії	54
3.3 Організація пожежної безпеки	59
ВИСНОВКИ	61
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	62
ДОДАТКИ	69
Додаток А. Публікації	69
Додаток Б. Відгук керівника кваліфікаційної роботи	96
Додаток В. Зовнішня рецензія	97
Додаток Г. Довідка про присутність запозичень (плагіату)	98
Додаток І. Відгуки керівника розділу з охорони праці та нормоконтролера	103

ВСТУП

Актуальність теми. Герпесвірусні інфекції є серйозними захворюваннями, які становлять значний глобальний виклик для охорони здоров'я.

Їх висока поширеність і можливість переходу в хронічний стан роблять диференціацію між різними типами вірусів герпесу критично важливою для вибору тактики лікування та подальшого моніторингу стану здоров'я пацієнтів. Симптоми можуть бути схожими, але причинами можуть бути різні віруси або інші фактори.

Диференційована діагностика за допомогою лабораторних методів дослідження дозволяє точно визначити тип герпесвірусної інфекції.

Серед численних чинників, що чинять безпосередній вплив на імунну систему, на особливу увагу заслуговують віруси сімейства герпесу. Досягнення лабораторної і, в першу чергу, молекулярної діагностики підвищили вірогідність виявляємості цієї інфекції і свідчать про неухильний ріст кількості інфікованих серед дорослого і дитячого населення.

Отже, дослідження лабораторних показників для диференціальної діагностики герпесвірусів є не лише актуальним питанням, а й необхідним для подальшого вдосконалення лікування та управління цими захворюваннями.

Метою роботи є дослідження окремих лабораторних показників для диференціальної діагностики герпесвірусних інфекцій та обґрунтування пропозицій та рекомендацій, що базуються на отриманих результатах досліджень.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені такі **задачі**:

1. Виконати опис існуючих методів дослідження герпесвірусів, надати їм характеристику, визначити існуючі переваги й недоліки. Навести характеристику вірусів родини *Herpesviridae*; патогенетичні і клінічні прояви герпетичної інфекції; діагностичні критерії основних клінічних форм герпесвірусних інфекцій.
2. Провести дослідження щодо частоти виявлення вірусів герпесу різних

типів за наслідками ІФА та ПЛР. Описати методику проведення експериментальних досліджень. Вказати на доцільність використання ІФА та ПЛР в ході досліджень.

3. Провести аналіз частоти виявлення герпесвірусів серед населення з урахуванням різних вікових категорій. Зіставити отримані результати досліджень із вже існуючими даними в літературі. Обґрунтувати пропозиції та рекомендації, що базуються на отриманих даних. Визначити напрямки для майбутніх досліджень у даній області.

4. Надати характеристику шкідливих та небезпечних факторів у біохімічному та мікробіологічному відділах клініко-діагностичної лабораторії, надати їм характеристику. Навести загальні вимоги до роботи в лабораторії з біологічним матеріалом (кров, плазма, сироватка); скласти перелік необхідних засобів індивідуального захисту.

Практичне значення кваліфікаційної роботи полягає в цінному внеску в галузь біології та клінічної лабораторної діагностики досліджень герпесвірусів. Результати досліджень розкривають специфіку змін у цих показниках при герпесвірусних інфекціях і надають обґрунтовані пропозиції та рекомендації для їх практичного використання у діагностиці цих захворювань. Отримані результати, систематизовані і порівняні із вже наявними даними у літературі, становлять важливий внесок у розуміння значущості своєчасної діагностики герпесвірусів та надають уяву щодо використання найбільш сучасних та точних методів їх аналізу. Робота визначає перспективні напрямки подальших досліджень у галузі біології, імунології, мікробіології та біохімії, сприяючи розвитку нових методів діагностики та підходів до лікування герпесвірусних інфекцій.

Апробація результатів бакалаврської роботи:

Зроблено доповідь на студентській науково-технічній конференції «Тиждень студентської науки- 2024» (Дніпро, 11 квітня 2024 р.).

Публікації:

- Сидорчук П.С., Воронкова Ю.С. (2023). Імуноферментний аналіз (ІФА):

сутність, роль, значення, переваги, недоліки. *I Міжнародна наукова конференція «Теорія модернізації в контексті сучасної світової науки»*, м. Полтава, 23 червня, 2023 р. Міжнародний центр наукових досліджень. Вінниця: Європейська наукова платформа, С. 145-148.

- Sydoruk P.S., Voronkova Y.S. (2023). A short theoretical overview of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Міжнародний науковий журнал «Грааль науки» № 29 (липень, 2023): за матеріалами VI Міжнародної науково-практичної конференції «An integrated approach to science modernization: methods, models and multidisciplinary»*, 7 липня 2023 року ГО «Європейська наукова платформа» (Вінниця, Україна) та ТОВ «International Centre Corporative Management» (Відень, Австрія), С. 129-132.

- Сидорчук П.С., Воронкова Ю.С. (2024). Переваги використання ІФА та ПЛР в лабораторних умовах визначення вірусів герпесу (ВПГ-1 та ВПГ-2). *Студентська науково-технічна конференція «Тиждень студентської науки-2024»*, Дніпро, 09–12 квітня 2024 року. Національний технічний університет «Дніпровська політехніка». Дніпро: НТУ «ДП», 2024. С. 304-306.

РОЗДІЛ 1 ГЕРПЕСВІРУСИ ТА МЕТОДИКА ЇХ БІОДОСЛІДЖЕНЬ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВИЯВЛЕННЯ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ

1.1 Характеристика вірусів родини *Herpesviridae* (епідеміологія, біологічні властивості тощо)

В останні роки в інфекційній патології все більшого значення набувають герпесвіруси, що пов'язане з їх значною епідеміологічною роллю та соціальною значимістю в сучасному світі.

Неухильне зростання числа захворювань у дорослих і дітей, спричинених герпесвірусами, обумовлює необхідність всебічного їх вивчення та розробки ефективних методів лікування та профілактики різноманітних форм цієї інфекції, адже серед вірусних інфекцій саме герпесвірусні інфекції займають одне з провідних місць в силу повсюдного розповсюдження вірусів, різноманіття клінічних проявів, як правило, хронічного перебігу, а також різних шляхів передачі вірусів [5, 14, 23].

Герпесвірусні інфекції входять до числа найбільш поширених і погано контрольованих інфекцій людини. Герпесвіруси можуть циркулювати в організмі з фізіологічно функціонуючою імунною системою безсимптомно, а у людей з імуносупресією викликають тяжкі захворювання зі смертельним результатом. За даними ВООЗ, смертність від герпесвірусних інфекцій серед вірусних захворювань знаходиться на другому місці (15,8%) після вірусних гепатитів (35,8%) [5].

Герпесвіруси - це велика родина вірусів, що належать до родини Герпесвірусів (*Herpesviridae*). Ця родина включає в себе кілька типів вірусів, які можуть викликати різноманітні захворювання у людей та тварин. Деякі з найвідоміших герпесвірусів, які впливають на людину, включають віруси простого герпесу типу 1 і 2 (*HSV-1* і *HSV-2*), вірус вітряної віспи (*VZV*), вірус Епштейна-Барра (*EBV*), цитомегаловірус (*CMV*) та інші.

Хоча більшість герпесвірусів можуть викликати захворювання, які

зазвичай виявляються у вигляді висипів, виразок або різних типів інфекцій, багато людей переносять ці віруси безсимптомно або мають лише легкі симптоми. Наприклад, HSV-1 і HSV-2 можуть призводити до виразок на шкірі та слизових оболонках, а також до генітального герпесу, що передається статевим шляхом. VZV викликає вітряну віспу та залишається в організмі, спричиняючи рецидиви у вигляді опоясування. EBV може бути причиною захворювань, таких як мононуклеоз (вірусне захворювання, що виявляється підвищенням лімфоцитів у крові) та певних типів раку [5].

Важливо враховувати, що після первинної інфекції герпесвіруси залишаються в організмі на все життя, періодично активуючись та викликаючи рецидиви захворювань. Частота виявлення герпесвірусів серед населення може варіюватися залежно від багатьох факторів, таких як вік, стать, рівень імунної системи, ступінь контакту з інфікованими особами та інші епідеміологічні чинники. Деякі дослідження показують, що великий відсоток населення інфікований герпесвірусами, і цей вірус є широко поширеним серед людей у всьому світі [5].

Особливо важливою є частота виявлення герпесвірусів серед певних груп населення, таких як вагітні жінки, новонароджені, імунокомпрометовані особи та інші вразливі категорії. Вивчення цієї частоти допомагає у розробці профілактичних заходів, лікування та управління публічним здоров'ям для зменшення поширення герпесвірусів та їхніх наслідків для здоров'я [5].

1.1.1 Групи вірусів всередині родини *Herpesviridae* (класифікація, особливості)

Як ми вже раніше вказали, герпесвіруси об'єднані в велике сімейство Herpesviridae та включають в себе більш ніж 80 представників, 8 з яких для людини найбільш патогенні (*human herpes virus-HHV*). Герпесвіруси – філогенетично древнє сімейство великих ДНК-вірусів та поділяються на 3 підродини залежно від типу клітин, в яких перебігає інфекційний процес,

характеру репродукції вірусу, структури генома, молекулярно-біологічних та імунологічних особливостей: α , β і γ (табл. 1.1) [2, 5, 16].

Таблиця 1.1 – Класифікація герпесвірусів

Підвид вірусів	Представники підвиду	Особливості підвиду
α -герпесвіруси	Вірус простого герпесу 1 типу (<i>HSV-1</i>) Вірус простого герпесу 2 типу (<i>HSV-2</i>) Вірус <i>Varicella zoster</i> (<i>VZV</i>)	Характеризуються швидкою реплікацією вірусів і цитопатичною дією на культури інфікованих клітин. Репродукція перебігає в різних типах клітин. Віруси можуть зберігатися в латентній формі, переважно в нервових гангліях.
β -герпесвіруси	Цитомегаловірус (<i>CMV</i>) Вірус герпесу людини 6 типу (<i>HHV-6</i>) Вірус герпесу людини 7 типу (<i>HHV-7</i>)	Вражають різні види клітин, які при цьому збільшуються в розмірах (цитомегалія). Можуть викликати імуносупресивні стани. Інфекція може приймати генералізовану або латентну форму, досить часто виникає персистентная інфекція.
γ -герпесвіруси	Вірус Епштейна-Барр (<i>EBV</i>) Вірус герпесу людини 8 типу (<i>HHV-8</i>)	Характеризуються тропністю до лімфоїдних клітин (Т-, В-лімфоцитам), в яких вони тривало персистують і які можуть трансформувати, викликаючи лімфоми, саркоми. <i>HHV-8</i> також асоційований з саркомою Капоші.

Патогенез захворювання, викликаного герпесвірусами, відбувається за такою схемою: спонтанна випадкова адсорбція вихідного «материнського»

вірусу на поверхні клітини-мішені, «роздягання віріона» - розщеплення оболонки і капсида, інфільтрація вірусної ДНК в ядро клітини-мішені, формування і дозрівання «дочірніх» віріонів шляхом відгалуження на ядерній мембрані [5].

Після інфікування клітини, наприклад вірусом простого герпесу 1 або 2 типів, синтез нових вірусних білків починається через 2 години, а число їх досягає максимуму приблизно через 8 годин. У процесі дозрівання «дочірніх» віріонів їх оболонки, капсида і ДНК формуються з наявних усередині інфікованої клітини амінокислот, білків, ліпопротеїдів і нуклеозидів. Ці молекули надходять в інфіковану клітину з міжклеточних просторів у міру виснаження внутрішньоклітинних резервів. У цьому відношенні віруси залежать від інтенсивності внутрішньоклітинного обміну, який, у свою чергу, визначається природою клітини-мішені [5].

Найбільш високий темп обміну речовин характерний для короткоживучих клітин епітеліоподібного типу, тому герпесвіруси особливо добре колонізують клітини епітелію і слизових оболонок, крові і лімфатичних тканин.

Повністю сформовані і готові до подальшої активної репродукції «дочірні» інфекційні віріони з'являються всередині інфікованої клітини через 10 годин, а їх число стає максимальним приблизно через 15 годин [5].

1.2 Патогенетичні і клінічні прояви герпетичної інфекції (по кожному з вірусів)

Кількість віріонів певною мірою впливає на темп поширення інфекції і площа ураження. Перша генерація «дочірніх» герпесвірусів починає надходити в навколишнє середовище (міжклеточні простори, кров, лімфу та інші біологічні середовища) приблизно через 18 годин. Це можна спостерігати в клінічній практиці при неконтрольованих процесах (наприклад, при вітряної віспи, оперізуючому герпесі, генералізації цитомегаловірусної інфекції) - елементи герпетичної висипки виникають на шкірі або слизових оболонках хвилями [5].

У вільному стані герпесвіруси знаходяться протягом дуже нетривалого періоду (від 1 до 4 годин) - саме така тривалість характерна для періоду гострої інтоксикації при герпесвірусних інфекціях. Термін життя кожної нової генерації та адсорбованих герпесвірусів в середньому становить 3 доби.

Унікальними біологічними властивостями всіх герпес-вірусів людини є тканинний тропізм, здатність до персистенції і латенції в організмі інфікованої людини. *Персистенція* являє собою здатність герпесвірусів безперервно або циклічно розмножуватися в інфікованих клітинах тропних тканин, що створює постійну загрозу розвитку інфекційного процесу. *Латенція* герпесвірусів - це довічне збереження вірусів у морфологічно і імунохімічно видозміненій формі в нервових клітинах регіонарних (по відношенню до місця вхідних воріт герпесвірусу) гангліїв чутливих нервів [5].

Штами герпесвірусів мають неоднакову здатність до персистенції і латенції, а також чутливість до протигерпетичних препаратів у зв'язку з особливостями їх ферментних систем. У кожного герпесвірусу свій темп персистенції і латенції.

Серед досліджуваних найбільш активні в цьому відношенні віруси простого герпесу, найменш - вірус Епштейна-Барр [2, 16].

Інфікування людини герпесвірусами супроводжується клінічними симптомами гострого інфекційного захворювання в середньому не більше ніж у 50% людей, в основному у дітей: раптова еритема (вірус герпесу людини 6 типу), афтозний стоматит (віруси простого герпесу 1 або 2 типів), вітряна віспа, інфекційний мононуклеоз (вірус Епштейна-Барр), мононуклеозоподібний синдром (цитомегаловірус). У інших пацієнтів інфекція перебігає безсимптомно, що особливо характерно для підлітків і дорослих людей. Крім біологічних властивостей штаму герпесвірусу, вплив на перебіг гострих і рецидивуючих герпесвірусних захворювань надають індивідуальні (вікові, статеві, філо- і онтогенетичні) особливості імунної відповіді інфікованої людини на численні антигени вірусу [2, 4, 5, 14, 16, 23].

Часто, особливо при зниженні імунореактивності організму, герпесвіруси

виступають як віруси-опортуністи, приводячи до більш тяжкого, з атиповими клінічними проявами та перебігом основного захворювання.

Віруси простого герпесу 1 і 2 типів, а також цитомегаловірус входять до числа збудників TORCH-інфекцій. Вони відіграють важливу роль в порушенні репродуктивної функції людини, розвитку серйозних захворювань матері, плода, новонародженого і дітей молодшого віку.

Захворювання, що викликаються вірусами простого герпесу, цитомегаловірусом та вірусом Епштейна-Барр, розглядаються як СНІД-індикаторні у зв'язку з їх частим виявленням при даній патології.

Результати досліджень останніх років свідчать про роль деяких герпесвірусів (*HHV-8*, *CMV*, *EBV* та ін.) в розвитку і ряду злоякісних новоутворень: назофарингеальної карциноми, лімфоми Беркітта, В-клітинної лімфоми, раку грудей, аденокарциноми кишечника і простати, карциноми цервікального каналу шийки матки, саркоми Капоші, нейробластоми та ін. [2, 16].

Найбільшу загрозу для здоров'я представляють герпесвірусні нейроінфекції (летальність досягає 20%, а частота інвалідизації - 50%), офтальмогерпес (майже у половини хворих призводить до розвитку катаракти або глаукоми) і генітальний герпес [5, 19, 23].

Практично всі відомі герпесвірусні інфекції можуть рецидивувати, однак поріг і причини трансформації гострої форми в рецидивуючу для кожного типу герпесвірусу свої. В цілому герпесвірусні інфекції приймають рецидивуючий перебіг не більш ніж у 8-20% хворих.

Рецидивуючі герпесвірусні захворювання у деяких людей можуть сприйматися як «хронічні», коли вони розвиваються протягом багатьох років, не тільки руйнуючи фізичне здоров'я і функції життєво важливих систем, а й психологічно вкрай несприятливо впливаючи на хворого. Тому для практичних цілей герпесвірусні інфекції класифікують з урахуванням одночасно локалізації процесу, рецидивування та етіології (табл. 1.2) [5, 13].

Таблиця 1.2 – Гострі та рецидивуючі герпесвірусні захворювання людини

Тип герпесвірусу	Первинні захворювання	Рецидивуючі захворювання
Вірус простого герпесу 1 типа	Гінгівостоматит, кератокон'юнктивіт	Оральний герпес, кератокон'юнктивіт, енцефаліт
Вірус простого герпесу 2 типа	Генітальна герпетична інфекція, неонатальна герпетична інфекція, дисемінована герпетична інфекція	Генітальна герпетична інфекція
Вірус варіцелла зостер	Вітряна віспа, дисемінована вітряна віспа	Оперізуєчий герпес, дисемінована вітряна віспа при імунодефіциті
Вірус Епштейна-Барр	Інфекційний моноклеоз, В-клітинна проліферація	Інфекційний моноклеоз, лімфома Беркітта, назофарингеальна карцинома
Цитомегаловірус	Вроджені аномалії, цитомегалія при імунодефіциті	Цитомегалія у хворих після трансплантації органів, ретиніт, коліт або нейроінфекція при ВІЛ-інфекції
Вірус герпесу людини 6 типа	Еритема новонароджених	Системні хвороби після трансплантації
Вірус герпесу людини 7 типа	Еритема новонароджених	Не відомі
Вірус герпесу людини 8 типа	Саркома Капоши	Не відомі

Причини рецидивуючого перебігу герпесвірусних інфекцій різноманітні. Одна з них полягає в тому, що трансформація гострого герпесвірусного процесу в хронічний відбувається при явному «потуранні» імунної системи. Якщо набутий імунодефіцит внаслідок хіміотерапії або ВІЛ-інфекції легко пояснити, то всі спроби з'ясувати, чим зумовлений основний дефект імунної відповіді у імунологічно повноцінних людей з рецидивуючим перебігом герпесвірусної інфекції, виявляються марними. Інша причина полягає в кількісних та якісних особливостях персистенції і латенції конкретного штаму герпесвірусу в організмі хворого [5].

Більш детально зупинимося на Вірусі простого герпесу (*ВПГ*). Найчастіше, коли людини заражається вірусом простого герпесу жодних симптомів немає. Зараження людини відбувається непомітно. Саме тому цей вірус такий поширений. Однак інфекція часом може виявлятися у вигляді ураження слизових оболонок та шкіри. Умовно це можна розділити на інфекції вище за талію, коли в процес залучається рот і мова і на процеси, які протікають нижче за талію, коли уражаються гені талії.

Як було зазначено вище, існує два види простого герпесу: вірус простого герпесу *ВПГ-1* та вірус простого герпесу *ВПГ-2*. Обидва належать до великого сімейства Герпесверіда, що містить дволанцюжкову ДНК. Вважається, що *ВПГ-1* викликає інфекції верхньої частини тіла, а *ВПГ-2* – нижню. Але це не означає, що не може бути навпаки. Тому, в цілому, обидва віруси можуть спричинити будь-який тип інфекції [5].

Незважаючи на те, що людина найбільш заразна за наявності уражень, які містять вірус у великій кількості, вірус може поширюватися і без симптомів через слину або виділення зі статевих органів.

Вірус проникає у невеликі тріщини на шкірі чи слизовій оболонці, зв'язується з рецепторами епітеліальних клітин та проникає всередину. Опинившись усередині, вірус запускає літичний цикл, у якому з допомогою клітинних ферментів його ДНК транскрибується і транслюється, завдяки чому з'являються нові вірусні білки, які упаковуються в нові віруси герпесу і потім

виходять, і заражають сусідні клітки.

VПГ-1 і *VПГ-2* інфікують довколишні сенсорні нейрони. Потім по їх аксон вірус доходить до тіла нейрона, запускається латентний цикл і, тим самим, людина стає безсимптомним носієм [5].

Тіла сенсорних нейронів особи становлять ганглії трійчастого нерву, а геніталій – крижовий ганглій. Тож саме у цих місцях вірус герпесу житиме до кінця днів носія.

Сенсорні нейрони не руйнуються, але вони стають своєрідним «будинком» для вірусу герпесу. Іноді вірус розмножується і відправляє нові копії назад по аксону до епітеліальних клітин. Так як ганглії трійчастого і крижового нервів є на правій і лівій половині тіла, везикули і виразки при розвитку герпесу з'являються на іпсилатеральному боці або на боці ураженого ядра.

Протягом усього життя людини загострення можуть з'являтися знову і знову. Причому класичним тригерами зазвичай стають: стрес, пошкодження шкіри, вірусні захворювання. Рецидиви зазвичай протікають негаразд серйозно, як первинне інфікування, інколи ж симптоми можуть бути відсутні. За один-два дні до появи пухирів, може з'явитися характерне поколювання або печіння. Цей період називається продромальним. При оральному або генітальному герпесі первинна інфекція часто проходить безсимптомно [5].

Якщо при *оральному герпесі* клініка, все ж таки, розвивається, то вона виникає, в основному, у дітей у вигляді поразок неба, ясен, язика, губ, обличчя, а також лихоманки та збільшення лімфатичних вузлів [5, 13-14].

Самі поразки являють собою скупчення невеликих хворобливих бульбашок, заповнених рідиною, які протікають і гояться через кілька тижнів. У дітей старшого віку та дорослих часто розвивається фарингіт. Найчастіше, при рецидиві ніякі симптоми не розвиваються. Але, якщо це все ж таки відбувається, то, часто, у вигляді невеликого скупчення бульбашок на межі облямівки губ з одного боку обличчя. Бульбашки зазвичай невеликі і гояться протягом тижня.

При *генітальному герпесі* під час первинного інфікування можуть розвинути виразки та пустули на великих і малих статевих губах, в області

лобкової кістки, на слизовій оболонці піхви та шийки матки у жінок та на стовбурі статевого члена – у чоловіків. Як і у випадку орального герпесу, при реактивації - симптомів може і не бути, а можуть з'явитися кілька бульбашок, які заживуть протягом тижня [5, 13].

Крім орального та генітального герпесу, *ВПГ* може спричинити захворювання та інших областей. Наприклад, при поразці кінчика пальця чи нігтьового ложа розвивається герпетичний панарицій. Це відбувається при контакті пальця з активними елементами навколо рота чи геніталій. Завдяки такому розташуванню вогнища інфікувати інші частини тіла ставати ще простіше. Цей процес називається ауто-інокуляція. Іноді може бути поєднане ураження тулуба, кінцівок чи голови. Це переважно характерно для борців, оскільки вони мають досить частий контакт «шкіра до шкіри», інакше це не Люди з опіками чи atopічним дерматитом мають великий ризик розвитку інфекції у цій галузі. Таке явище називається герпетичною екземою.

ВПГ може також вражати очі, викликаючи кератокон'юнктивіт, тобто запалення як рогівки, так і кон'юнктиви. На додаток до симптомів кон'юнктивіту, а саме до: болю, почервоніння, сльозотечі та світлочутливості, можуть додатися класичні симптоми ураження рогівки, а саме: нечіткий зір, розгалужений дендрит нейрона, що гілкуються дендритні виразки рогівки. Таке пошкодження виникає безпосередньо на рогівці і є класичною ознакою герпетичної інфекції [5, 13].

Іноді вірус герпесу може поширитися до центральної нервової системи (*ЦНС*), викликаючи менінгіт або енцефаліт, в основному у скроневих часток у людей різного віку. Це може статися і в первинному інфікуванні. Але більше характерно для періоду реактивації, коли вірус «збігає» в кровотік і доходить до мозку. При залученні мозку буде характерна картина в лікворі, а саме: збільшення кількості еритроцитів, лейкоцитів, а також білка. Крім цього, будуть ознаки поразки на КТ, МРТ та ЕЕГ, що також допоможе у постановці діагнозу [5].

ВПГ може передаватися від матері до дитини. Причому найчастіше плід

заражається не внутрішньоутробно, будучи в матці, а під час пологів, коли дитина проходить через інфікований вагінальний секрет.

Неонатальний герпес буває трьох різних форм, причому кожна розвивається лише у третини випадків. Перша форма - це інфекція шкіри очей і слизових оболонок, коли поразка виникає через 1 - 2 тижні після народження, в основному в місцях пошкоджень шкіри під час різних інвазивних процедур. Друга форма - це інфекція центральної нервової системи, при якій розвивається летаргія, дратівливість і навіть судоми протягом 2-3 тижнів після народження. Цю форму діагностують на основі характерної картини ліквору, КТ та МРТ. Вона буває як у дітей, так і у дорослих при герпетичному енцефаліті [3, 5, 13].

Якщо першу та другу форму не лікувати, то вони перейдуть у третю, а саме в дисеміновану інфекцію, при якій вірус герпесу викликає сепсис та ураження різних органів, включаючи серце та головний мозок.

У імунокомпрометованих осіб вірус простого герпесу викликає досить характерні симптоми:

- інфекції часто рецидивують;
- симптоми більш тяжкі;
- спектр симптомів ширший, ніж зазвичай, наприклад, може бути пошкодження стравоходу або легень [5, 13].

ВПГ діагностується за характерним ушкодженням шкіри та слизових оболонок.

Лікування герпесвірусної інфекції до теперішнього часу залишається досить складним завданням. Хронічний перебіг процесу призводить до імунної перебудови організму: розвитку вторинної імунної недостатності, пригнічення реакції клітинного імунітету, зниження неспецифічного захисту організму.

Незважаючи на різноманітність лікарських препаратів, що використовуються для лікування герпесвірусної інфекції, лікарських засобів, що забезпечують повне одужання від вірусів герпесу, не існує. Герпесвірусна інфекція відноситься до важко контрольованих захворювань. Це пов'язано, в першу чергу, з різноманітністю клінічних проявів, розвитком резистентності

вірусу до лікарських засобів, наявністю у герпесвірусів молекулярної мімікрії [5].

Тому для успішного лікування герпесвірусної інфекції необхідно правильно підібрати противірусний препарат, його дозу і тривалість лікування, використовувати комбінацію різних ліків. У схеми терапії для підвищення ефективності лікування необхідно також включати імунобіологічні препарати, що сприяють корекції імунного статусу, а також патогенетичні засоби, що полегшують стан пацієнта

1.3 Діагностика герпесвірусних уражень

Діагностика герпесвірусної інфекції досить неоднозначна. Всі методи індикації та ідентифікації вірусів засновані на наступних принципах:

- 1) виявлення вірусу (електронна мікроскопія);
- 2) виявлення та ідентифікація вірусів за допомогою взаємодіючих з ними клітин (накопичення вірусів в чутливих до них клітинах);
- 3) виявлення та ідентифікація вірусів за допомогою антитіл (серологічні методи, наприклад, імуноферментний аналіз, ІФА);
- 4) виявлення та ідентифікація нуклеїнових кислот (ПЛР) [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

Надамо стисло характеристику основним методам дослідження герпесвірусів.

1. Електронна мікроскопія (для дослідження морфології та структури вірусів): швидка діагностика дозволяє виявити віруси або їх компоненти безпосередньо в пробах, взятих від хворого, і дати швидку відповідь (через кілька годин). Збудник виявляють за допомогою електронної мікроскопії клінічного матеріалу при негативному контрастуванні [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

2. Методи генетичного аналізу: зосереджені на аналізі геному герпесвірусів за допомогою секвенування ДНК або РНК для вивчення генетичної

структури, характеристик вірусу та його відносин з іншими штамми [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

3. Культурна діагностика: використовується для вирощування герпесвірусів у клітинних культивуаціях. Зазвичай для цього використовуються спеціальні клітинні лінії, такі як Vero- або HEp-2-клітини. Після інкубації проби в культурі відбувається спостереження за змінами у клітинах, що можуть свідчити про наявність вірусу [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

4. Імунологічні тести (серологічні методи): базуються на виявленні антитіл або антигенів, які можуть свідчити про наявність герпесвірусів у зразках [18, 20-21, 24-25].

5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): дозволяє збільшувати кількість ДНК вірусу в декілька мільйонів разів, що дозволяє виявити навіть невеликі кількості вірусної ДНК у зразках [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

Кожен з цих методів має свої сильні та слабкі сторони, і вибір конкретного методу повинен базуватися на конкретних вимогах дослідження, доступних ресурсах та цілях дослідження. У більшості випадків, комбінація декількох методів може забезпечити більш повну картину та достовірні результати.

Надамо короткий огляд переваг та недоліків кожного з найпоширеніших методів дослідження герпесвірусів:

1. Культурна діагностика:

- *Переваги:*
 - Дозволяє вивчити патогенність вірусу та вплив на клітини господаря.
 - Допомогає вирощувати вірус для подальшої характеристики.
- *Недоліки:*
 - Вимагає часу на вирощування вірусу.
 - Може бути менш чутливим порівняно з ПЛР.
 - Потребує спеціальних клітинних ліній та культурних умов.

2. Імунологічні тести (серологічні методи):

- *Переваги:*
 - Дозволяють виявити антитіла або антигени вірусу.

- Швидкість та простота використання.
- Можуть виявляти присутність вірусу навіть після його виведення з організму.

- *Недоліки:*

- Може бути менш чутливим порівняно з ПЛР.
- Можливість отримання фальшиво-позитивних або фальшиво-негативних результатів.

Серологічні методи такі, як реакція нейтралізації (РН), реакція гемаглютинації (РГА), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція непрямой (або пасивної) гемаглютинації (РНГА або РПГА відповідно), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція імунної дифузії (РІД), реакція зв'язування комплексу (РЗК), імунохроматографічний метод, реакція імунофлюоресценції (РІФ), реакція латекс-аглютинації (РЛА), імуно-блотинг та імуноферментний аналіз (ІФА) поступаються за інформативністю та чутливістю іншим способам лабораторної діагностики і не дозволяють з достатнім ступенем достовірності встановити етіологію тієї чи іншої форми захворювання. Наростання титрів антитіл відбувається в пізні терміни (через кілька тижнів) після зараження або реактивації вірусу, і в той же час воно може і не спостерігатися у імунодефіцитних осіб.

Для встановлення 4-кратного наростання титру антитіл до герпесвірусної інфекції (показник первинної інфекції) необхідно дослідження парних сироваток. Серологічні реакції мають високу специфічність, але відносно низьку чутливість, а крім того, складні в постановці. Точність і достовірність результатів, отриманих при дослідженні методом ІФА залежить від таких критеріїв:

1) *Якості набору* (коректно вибраний тип набору та метод дослідження, який лежить в його основі: непрямий, конкурентний, а/г-захват; набір має бути високоспецифічним та чутливим).

2) *Якості відбору зразків та правильному їх тестуванні, в залежності від типу набору.*

3) *Якості постановки* (дотримання умов зберігання, температурного режиму усіх складових набору; висока кваліфікація дослідника/лаборанта; каліброване та валідоване обладнання; зберігання сталої вологості при тестуванні, поетапне слідування протоколу;

4) *Вірної інтерпретації результатів* [18, 20-21, 24-25].

3. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР):

- *Переваги:*

- Висока чутливість та специфічність (чутливість методу дає можливість визначити одну молекулу ДНК у зразках, що містять 10 клітин).

- Можливість виявлення навіть невеликих кількостей вірусної ДНК або РНК.

- Швидкість та відносно проста реалізація.

- *Недоліки:*

- Потребує спеціального обладнання та реагентів.

- Ймовірність фальшиво-позитивних результатів через можливе забруднення проби ДНК чи РНК.

- Не здатний відрізнити живий вірус від вірусної ДНК або РНК [1, 4, 6-7, 9-12, 22].

Вибір методу дослідження частоти виявлення герпесвірусів серед населення залежить від кількох факторів, включаючи доступність обладнання та ресурсів, специфіку дослідження та його мету. Ось деякі важливі питання, які можна врахувати при виборі методу:

1. Чутливість та специфічність: Важливо обрати метод, який забезпечить достовірні та точні результати. Метод повинен бути достатньо чутливим для виявлення герпесвірусів, а також специфічним, щоб уникнути фальшивих позитивних або негативних результатів.

2. Масштаби дослідження: Якщо потрібно вивчити велику популяцію, метод повинен бути швидким та ефективним для використання в масовому масштабі.

3. Вартість та доступність обладнання та реагентів: Потрібно врахувати вартість та доступність необхідного обладнання та реагентів для обраного методу. Необхідно вибрати метод, який відповідає бюджету та доступності ресурсів.

4. Практичність використання: Метод повинен бути практичним для використання в конкретних умовах дослідження, включаючи лабораторні умови та кваліфікацію персоналу.

З огляду на ці критерії, метод ПЛР може бути вибраний як переважний метод дослідження частоти виявлення герпесвірусів серед населення. ПЛР є чутливим, специфічним та швидким методом, який може ефективно виявляти навіть невеликі кількості вірусної ДНК або РНК у клінічних зразках. Крім того, він може бути легко масштабованим для використання в масовому масштабі та зазвичай вимагає меншу кількість часу порівняно з іншими методами.

Однак інші методи, такі як імунологічні тести (ІФА або ELISA), також можуть бути корисними в деяких випадках, залежно від конкретних потреб дослідження.

ПЛР є дуже чутливим методом, який дозволяє виявляти навіть невеликі кількості вірусної ДНК чи РНК. Він також може бути автоматизований та швидко проводиться. Однак для ПЦР потрібно спеціальне обладнання та підготовка зразків, що може збільшувати вартість та час аналізу.

ІФА, з іншого боку, вимагає менше обладнання та може бути більш доступним для лабораторій з обмеженими ресурсами. Він також може бути швидшим у деяких випадках та дозволяє визначити локалізацію вірусу в клітинах. Проте, він може мати меншу чутливість порівняно з ПЛР та може вимагати більшого об'єму зразка.

Дослідження, як правило, порівнюють ці методи в різних умовах, таких як час та стадія захворювання, щоб визначити оптимальний метод для конкретної ситуації.

1.4 Метод імуноферментного аналізу (ІФА, *ELISA*): основні характеристики, класифікація, описання

Імуноферментний аналіз (скорочено ІФА, англ. *Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) - лабораторний імунологічний метод якісного або кількісного визначення різних низькомолекулярних сполук, макромолекул, вірусів та ін.

В основі ІФА лежить *специфічна реакція антиген-антитіло*. Теоретичні основи ІФА спираються на сучасну імунохімію і хімічну ензимологію, знання фізико-хімічних закономірностей реакції антиген-антитіло, а також на основні принципи аналітичної хімії [1, 4, 6-7, 12].

ІФА є одним з напрямків, що найбільш активно розвивається і широко використовується в клінічній біохімії та лабораторній діагностиці. Через розмаїття об'єктів дослідження існує велика кількість варіантів цього методу для визначення: від низькомолекулярних сполук, пептидних та стероїдних гормонів, фармакологічних препаратів, пестицидів до вірусів і бактерій, і навіть до інших антитіл; різноманіття принципів зв'язування і різноманіття умов проведення ІФА.

За одним лише варіантів реєстрації ферментативної активності можливе застосування фотометричних, флюорометричних, біо- і хемілюмінесцентних методів.

До теперішнього часу розроблено велику кількість різних варіантів проведення ІФА, що мають як принципові, так і другорядні відмінності.

Увесь процес імуноферментного аналізу умовно можна розділити на декілька основних етапів:

- 1) формування специфічного комплексу «антиген-антитіло»;
- 2) введення в утворений комплекс мітки;
- 3) візуалізація зв'язаної мітки.

Стосовно способу виконання всі варіанти ІФА можна розділити на дві групи: 1) системи, що не потребують розділення компонентів реакційної суміші

(гомогенні методи); 2) системи, для яких розділення необхідне (гетерогенні методи).

Гетерогенний ІФА в мікропланшетному варіанті

Для здійснення аналізу ефективності комплексоутворення необхідно провести повну очистку комплексів від вільних компонентів. Це завдання виявилось легко вирішити, якщо один з компонентів пари антиген-антитіло міцно зв'язати (іммобілізувати) на твердому носії.

Використання іммобілізації антитіл на твердому носії дало початок методам твердофазного (гетерогенного) ІФА. Гетерогенний (твердофазний) ІФА в мікропланшетному варіанті набув найбільшого поширення в тест-системах для клінічних лабораторних досліджень. Для твердої фази використовують поверхню лунок полістиролового мікропланшета, на який адсорбовані відомі антигени або антитіла (імуносорбент). В ході специфічної реакції імуносорбенту з обумовленими в досліджуваному зразку антитілами або антигенами утворюються імунні комплекси, які виявляються фіксованими на твердій фазі. Субстанції, які не брали участі в реакції, а також надлишки реагентів, видаляються при багаторазовому промиванні. Така схема дозволяє спростити процес ефективного поділу компонентів реакції [1, 4, 6, 7, 12, 18, 20, 21, 24, 25,].

Існує *прямий й непрямий гетерогенний ІФА*.

Прямий гетерогенний ІФА

У прямому імуноферментному аналізі внесений матеріал (антиген) закріплюється під час інкубації на поверхні чистих лунок. Кількість досліджуваного матеріалу детектується за допомогою антитіл до виявлення антигену, з'єднаних із специфічною міткою, що забезпечує ферментативну реакцію.

Структура аналізу.

Біологічний матеріал (кров, букальний зішкріб зі слизової, мазки) поміщається в чисті лунки на деякий час (зазвичай 15-30 хвилин), достатньо, щоб антигени могли приклеїтися до поверхні лунок. Далі в лунки додають антитіла до виявленого антигену. Це означає, що виявляючи антигени, наприклад,

сифілісу, додаються антитіла проти антигенів сифілісу. Дану суміш досліджуваного матеріалу і антитіл залишають на деякий час (від 30 хвилин до 4-5 годин), щоб антитіла змогли знайти і зв'язатися з відповідним антигеном. Чим більше в біологічній пробі антигенів, тим більше антитіл зв'яжеться з ними. Оскільки антитіла додаються в надлишку, то не всі вони зв'яжуться з антигенами, а якщо антигену взагалі немає в пробі, то, відповідно жодне антитіло не зв'яжеться з антигеном. Для того, щоб прибрати «зайві» антитіла, вміст з лунок виливають (або вимивають методом декантації). В результаті цього всі «зайві» антитіла прибираються, а залишаються ті, які зв'язалися з антигенами, оскільки антигени «приклеєні» до поверхні лунок.

Наступний етап - ферментативна реакція. У промиті лунки додають розчин з ферментом і залишають на 30-60 хвилин. Даний фермент має спорідненість до речовини (специфічної мітки), з яким зв'язані антитіла. Фермент каталізує реакцію, в результаті якої ця специфічна мітка (субстрат) перетворюється в забарвлену речовину (продукт).

Оскільки додана специфічна мітка зв'язана з антитілами, значить, концентрація пофарбованого продукту реакції дорівнює концентрації антитіл, а концентрація антитіл дорівнює концентрації антигенів [1, 4, 6-7, 12, 20, 21, 24].

Непрямий гетерогенний ІФА

У непрямому імуноферментному аналізі використовують антитіла до виявленого антигену, з'єднані зі специфічною міткою. Ця специфічна мітка і є субстратом ферментативної реакції.

За типом імунохімічної взаємодії на першій стадії аналізу серед гетерогенних методів розрізняють *неконкурентний* і *конкурентний варіанти аналізу*.

Якщо в системі присутні тільки аналізовані з'єднання і відповідні йому центри зв'язування (антиген і специфічні антитіла), то метод є *неконкурентним*.

Якщо ж на першій стадії в системі одночасно присутні аналізована речовина і її аналог (мічена ферментом аналізоване з'єднання або аналізоване з'єднання, іммобілізованих на твердій фазі), конкуруючі за обмежену кількість

центрів специфічного зв'язування, то метод є *конкурентним* [1, 4, 6-7, 12, 20, 21, 24].

Гомогенний ІФА

У 1972 р. учені розробили новий підхід з проведенням всього аналізу *без твердої фази*. Метод отримав назву *гомогенного ІФА* (англ. «ЕМІТ» - enzyme multiplied immunoassay technique) і був заснований на обліку відмінностей каталітичних властивостей ферментної мітки у вільному вигляді і в імунохімічному комплексі. На основі даного підходу були розроблені набори для визначення широкого кола токсичних, наркотичних і лікарських засобів. Істотною перевагою ЕМІТ-аналізу є можливість використання малих обсягів аналізованого зразка (5-50 мкл) і висока швидкість визначення (2-5 хв), обумовлена відсутністю стадії поділу вільного і міченого аналізованого з'єднання. До недоліків методу слід віднести меншу чутливість, ніж в гетерогенному ІФА (~ 1 мкг/мл), і можливість визначення тільки низькомолекулярних антигенів [1, 4, 6-7, 12, 20, 21, 24].

Безумовно, метод ІФА, як будь-які імунохімічні методи аналізу, може давати хибно позитивні і помилково негативні результати.

Наприклад, хибно позитивні результати при визначенні антитіл до різних інфекцій можуть виникати за рахунок ревматоїдного фактору, що представляє собою імуноглобулін М проти власних імуноглобулінів G людини; за рахунок антитіл, що утворюються при різних системних захворюваннях, порушеннях обміну або прийомі лікарських препаратів; у новонароджених такі хибно позитивні реакції можуть виникати за рахунок утворення в організмі дитини М-антитіл до імуноглобуліну G матері.

Помилково негативні результати при визначенні антитіл можуть бути обумовлені станами імунодефіциту, а також технічними помилками при постановці реакції [1, 4, 6-7, 12].

1.4.1 ІФА як інструмент для контролю специфічної імунопрофілактики проти інфекційних хвороб людини

В системі організації здоров'я людини було повсюдно прийнято використання імуноферментного аналізу для контролю багатьох захворювань, Серологія є корисним лабораторним інструментом для відстеження імунної відповіді після вакцинації і для постановки діагнозу [1, 4, 6-7, 12].

Важливим етапом у відстеженні імунної відповіді за допомогою ІФА є інтерпретація результатів. Для того щоб успішно інтерпретувати результати ІФА повинні бути дотримані наступні умови.

У лабораторії слід використовувати зовнішні референсні контролю, щоб мати додаткову гарантію продуктивності і точності результатів і забезпечити правильну інтерпретацію. Використання референсної сироватки дає змогу майже повністю виключити помилки при проведенні реакції [1, 4, 6-7, 12, 18, 25].

Перед проведенням аналізу необхідно мати уявлення про те, який результат має бути після застосування тієї чи іншої вакцини – базовий рівень титрів для успішного специфічного захисту птиці. Це дозволяє коректно інтерпретувати отримані результати, порівнюючи з базовим значенням рівня, і зробити висновок про успішність програми вакцинації. Деякі виробники комерційних тест-систем для ІФА та виробники вакцин мають базові лінії для кожного типу стада з різними можливими програмами вакцинації, але вони знаходяться в широкому діапазоні [1, 4, 6-7, 12, 18, 25].

Інтерпретація результатів ІФА зазвичай проводиться шляхом оцінки трьох основних компонентів відповіді після введення вакцини, якими є:

1. Інтенсивність імунної відповіді, на що вказує значення середнього титру.
2. Однорідність значень титрів, на що вказує коефіцієнт варіації (% CV).
3. Тривалість імунної відповіді, на що вказує середній титр в залежності від часу (дослідження парних сироваток крові) [1, 4, 6-7, 12, 18, 25].

Необхідно також пам'ятати, що коректний вибір тест-системи (а головне методу ІФА, що лежить в основі) та правильний відбір патологічного матеріалу

забезпечує ефективну і правильну оцінку імунного статусу поголів'я. Тест-система має відповідати таким критеріям [1, 4, 6-7, 12]:

- висока чутливість (аналітична також), специфічність та ексклюзивність;
- виключення можливості перехресних реакцій;
- стійкість компонентів набору до умов навколишнього середовища.

1.5 Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): описання, основні принципи

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є потужним інструментом для виявлення герпесвірусів та інших вірусів у клінічних зразках.

Завдання, які вирішуються з допомогою даного методу в дослідженні - виявлення генетичного матеріалу герпесвірусів.

Загальний опис методу ПЛР для виявлення герпесвірусів:

1. Екстракція нуклеїнових кислот: Спочатку зразок, який містить герпесвіруси (наприклад, кров, слина, сеча або біоптат), піддається обробці для екстракції нуклеїнових кислот (ДНК або РНК), що містяться у вірусах. Цей крок важливий для отримання матеріалу, який можна використовувати для наступного етапу ПЛР.

2. Підготовка реакційної суміші: Для проведення ПЛР підготовлюється спеціальна реакційна суміш, яка містить всі необхідні компоненти для ампліфікації генетичного матеріалу вірусів. Це включає фрагменти ДНК або РНК, специфічні приміри, термостабільну полімераза та реагенти для реакції.

3. Термоциклізація: Зразок поміщається у термоциклізатор, де реакційна суміш проходить кілька циклів нагрівання та охолодження. Кожен цикл включає три основні кроки: денатурацію, аннеалінг та екстензію. Під час денатурації дволанцюгова молекула розщеплюється на одноланцюгові фрагменти. Потім приміри, специфічні для герпесвірусів, зв'язуються з цими фрагментами. На етапі екстензії термостабільна полімераза допомагає створювати нові дволанцюгові молекули, які є точною копією початкових фрагментів.

4. Детекція результатів: Після кількох циклів термоциклізації проводиться аналіз отриманої реакційної суміші. Це може бути здійснено за допомогою гелевого електрофорезу, реального часу ПЛР або інших методів детекції. Результатом буде наявність або відсутність ампліфікованих фрагментів, що вказуватиме на наявність або відсутність герпесвірусів у зразку [1, 4, 6-7, 12].

Метод ПЛР дозволяє швидко та чутливо виявляти герпесвіруси у клінічних зразках, що робить його важливим інструментом для діагностики та досліджень цих вірусів.

1.6 Висновки до теоретичного розділу

1. Герпесвіруси - це велика родина вірусів, які належать до родини Герпесвірусів (*Herpesviridae*, яка включає в себе кілька різновидів.

2. Герпесвіруси можуть викликати різноманітні захворювання від безсимптомного перебігу до серйозних захворювань, залежно від типу вірусу та стану імунної системи хворого.

У більшості випадків *ВПГ-1* і *ВПГ-2* типу викликають асимптоматичну латентну інфекцію в трійчастому або крижовому ганглії і знаходяться там протягом усього життя людини. Вони можуть спричинити рецидивні оральні або генітальні ураження. Також можуть розвинути серйозніші захворювання, наприклад, герпетичний кератокон'юнктивіт, менінгіт, енцефаліт, і навіть неонатальний герпес, яким дитина найчастіше заражається під час пологів, проходячи через інфікований вагінальний секрет.

3. Відсутність ефективної вакцини та повне вилікування герпесвірусних інфекцій також ставить ці віруси в центр уваги медичних, біологічних досліджень та терапевтичних стратегій.

4. Вивчення частоти виявлення герпесвірусів серед населення є ключовим елементом для ефективного управління здоров'ям громадськості, вдосконалення клінічної практики та підвищення якості медичних досліджень.

5. Точні методи діагностики та виявлення можуть відрізнятися залежно від

лабораторії чи методики, що використовується.

Діагностика герпесвірусної інфекції досить неоднозначна. Всі методи індикації та ідентифікації вірусів засновані на наступних принципах:

- 1) виявлення вірусу *per se* (електронна мікроскопія);
- 2) виявлення та ідентифікація вірусів за допомогою взаємодіючих з ними клітин (накопичення вірусів в чутливих до них клітинах);
- 3) виявлення та ідентифікація вірусів за допомогою антитіл (ІФА або ELISA)
- 4) виявлення та ідентифікація нуклеїнових кислот (ПЛР).

Вибір методу дослідження частоти виявлення герпесвірусів серед населення залежить від кількох факторів, включаючи доступність обладнання та ресурсів, специфіку дослідження та його мету.

При виборі того чи іншого методу біодослідження треба враховувати:

1. Чутливість та специфічність.
2. Масштаби дослідження
3. Вартість та доступність обладнання та реагентів.
4. Практичність використання.

З огляду на ці критерії, метод ПЛР може бути вибраний як переважний метод дослідження частоти виявлення герпесвірусів серед населення, оскільки є чутливим, специфічним та швидким методом, який може ефективно виявляти навіть невеликі кількості вірусної ДНК або РНК у клінічних зразках

Однак такі методи, як імунологічні тести (ELISA або ІФА), також можуть бути корисними в деяких випадках, залежно від конкретних потреб дослідження, оскільки вимагають менше обладнання та можуть бути більш доступним для лабораторій з обмеженими ресурсами можуть бути швидшими у деяких випадках та дозволяють визначити локалізацію вірусу в клітинах. Проте, вони мають меншу чутливість порівняно з ПЛР та можуть вимагати більшого об'єму зразка.

РОЗДІЛ 2 ЧАСТОТА ВИЯВЛЕННЯ ТА ПОШИРЕННЯ ГЕРПЕСВІРУСІВ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ

2.1 Об'єкт досліджень

Дослідження проводили на базі клініко-діагностичної лабораторії «Віс-Медик» (м. Дніпро). За сприяння лабораторії проводили аналіз результатів отриманого матеріалу від осіб віком 18-55 років з підозрою на ураження вірусами герпесу різних типів: ВПГ 1 та 2 типів, ЦМВ, а також вірусу Епштейна-Бар.

За допомогою імуноферментного аналізу в сироватці крові визначали антитіла з метою типування ВПГ 1 та 2 типів, ЦМВ та вірусу Епштейна-Бар, за допомогою відповідних тест-систем. Данні тест-системи представляють собою набір реагентів для виявлення імуноглобулінів певного класу до вірусу простого герпесу людини.

Забір крові для імунологічного дослідження проводився до початку протівірусної імунокорегуючої терапії. За наявності сумнівної відповіді у імунологічних тестах використовували метод ПЛР.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Методика проведення імуноферментного аналізу (ІФА)

Дослідження проводили із використанням імуноферментних тест-систем для виявлення антитіл різних класів проти IgG та M вірусів простого герпесу 1 і 2 типів, вірусу цитомегалії та Епштейна-Бар: DIA-HSV 1/2-IgG до *Herpes simplex virus*, DIA-HSV 1/2-IgM для визначення антитіл класа IgM до *Herpes simplex virus*, DIA-CMV-IgG та DIA-CMV-IgM для визначення антитіл класів IgG та IgM до цитомегаловірусу людини (Діапроф-Мед, Київ, Україна), набір для виявлення вірусу Епштейна-Бар, ядерний антиген – EBNA-1 (Euroimmun, Любек, Німеччина).

Набори призначені для якісного та напівкількісного аналізу сироватки або

плазми крові людини на наявність антитіл різних класів до перелічених вірусів методом імуноферментного аналізу. Вони розраховані на проведення 96 аналізів (включаючи контролю).

Специфічні IgM-антитіла та IgG-антитіла до вказаних вірусів з'являються на 3-7-й та 10-14-й день відповідно після інфікування та зберігаються в організмі протягом усього життя, і через те серологічний метод дозволяє виявляти як активний вірус, так і пасивну інфекцію.

Аналіз ґрунтується на використанні основних компонентів набору – імуносорбенту та імуноферментного кон'югату. Імуносорбент – це полістироловий планшет, лунки якого сенсibiliзовані антигенами вірусів. Кон'югат – це моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу IgG та M людини, що кон'юговані з пероксидазою хрину.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток антитіла у випадку їх наявності зв'язуються з антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси «антиген – антитіло». Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до імуноглобулінів відповідних класів. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника – субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках, яка при довжині хвилі 450 нм була пропорційна концентрації специфічних антитіл до ВПГ у зразках сироваток або плазми крові.

Для оцінки зміни титру антитіл у динаміці результат аналізу виражають у одиницях DIA Units (DU).

Реактиви та матеріали:

- концентрат розчину для промивання;
- імуносорбент;
- розчин для розведення сироваток;
- розчин для розведення кон'югату;
- субстратний буфер;

- розчин ТМБ;
- концентрат кон'югату;
- негативний контроль;
- позитивний контроль;
- стоп-реагент;
- клейка плівка.

Додаткові матеріали та обладнання:

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %-вий;
- спирт етиловий, 70°-ний;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- мікропіпетки одноканальні (5–40, 20–200, 200–1000 мкл) та наконечники

до них;

- мікропіпетки 8-канальні (50–300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- ємності для попереднього розведення сироваток;
- термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшеті;
- контейнер для збирання твердих відходів та забруднених матеріалів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

Зразки сироваток або плазми крові до дослідження зберігали за температури 2-8°C не більше 72 год. Зразки сироваток (плазми), які містили агрегати та осад освітлювали за допомогою центрифугування; зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням для аналізу не придатні.

Проведення аналізу складалось з підготовки до нього та проведення власне аналітичних процедур.

Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок – стандартний мінімум) починалась з витримання компонентів набору при 18-25°C протягом 30 хв. Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно струшували. Відбирали 4 мл розчину і розводили у 180 мл дистильованої води, перемішували. Якщо концентрат розчину містив кристали, його прогрівали перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів. Розчин зберігали при 2-8°C не більше 10 діб.

Наступним етапом було розведення сироваток (зразків і контролів). Досліджувані зразки сироваток, позитивний і негативний контролі попередньо розводили у відношенні 1 : 51 розчином для розведення сироваток. Наприклад, до 500 мкл розчину додавали 10 мкл сироватки.

Приготування розчину кон'югату здійснювали у чистому флаконі, куди відбирали 1 мл розчину для розведення кон'югату та додавали 100 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішували, не допускаючи піноутворення. Цей розчин готували безпосередньо перед використанням.

Приготування ТМБ субстрату здійснювали у чистому флаконі, куди відбирали 0,5 мл хромогену ТМБ і додавали 0,5 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно струшували. Розчин готують безпосередньо перед використанням і захищають від попадання прямого світла та контакту з металами або йонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату безбарвний.

Проведення аналізу включає ряд етапів:

– перед проведенням аналізу звільняли від упаковки необхідну кількість стрипів, вставляли їх у планшетну рамку. Стрипи, які не використовувались в даній постановці, зберігали у щільно закритому пакеті за температури 2-8°C;

– промивали лунки планшета розчином для промивання (350 мкл розчину на лунку) один раз за допомогою промивача або 8-канальної мікропіпетки, після чого позбавляли зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу);

– у лунки стрипів вносили по 100 мкл попередньо розведених 1 : 51 досліджуваних сироваток, залишивши вільними 3 лунки першого ряду (лунки

для контролів);

– вносили розведені 1 : 51 контролі: у лунку А1 – 100 мкл позитивного контролю, в лунки В1, С1 – по 100 мкл негативного контролю;

– накривали стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубували за температури 37°C протягом 60 хв.;

– по закінченні інкубації видаляли вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної мікропіпетки та промивали лунки чотири рази розчином для промивання, після чого позбавляли зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу);

– у лунки стрипів вносили по 100 мкл розчину кон'югату;

– накривали стрипи новою клейкою плівкою або кришкою та інкубували за температури 37 °С протягом 30 хв.;

– по закінченні інкубації видаляли вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної мікропіпетки та промивали лунки шість разів розчином для промивання, після чого позбавляли зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу);

– вносили у лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ-субстрата;

– накривали стрипи новою клейкою плівкою або кришкою та інкубували за кімнатної температури в темному місці протягом 30 хв.;

– зупиняли кольорову реакцію внесенням у лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

Не більше як через хвилину після зупинення кольорової реакції визначали оптичну густина в лунках у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

Оптичну густина можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки.

Облік та інтерпретацію результатів аналізу проводили відповідно до рекомендацій та формул, наведених в інструктивних матеріалах до тест-набору [26-30].

У випадку первинної герпетичної інфекції (4-6-й день захворювання) результат може бути негативним. При наявності клінічних проявів рекомендується провести повторне тестування через 10-14 днів.

2.2.2 Методика проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Для проведення ПЛР використовували обладнання і реактиви:

- етап виділення ДНК: ультрацентрифуга, вортекс (центрифуга), термостат, ступка і товкачик, дозатор із змінним об'ємом, наконечники для дозатора, пробірки, набір реактивів для виділення ДНК, досліджуваний матеріал;
- етап ампліфікації ДНК: програмований ампліфікатор, вортекс, дозатор із змінним об'ємом, наконечники для дозатора, пробірки, набір реактивів для ампліфікації ДНК, досліджувана ДНК;
- етап детекції продуктів ПЛР: джерело електричного живлення, камера для електрофорезу, дозатор із змінним об'ємом, наконечники для дозатора, агароза, буфер трис-боратний, розчин бромистого етидія, маркер молекулярних вагів фрагментів ДНК, продукти ампліфікації ДНК;

ДНК для досліджень отримували зі щойно отриманих зразків біологічного матеріалу. При виділенні ДНК використовували стандартні набори реактивів – ДНК-сорб-А (АмпліСенс). До складу набору входять: лізуючий розчин, розчин для відмивання, сорбент універсальний, ТЕ-буфер для елюції ДНК.

Процедура виділення ДНК:

- зразки розтирали у гомогенізаторі з додаванням 100 мкл дистилляту і переносили проби по окремих завчасно промаркованих стерильних хімічно чистих пробірках;
- гомогенат змішували з лізуючим розчином (300 мкл), який попередньо нагрівали до 65°C до повного розчинення кристалів;
- проби ретельно перемішували на вортексі і прогрівали 5 хв. при 65°C. Центрифугували 5 хв. при 5 тис. об/хв. Якщо проба розчинялася не повністю, процентрифуговану пробірку додатково центрифугували на ультрацентрифузі 5 хв. при 12 тис. об/хв і використовували для виділення ДНК надосадову рідину, переносючи її у нову пробірку [31];

– ретельно ресуспендували сорбент на вортексі. У кожную пробірку окремим наконечником додавали по 20 мкл ресуспендованого сорбенту. Перемішували на вортексі, ставили в планшет на 2 хвилини, ще раз перемішували і залишали в штативі на 5 хвилин;

– осаджували сорбент в пробірках центрифугуванням при 5 тис. об/хв протягом 30 с. Видаляли супернатант, використовуючи дозатор із змінним об'ємом і міняючи наконечник для кожної пробірки;

– додавали в пробірки по 500 мкл розчину для відмивання, перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, про центрифугували 30 с при 10 тис. об/хв на мікроцентрифузі;

– видаляли супернатант, використовуючи дозатор із змінним об'ємом і міняючи наконечник для кожної пробірки;

– повторювали відмивання ще раз, надалі повністю видаляли супернатант;

– пробірки інкубували в термостаті при 65°C 5-10 хв для підсушування сорбенту (осад набув кольору крейди). При цьому кришки пробірок лишали відкритими;

– у пробірки додавали по 100 мкл TE-буфера для елюції ДНК, перемішували на вортексі. Інкубували в термостаті при 65°C на 5 хв, періодично струшуючи на вортексі;

– центрифугували пробірки при 12 тис. об/хв протягом 1 хв. на ультрацентрифузі. Супернатант містив очищену ДНК, проби готові до постановки ПЛР. Очищену ДНК можна зберігати протягом тижня при 2-8°C. Ефективність виділення ДНК складає 50-70 %.

Ампліфікація ДНК проводиться із використанням програмованого ампліфікатора, який залежно від стадії змінює температурний режим пробірок і часовий інтервал.

Ампліфікація ДНК включає 3 стадії:

– денатурація ДНК (0,5-1 хвилини, 93°C);

– відпал праймерів (0,5-1 хвилини, 35-40°C);

– нарощування ланцюга (1 хвилини, 72°C).

Порядок роботи:

- у завчасно промаркованих пробірках змішували досліджувану ДНК і праймер, а також суміш нуклеотидів і полімерази. Центрифугували на вортексі протягом 1 хвилини, щоб на стінках пробірок не залишилося реагентів;

- вибирали відповідну програму на ампліфікаторі, завантажували пробірки в ампліфікатор і запускали ампліфікацію;

- по закінченню ампліфікації приступили до детекції продуктів.

Для детекції використовували горизонтальний електрофорез у агарозному гелі з використанням трис-боратного буфера. Для візуалізації ДНК-фрагментів у буфер додавали бромистий етидій, який здатний вбудовуватися у дволанцюжкові молекули ДНК і флуоресціювати під впливом ультрафіолету. Для етапу детекції продуктів ампліфікації використовували: агарозу, трис-боратний буфер, бромистий етидій, маркер молекулярних мас.

Порядок роботи:

- готували 1,8%-ий агарозний гель на основі трис-боратного буфера і заливали його в камеру для електрофорезу;

- заливали гель трис-боратним буфером, що містив бромистий етидій;

- наносили по 5 мкл кожної проби в окремі лунки. У окрему лунку вносили маркер;

- підключали камеру для електрофорезу до джерела електричного струму (50 mA, 100 V).

Через 30-70 хвилин після початку електрофорезу дістатавали гель і розглядали пластинку під ультрафіолетом, використовуючи спеціальні окуляри для захисту очей. Чим менше довжина дволанцюжкового ДНК-фрагмента, тим слабкіше він флуоресціював. Це пояснюється тим, що в короткий ДНК-фрагмент вбудовується менша кількість молекул бромистого етидія, чим в довгий [31].

Обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Office Excel.

2.3 Поширення герпесвірусних інфекцій 1-4 типів серед вагітних

При виконанні огляду літератури було відмічене, що герпетичні ураження є

одними з найбільш часто виявлених у населення незалежно від вікової групи, статі, соціального статусу. Віруси герпесу 1-4 груп є значно більш поширеними і обумовлені ними інфекції є превалюючою групою [32]. У той час як віруси груп 5-8 трапляються порівняно рідко, але при цьому зумовлюють розвиток дуже важких станів, зокрема, лейкози [33.]. Більшість герпетичних уражень протікає у латентній формі, без маніфестних ознак, однак, при дослідженні наявності антитіл останні виявляються понад у 95% обстежених [34]. Через найбільший рівень поширеності особливу загрозу для населення становлять віруси простого герпесу 1-го та 2-го типу і цитомегалії. Для більшості ці ризики не є значущими і інфекція, як правило, не має вагомих наслідків. Зовсім інша ситуація має місце у випадку інфікування вагітних жінок, в яких вона може зумовити викидні, замирання плоду в останньому триместрі вагітності, загибель новонародженого в перші тижні життя або наявність у дитини позитивних вад розвитку, а також безпліддя. При цьому вагітні жінки є найбільшою групою ризику ураження герпесвірусами через пригнічення імунітету під час вагітності: щорічний показник їх інфікування у структурі уражень, викликаних герпесвірусами, становить 39,2%, а по цитомегалії – 53,8% [35]. Тому існує обов'язкова потреба у моніторингу вірусів герпесу у групі вагітних жінок.

Нами було досліджено на наявність антитіл до вірусів герпесу 1 та 2 типів, а також цитомегаловірусу зразки біологічного матеріалу (сироватка крові) від 68 вагітних жінок, у 12 (17,6%) сумнівних випадках виявлення антитіл до ЦМВ додатково використовували ПЛР-діагностику.

Позитивними на наявність активної форми інфекції виявилися 14 (20,6%) зразків та 12 (17,6%) зразків показали сумнівну відповідь, що виражалось у відсутності відповіді за IgM або підозрою на хибнопозитивний або хибнонегативний результат. Негативна відповідь, як засвідчувала, що жінка здорова, мала місце у 42 (61,8%) випадках (рис. 2.1).

Аналіз сумнівних випадків за результатами ПЛР дозволив встановити, що з 12 сумнівних результатів у 2 випадках було підтверджено інфекційний процес, а у 10 випадках ні (табл. 2.1).



Рисунок 2.1 – Частота виявлення герпесвірусної інфекції, обумовленої вірусами герпесу 1-3 типів серед вагітних жінок

Таблиця 2.1 – Порівняльні результати верифікації виявлення вірусів родини герпесу у ІФА та методом ПЛР

Тип вірусу	Число позитивних реакцій за результатами ПЛР та ІФА		
	ІФА		Підтверджувальна ПЛР
	Позитивний результат	Сумнівний результат	
ВПГ-1	5	1	0
ВПГ-2	7	2	0
ЦМВ	2	8	2
ВЕБ	0	1	0

За результатами, представленими у таблиці 2.1 можна побачити, що серед сумнівних результатів найбільш часто траплялися такі, що показала тест-система для виявлення ЦМВ. Всі сумнівні результати було отримано за допомогою розхідників з одного набору, про що було складено відповідний акт та направлено рекламцію виробнику для перевірки серії. Використання ПЛР-аналізу для верифікації даних дозволило підтвердити 2 випадки інфікування на

ЦМВ, інші сумнівні результати у ПЛР підтверджені як негативні. Отже, можна констатувати високу точність ІФА-діагностики та можливість застосування цього методу для експрес-діагностики герпетичних інфекцій.

2.4 Поширення вірусів герпесу 1-8 типів серед населення м. Дніпро

Для вивчення питання поширення герпесвірусів серед міського населення м. Дніпро виконували дослідження біологічного матеріалу від осіб віком 18-65 років. Віруси герпесу 1-3 груп визначали за допомогою ІФА-тест-систем, а віруси 4-8 груп визначали за допомогою ПЛР. Загалом було досліджено 167 зразків біоматеріалу (рис. 2.4.1).

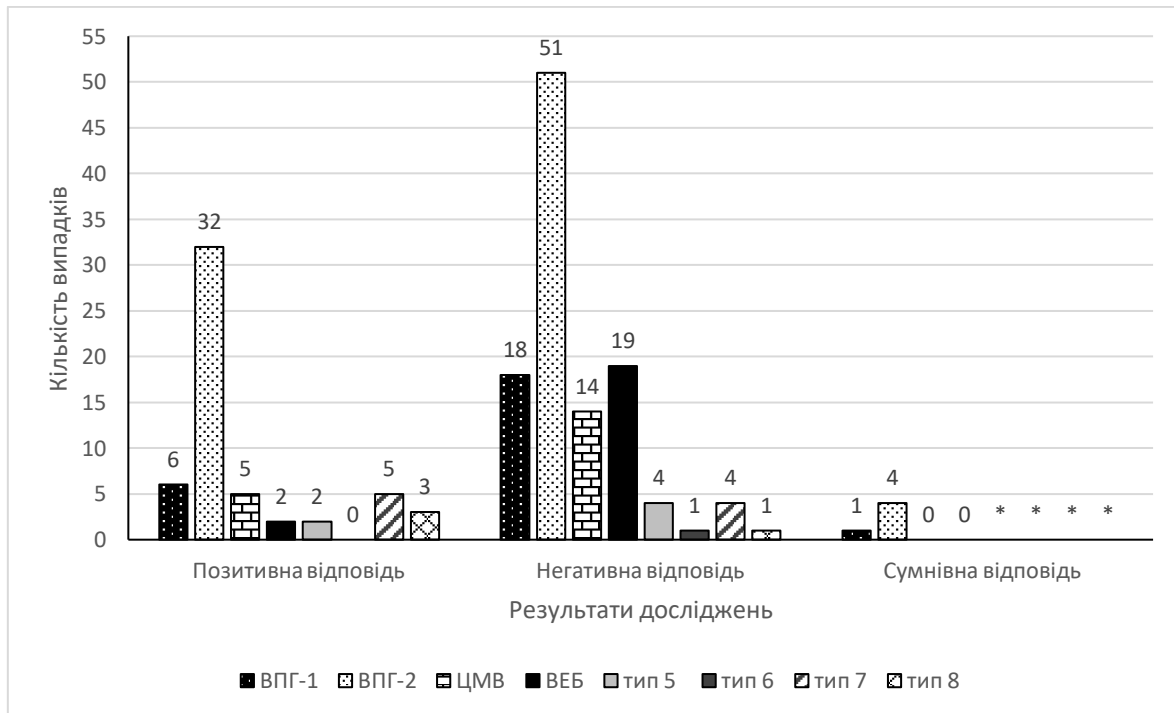


Рисунок 2.2 – Частота виявлення герпесвірусів різних груп серед міського населення (* – дослідження виконували виключно методом ПЛР)

Аналіз представлених на рис. 2.2 даних дозволив встановити, що частка осіб з активною формою інфекції становила 32,9% (55 випадків). Також було 5 випадків сумнівної відповіді, для яких підтверджено діагноз за допомогою ПЛР у 2 випадках. Отже, підсумкова кількість позитивних результатів становила 57 (34,1%), що є доволі високим показником, у той час як здебільшого ці показники

у популяції не перевищують 2-3% в середньому [32], а для вірусів герпесу 5-8 типів загалом не перевищують порогу у 0,2-0,5% [36.]. Визначний нами високий рівень показника може бути пояснений тим, що за діагностичними дослідженнями зверталися особи, які мали клінічні ознаки захворювання або підозру на таке, тобто від початку до обстежуваного контингенту входили виключно особи з патологічними проявами, а це значно відрізняється від загальної структури популяції.

Слід відмітити, що найбільш поширеними були звернення щодо дослідження на ВПГ-2 – 87 (52,1%) випадків, що становило більше половини звернень. ВПГ-2 пов'язаний зі статевим шляхом передачі [37], що опосередковано свідчить на переважне значення цього шляху поширення вірусів герпесу серед населення. Частота виявлення ВПГ-2 серед населення є найвищою – позитивна відповідь на гостру інфекцію отримана для 32 зразків у ІФА та додатково підтверджена ще для 2 зразків у ПЛР, тобто загальний показник становить 20,4% або п'ята частина обстежених.

Аналіз розподілу представників родини *Herpesviridae* серед усіх позитивних випадків показав абсолютну домінацію ВПГ-2 (рис. 2.3).

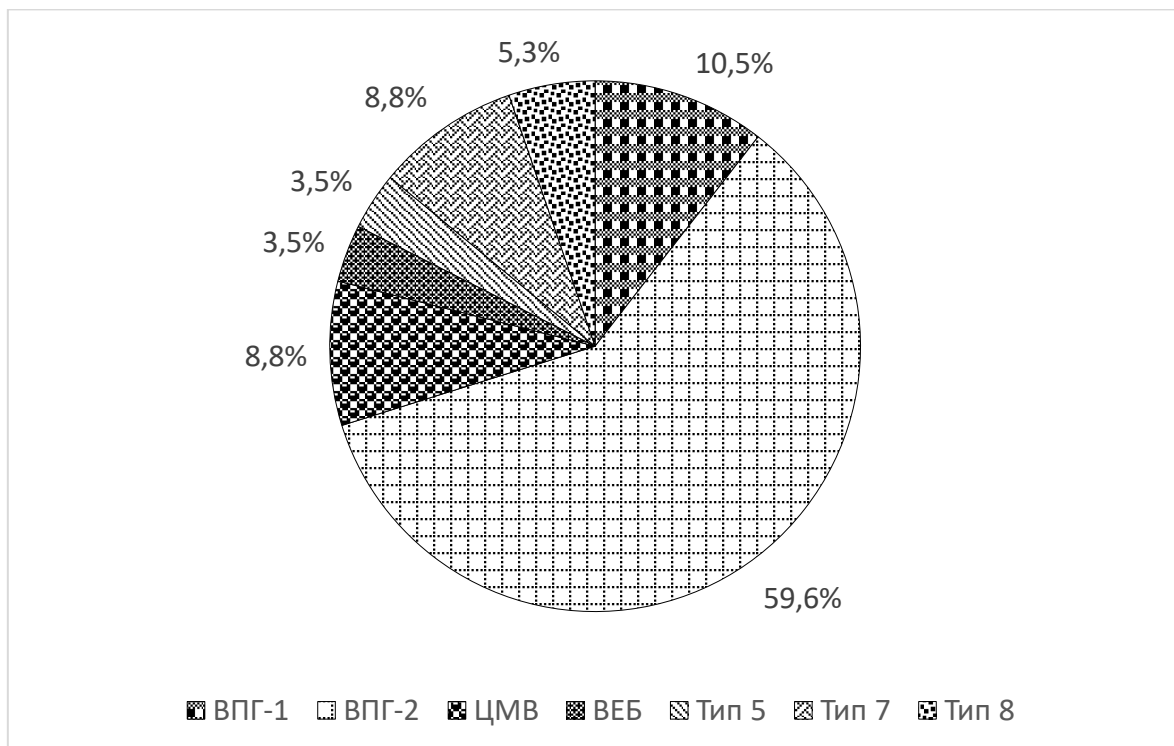


Рисунок 2.3 – Співвідношення різних типів вірусів герпесу серед

ПОЗИТИВНИХ ВІДПОВІДЕЙ

Так, частка випадків його виявлення серед усіх з позитивною відповіддю становила 59,6%. Значно меншими були частоти виявлення ВПГ-1 – 6 (10,5%) випадків, а також ЦМВ та тип 7 – по 5 (8,8%) випадків. Було підтверджено у 3 (5,3%) випадках зумовленість лейкозу вірусом герпесу типу 8 і по 2 (3,5%) випадки виявлено ВЕБ та герпес 5 типу. Вірус 6 типу в жодному випадку виявлено не було. Даний розподіл в принципі відповідає наявному у популяції типовому розподілу, відповідно до якого типовим для людської популяції є переважання ВПГ-2 та -1 і значно менша циркуляція інших вірусів [37]. Позитивною ознакою можна вважати низький відсоток виявлення ВЕБ, що свідчить про благополуччя довкілля та відсутність епідемічних ризиків [38].

Аналіз поширення вірусів герпесу у різних вікових групах показав, що переважна більшість інфікованих належала до наймолодшої групи осіб – 18-25 років (рис. 2.4). Частка таких пацієнтів становила 43,1%. У даній групі переважно визначали віруси герпесу 1 та 2 типу. Також всі випадки виявлення ЦМВ були саме у цій групі.

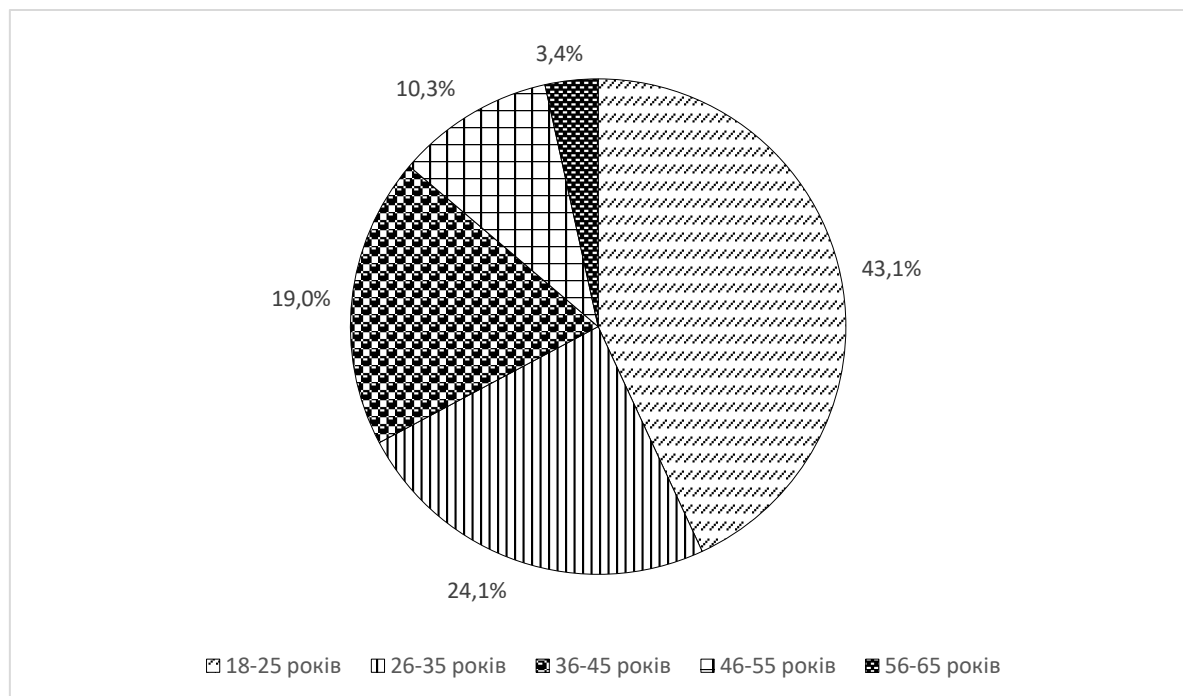


Рисунок 2.4 – Віковий розподіл хворих на герпесвірусні інфекції

Найменше випадків інфікування було зафіксовано у старшій віковій групі

(понад 55 років): всього 2 випадки, обидва з яких були представлені вірусом Епштейна-Бар (вірус виявлено у представників подружжя).

Загалом можна відмітити, що частота виявлення випадків інфікування зменшується з віком, що, імовірно, може бути пов'язано з більш відповідальним ставленням до здоров'я в осіб старшого віку. Так, у групі 26-35 років показник становив 24,1%, у групі 36-45 років – 19,0%, у групі 46-55 років – 10,3%.

Слід відмітити, що важкі форми герпесу, зумовлені вірусами типів 7 та 8 виявляли у середній віковій групі від 36 до 45 років. Імовірно, подібне може бути пов'язано з тим, що для цих вірусів типова довготривала латенція і, як правило, вони реактивуються і проявляють себе за умов дії негативних стимулів зовнішнього середовища, зокрема, цьому можуть сприяти шкідливі звички, наприклад, тютюнопаління [39].

Окремо було проаналізовано частоту ураження виявленими вірусами осіб залежно від приналежності до груп ризику (рис. 2.5). До груп ризику входили медичні працівники та військовослужбовці. У окрему групу було віднесено осіб, що не входять до перелічених груп ризику (пересічні громадяни), які проходили обстеження за власним бажанням.

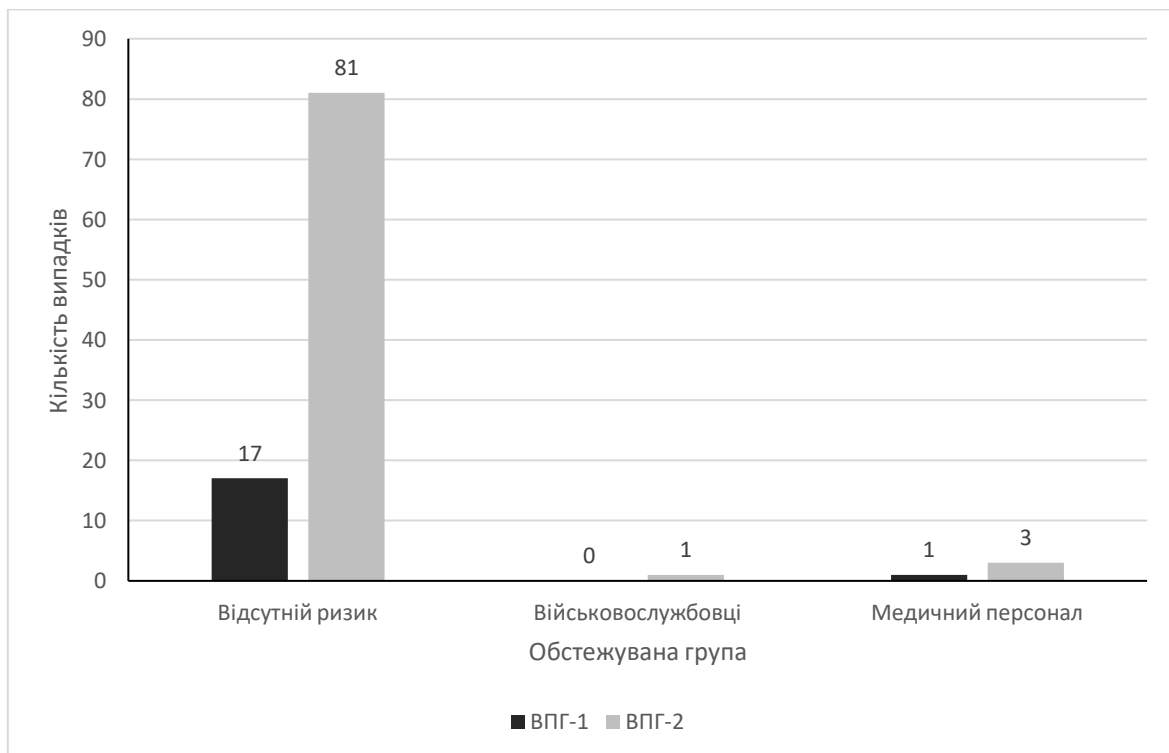


Рисунок 2.5 – Частота виявлення герпесвірусів залежно від приналежності

до груп ризику

Так, серед загального контингенту обстежених (167 осіб) 8 осіб це медичні працівники, 18 військовослужбовці. З них позитивні відповіді при тестуванні на герпесвірусні інфекції мали 1 особа з групи медичних працівників (виявлено ВПГ-1) та 4 військовослужбовців (виявлено ВПГ-1 та ВПГ-2).

Тобто загальна частота виявлення позитивних випадків становила за групами ризику 12,5% та 22,2% відповідно. Ці дані погоджуються з відомими даними стосовно циркуляції вірусів серед населення [40-42].

З представлених на рисунку даних можна побачити, що інфікування найбільш часто виявляли у групі осіб, що проходили обстеження за власним бажанням, а не у групах ризику. Так, 94,5% інфікованих на ВПГ-1 та 95,3% інфікованих на ВПГ-2 належали саме до цієї групи. Отже, можна констатувати, що належність до певних професійних груп не становить додаткових ризиків інфікування вірусами групи герпесу.

Аналіз розподілу за статтю показав, що немає достовірних відмінностей між групами чоловіків та жінок стосовно розподілу частоти інфікування (рис. 2.6).

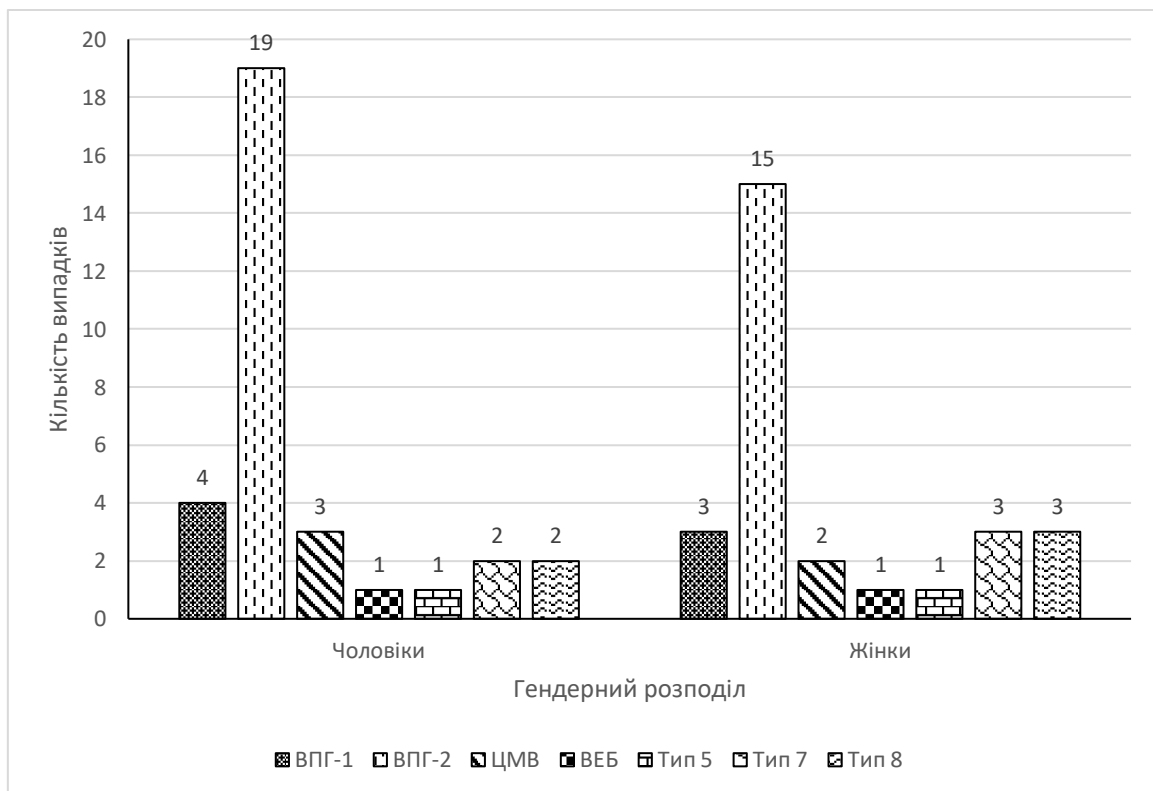


Рисунок 2.6 – Гендерний розподіл частоти інфікування на герпесвірусні

інфекції

Так, можна відмітити, що у групі чоловіків спостерігається незначне переважання частоти виявлення вірусів 1-3 типів, наявна рівність для ВЕБ та вірусу герпесу 5 типу, і типи 7 та 8 трохи частіше виявлялися у жінок. Зважаючи на незначну кількість досліджених зразків вивести яку-небудь закономірність за цим питанням неможливо. Потрібно дослідити більш широкий контингент.

Порівнюючи з відомими даними, можна відмітити, що ВПГ-1 та -2 частіше виявляються у чоловіків через схильність до ризикованої статевої поведінки [43], але більш яскрава маніфестація зазвичай у жінок через реагування вірусів на естральний цикл [44]. Для інших же вірусів групи герпесу виражена статевая залежність не відмічена [43].

2.5 Частота виявлення герпесвірусів серед населення м. Дніпро у 2023 р.

Ретроспективний аналіз результатів обстежень на віруси родини герпесу здійснювали на основі журналів обліку досліджень у лабораторії за 2023 р. Всього за вказаний період було досліджено 2004 зразки матеріалу, для 628 (31,2%) з яких отримано позитивні відповіді, що є порівняним з показником, отриманим нами у поточному дослідженні (32,9%) (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Частота виявлення герпесвірусів різних типів у 2023 р.

Тип вірусу	Частота виявлення (абс./% від загального контингенту)
ВПГ-1	202/10
ВПГ-2	348/17,4
ЦМВ	8/0,4
ВЕБ	36/1,8
Тип 5	7/0,4
Тип 6	3/0,1
Тип 7	15/0,7
Тип 8	9/0,4

Всього	628/31,2%
--------	-----------

Стабільність результату свідчить про постійну персистенцію вірусу у популяції, хоча знов-таки, маємо відмітити, що даний показник завищений, адже за дослідженням звертаються особи з патологічними проявами, що не є відображенням реальної популяції.

З представлених даних очевидним є те, що найбільш активно циркулюючими є віруси типів 1 та 2, що погоджується з відомими даними [45, 46]. Стосовно типів 4-8 також підтверджується інформація по незначну частоту їх виявлення у населення [47]. Щодо ЦМВ, то даний показник частоти виявлення є набагато нижчим за реальну частоту циркуляції цього вірусу. Але, зважаючи на практично незначний ефект вірусу при інфікуванні дорослої людини та майже повну відсутність маніфестації його практично не діагностують і він виявляється випадково. У більшості випадків його лабораторного підтвердження мова йде про планове обстеження вагітних, коли виконується специфічний тест [48, 49].

Дослідження по різних вікових групах населення показало (рис. 2.7), що найбільш часто герпесвірусна інфекція виявлялася у групі середнього віку від 26 до 45 років: 411 випадків з 628 підтверджених (65,4%). У групі осіб старших 55 років ця інфекція практично не визначалася: 36 випадків (5,7%).

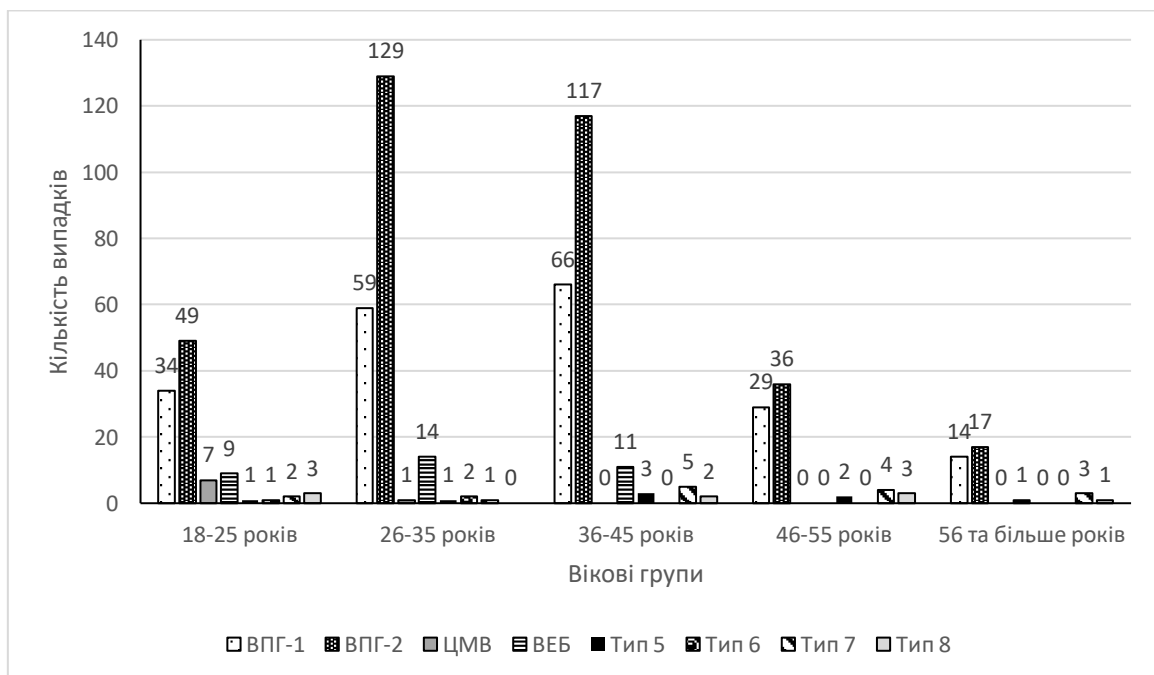


Рисунок 2.7 – Віковий розподіл частоти інфікування на герпесвірусні

інфекції у 2023 р.

Розподіл за ознакою статі у більш значній когорті дозволив встановити, що певні відмінності у частоті виявлення мають місце при аналізі гендерної ознаки тільки для ВПГ-2 (рис. 2.8).

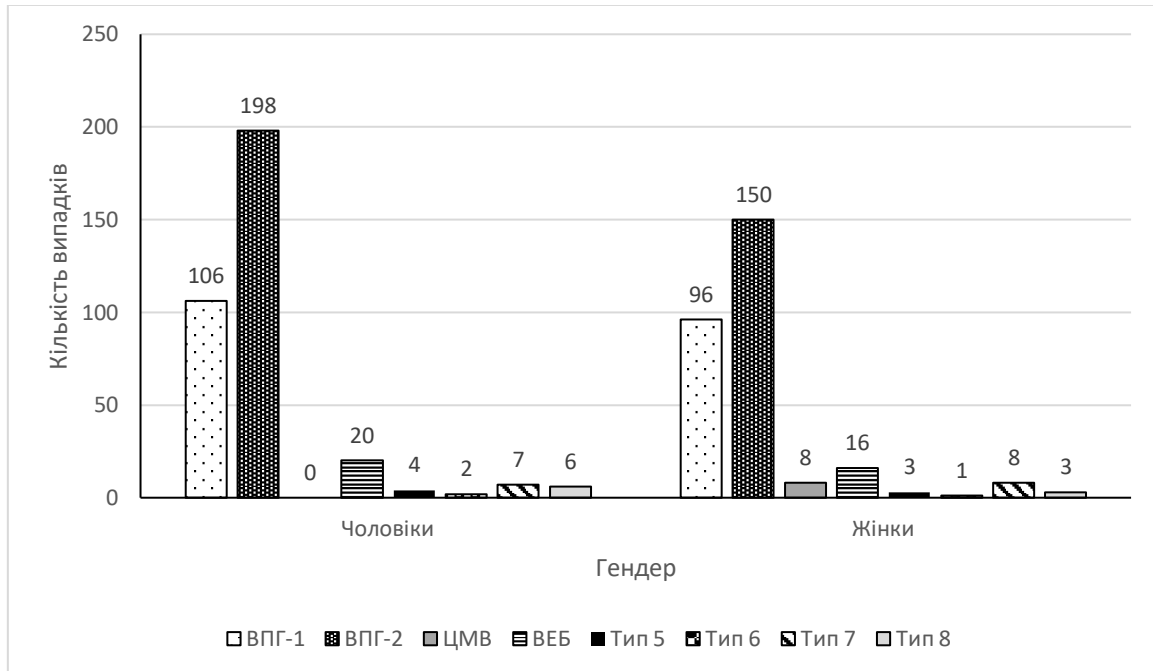


Рисунок 2.8 – Частота виявлення вірусів герпесу різних типів при розподілі за статтю у 2023 р.

Так, співвідношення частоти виявлення у чоловіків та жінок склало 56,9% проти 43,1% або 1:0,75. Даний показник не можна вважати доволі істотним, однак, він все одно свідчить про більш високі ризики інфікування чоловіків, що може бути пов'язано зі схильністю до більш ризикованої статевої поведінки [43].

Стосовно інших груп вірусів остаточні висновки зробити неможливо через малу кількість випадків, але у інших дослідженнях також не вказується на залежність частоти виявлення від статі [37].

Окремо для ВПГ-1 та -2 проаналізували залежність частоти виявлення від сезонності (рис. 2.9).

Так, пікові значення спостерігали у холодну пору року, що може бути пов'язано з впливом переохолодження на імунну систему, внаслідок чого вірус виходить з латентного стану у маніфестну форму [50].

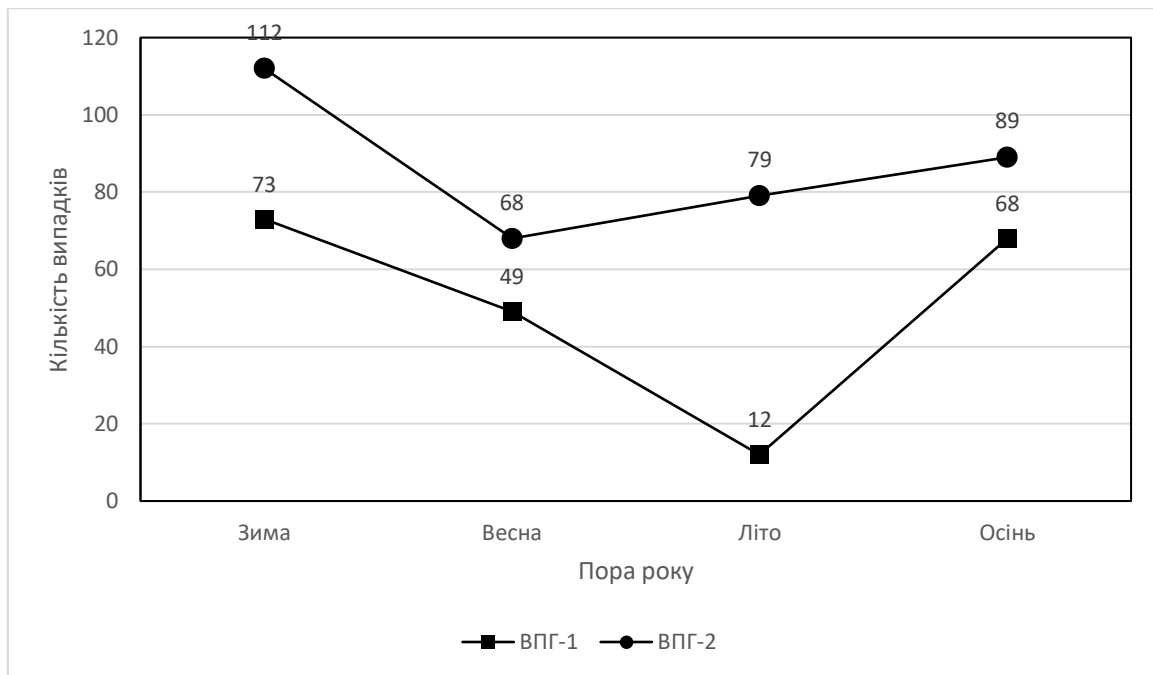


Рисунок 2.9 – Сезонність інфікування на ВПГ-1 та ВПГ-2

З настанням теплого сезону кількість випадків стає меншою, але влітку дані по ВПГ-1 та -2 суттєво різняться: частота виявлення ВПГ-2 значно більша. Це, імовірно, можна пояснити тим, що на цей період припадає більшість відпусток, що почасти співпадає зі сплеском статевої активності.

Аналізуючи моніторингові дані [51, 52] можна зазначити, що відмічається тенденція до щорічного збільшення кількості випадків інфікування на герпесвірусні інфекції, що становить значні ризики для населення [40.]. Отже, можна констатувати що з кожним роком серед населення міста збільшується кількість хворих на герпетичну інфекцію, що пов'язано з байдужістю людей до свого здоров'я та пізніми обстеженнями на наявність вірусів простого герпесу та цитомегалії. Важливо також відмітити, що вірогідно не останню роль у зростанні рівня інфікованості населення відіграє статевий шлях передачі, адже саме поширення ВПГ-2 вносить найбільшу долю у зростання показнику інфікованості на герпесвіруси.

Отримані нами результати вказують на те, що епідеміологічне становище, яке склалося у місті по герпесвірусним інфекціям, небажаним чином впливає на здоров'я людей репродуктивного віку, що загрожує рядом негативних наслідків,

серед яких невиношування вагітності, замирання та вроджені вади плоду, безпліддя, також можливий розвиток злоякісних новоутворень.

Успішне вирішення проблеми з цією групою інфекцій потребує комплексного підходу, зусиль багатьох зацікавлених служб і відомств, достатнього матеріального забезпечення лікувально-діагностичних заходів, а також розробки та використання методів швидкої та точної діагностики.

2.6 Висновки до практичного розділу

1. При дослідженні біоматеріалу від вагітних встановлено, що позитивними на наявність активної форми інфекції, зумовленої вірусами герпесу 1-3 типів виявилися 14 (20,6%) жінок та у 12 (17,6%) випадках за допомогою імуноферментного аналізу було отримано сумнівну відповідь. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ще у 2 випадках було підтверджено інфекційний процес.

2. При дослідження біологічного матеріалу від осіб віком 18-65 років (за виключенням вагітних) встановлено, що частка осіб з активною формою інфекції складала 24,1% (57 випадків). Найбільш часто виявляли ВПГ-2 – 34 зразки (20,4%).

3. Визначено, що переважна більшість інфікованих належить до групи осіб – 18-25 років – 43,1% всього контингенту. Гендерних особливостей при розподілі виявлено не було.

4. Ретроспективний аналіз результатів обстежень за 2023 р. дозволив встановити, що показник інфікованості склав 31,2% (628 випадків). Переважно циркулюючими є віруси типів 1 та 2, причому для останнього можна відмітити невелике переважання у групі чоловіків. Найбільш часто герпесвірусна інфекція виявлялася у групі середнього віку від 26 до 45 років: 411 випадків з 628 підтверджених (65,4%). У групі осіб старших 55 років ця інфекція практично не визначалася: 36 випадків (5,7%).

ВИСНОВКИ

1. При дослідженні біоматеріалу від вагітних встановлено, що позитивними на наявність активної форми інфекції, зумовленої вірусами герпесу 1-3 типів виявилися 14 (20,6%) жінок та у 12 (17,6%) випадках за допомогою імуноферментного аналізу було отримано сумнівну відповідь. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ще у 2 випадках було підтверджено інфекційний процес.

2. При дослідження біологічного матеріалу від осіб віком 18-65 років (за виключенням вагітних) встановлено, що частка осіб з активною формою інфекції складала 24,1% (57 випадків). Найбільш часто виявляли ВПГ-2 – 34 зразки (20,4%).

3. Визначено, що переважна більшість інфікованих належить до групи осіб – 18-25 років – 43,1% всього контингенту. Гендерних особливостей при розподілі виявлено не було.

4. Ретроспективний аналіз результатів обстежень за 2023 р. дозволив встановити, що показник інфікованості склав 31,2% (628 випадків). Переважно циркулюючими є віруси типів 1 та 2, причому для останнього можна відмітити невелике переважання у групі чоловіків. Найбільш часто герпесвірусна інфекція виявлялася у групі середнього віку від 26 до 45 років: 411 випадків з 628 підтверджених (65,4%). У групі осіб старших 55 років ця інфекція практично не визначалася: 36 випадків (5,7%).

У роботі проаналізовані шкідливі та небезпечні фактори у біохімічному та мікробіологічному відділах лабораторії при проведенні досліджень та надано їм характеристику. Наведені загальні вимоги до роботи в лабораторії з біологічним матеріалом (кров, плазма, сироватка); наведено перелік необхідних засобів індивідуального захисту.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бойко Т.І. Клінічні лабораторні дослідження: підручник. К.: Медицина, 2010. 352 с.
2. Гей А.І. Хронічні форми Епштейна – Барр вірусної інфекції. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2009. № 2/3. С. 59–63.
3. Жигульова Е.О. Біологічні ризики внутрішньоутробної інфекції. International scientific and practical conference: Lublin, the Republic of Poland March 12–13, 2021. – С. 130–133.
4. Імунологія: підручник / Л.В. Кузнецова, В.Д. Бабаджан, Н.В. Харченко та ін.; за ред. Л.В. Кузнецова. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. 565 с.
5. Інфекційні хвороби: підручник / В.М. Козько, Г.О. Соломенник, К.В. Юрко. Харків: Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2019. 312 с.
6. Бойко Т.І. Клінічні лабораторні дослідження: підручник (ВНЗ I-III р. а.) / 2-е вид., переробл. і допов. К.: Медицина, 2015. 352 с.
7. Лаповець Л.Є. Клінічна лабораторна діагностика: Підручник для студентів медичних ЗВО, лікарів-інтернів, фахівців лабораторної діагностики. К.: Медицина, 2021. 472 с.
8. Мальцев Д.В. Герпесвірусні інфекції в нефрології. Актуальні проблеми нефрології. 2020. № 26–27. С. 15–25.
9. Мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручник для студ. стомат. ф-тів вищих мед. навч. закл. III–IV р. а. / [В.В. Данилейченко, С.І. Климнюк, О.П. Корнійчук та ін.] ; за заг. ред. В.В. Данилейченка, О.П. Корнійчук. Вінниця : Нова Книга, 2017. 376 с.
10. Мікробіологія: підруч. для студентів вищ. навч. закл. / Н.І. Філімонова, Л.Ф. Сілаєва, О. М. Дика та ін. ; за заг. ред. Н. І. Філімонової. – 2-ге вид. Харків: НФаУ : Золоті сторінки, 2019. 676 с.
11. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищих мед. навч. закладів / за ред. В.П. Широбокова. – 3-тє вид., оновл. та допов.

Вінниця: Нова Книга, 2021. 920 с.

12. Філіпова Т.О., Гудзенко Т.В., Галкін М.Б., Зінченко О.Ю., Ямборко Г.В., Русакова, М.Ю. Імунологічні методи: метод. вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Імунологія». Одеса: Одес. нац. ун-т ім. І.І. Мечникова, 2018. 90 с.

13. Чемич М.Д. Клініко-епідеміологічні особливості герпесвірусної інфекції. Інфекційні хвороби. 2016. № 1 (83). С. 23–27.

14. Ballyram R. Oral diseases associated with human herpes viruses: Aetiology, clinical features, diagnosis and management. South African Dental Journal. 2016. Vol. 71. No. 6. P. 253–259.

15. Baynes J.W., Dominiczak M.H. Medical Biochemistry E-Book. Elsevier Health Sciences, 2014. 636 p.

16. Bennett N.J. Pediatric mononucleosis and Epstein-Barr virus infection. 2012. URL: <http://emedicine.medscape.com/article/963894>. – 08.05.2013.

17. Buchanan B.B., Gruissem W. Jones R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 2015. ASPP. 1283 p.

18. Chaudhari, G.N., Kavil, S.P. & Ullal, D.P. (2014). An overview on ELIAS techniques for analyte detection to new levels: a review. Inter J of Multidisciplinary Edu Res (3, 6 (1)). 172-206.

19. Herpes simplex virus WHO. Updated May. 01. 2020. [Electronic resource]. – Access mode : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.

20. Lequin, Rudolf M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clinical chemistry 51.12 (2005): 2415-2418.

21. Mandy Alhajj; Muhammad Zubair; Aisha Farhana (2023). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922>.

22. Molecular biology / Robert F. Weaver. – 5th ed. – 914 p. URL https://aliazamani.files.wordpress.com/2015/09/molecular_biology_r-_f-_weaver_5th_ed.pdf.

23. Steiner I. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella

zoster. 2007. No. 6. P. 1015–1028.

24. Suleyman Aydin (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. (72) 4-15. URL: <https://doi.org/10.1016/j.peptides>. 2015.04.012.

25. Waritani, T. (2017). An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. *Methods X*. (4). 153–165. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.03.002>.

26. Інструкція до тест-системи DIA-CMV-IgG для виявлення антитіл класу IgG до Cytomegalovirus. Приватне акціонерне товариство «Науково-виробнича компанія «ДІАПРОФ-МЕД», Україна. 4 с.

27. Інструкція до тест-системи DIA-CMV-IgM для визначення антитіл класу IgM до Cytomegalovirus. Приватне акціонерне товариство «Науково-виробнича компанія «ДІАПРОФ-МЕД», Україна. 4 с.

28. Інструкція до тест-системи DIA-HSV 1/2-IgM для визначення антитіл класу IgM до Herpes simplex virus першого та другого типів. Приватне акціонерне товариство «Науково-виробнича компанія «ДІАПРОФ-МЕД», Україна. 4 с.

29. Інструкція до тест-системи DIA-HSV 1/2-IgG для виявлення антитіл класу IgG до Herpes simplex virus першого та другого типів. Приватне акціонерне товариство «Науково-виробнича компанія «ДІАПРОФ-МЕД», Україна. 4 с.

30. Інструкція до тест-системи EBNA-1 для виявлення ядерного антигену вірусу Епштейна-Бар. – Euroimmun, Любек, Німеччина. 8 с.

31. Martin L. Orofacial herpes and other localizations (genital herpes and neonatal herpes excluded) / L. Martin // *Ann. Dermatol. Venerol.* 2002. Vol. 129., №8. – P. 494-506.

32. Dzabic M, Hendricks R, Münz C, Söderberg-Nauclér C. Welcome to Herpesviridae - a new premier virology journal. *Herpesviridae*. 2010 Dec 7;1(1):1.

33. Sharma V, Mobeen F, Prakash T. Comparative Genomics of Herpesviridae Family to Look for Potential Signatures of Human Infecting Strains. *Int J Genomics*. 2016;2016:9543274.

34. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb

SL, Looker KJ. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2020 May 1;98(5):315-329.

35. Montague A, Vandrevalla T, Calvert A, Yeh IL, Star C, Khalil A, Griffiths P, Heath PT, Jones CE. Experiences of pregnant women and healthcare professionals of participating in a digital antenatal CMV education intervention. *Midwifery.* 2022 Mar;106:103249.

36. Carneiro VCS, Pereira JG, de Paula VS. Family Herpesviridae and neuroinfections: current status and research in progress. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022 Nov 21;117:e220200. doi: 10.1590/0074-02760220200.

37. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence.* 2021 Dec;12(1):2670-2702.

38. Chatterjee K, Das P, Chattopadhyay NR, Mal S, Choudhuri T. The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon.* 2019 Nov 14;5(11):e02624.

39. Safonova E, Yawn BP, Welte T, Wang C. Risk factors for herpes zoster: should people with asthma or COPD be vaccinated? *Respir Res.* 2023 Jan 28;24(1):35.

40. AlMukdad S, Harfouche M, Farooqui US, Aldos L, Abu-Raddad LJ. Epidemiology of herpes simplex virus type 1 and genital herpes in Australia and New Zealand: systematic review, meta-analyses and meta-regressions. *Epidemiol Infect.* 2023 Feb 8;151:e33.

41. AlMukdad S, Harfouche M, Wettstein A, Abu-Raddad LJ. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 in Asia: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Lancet Reg Health West Pac.* 2021 Jun 9;12:100176.

42. Martins D, McCormack D, Tadrous M, Gomes T, Kwong JC, Mamdani MM, Buchan SA, Antoniou T. Impact of a Publicly Funded Herpes Zoster Immunization Program on the Burden of Disease in Ontario, Canada: A Population-based Study. *Clin Infect Dis.* 2021 Jan 27;72(2):279-284.

43. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Rep.* 2021 Jul 23;70(4):1-187.

44. Bagri P, Ghasemi R, McGrath JJC, Thayaparan D, Yu E, Brooks AG, Stämpfli MR, Kaushic C. Estradiol Enhances Antiviral CD4+ Tissue-Resident Memory T Cell Responses following Mucosal Herpes Simplex Virus 2 Vaccination through an IL-17-Mediated Pathway. *J Virol*. 2020 Dec 9;95(1):e01206-20.

45. Danastas K, Miranda-Saksena M, Cunningham AL. Herpes Simplex Virus Type 1 Interactions with the Interferon System. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 21;21(14):5150.

46. Johnston C, Magaret A, Roychoudhury P, Greninger AL, Reeves D, Schiffer J, Jerome KR, Sather C, Diem K, Lingappa JR, Celum C, Koelle DM, Wald A. Dual-strain genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection in the US, Peru, and 8 countries in sub-Saharan Africa: A nested cross-sectional viral genotyping study. *PLoS Med*. 2017 Dec 27;14(12):e1002475.

47. Rathbun MM, Szpara ML. A holistic perspective on herpes simplex virus (HSV) ecology and evolution. *Adv Virus Res*. 2021;110:27-57.

48. Ben Shoham A, Schlesinger Y, Miskin I, Kalderon Z, Michaelson-Cohen R, Wiener-Well Y. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence among women at childbearing age, maternal and congenital CMV infection: policy implications of a descriptive, retrospective, community-based study. *Isr J Health Policy Res*. 2023 Apr 25;12(1):16. doi: 10.1186/s13584-023-00566-9. Erratum in: *Isr J Health Policy Res*. 2023 May 25;12(1):23.

49. Demmler-Harrison GJ, Miller JA; Houston Congenital Cytomegalovirus Longitudinal Study Group. Maternal cytomegalovirus immune status and hearing loss outcomes in congenital cytomegalovirus-infected offspring. *PLoS One*. 2020 Oct 9;15(10):e 0240172.

50. Piret J, Boivin G. Immunomodulatory Strategies in Herpes Simplex Virus Encephalitis. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Feb 12;33(2):e00105-19.

51. Andrews N, Stowe J, Kuyumdzhieva G, Sile B, Yonova I, de Lusignan S, Ramsay M, Amirthalingam G. Impact of the herpes zoster vaccination programme on hospitalised and general practice consulted herpes zoster in the 5 years after its introduction in England: a population-based study. *BMJ Open*. 2020 Jul 7;10(7):e037458.

52. Choi HG, Zehnder JL, Lee YK, Lim H, Kim M. Increased risk of lymphoid malignancy in patients with herpes zoster: a longitudinal follow-up study using a national cohort. *BMC Cancer*. 2019 Nov 27;19(1):1148.

51. Голубнича В. М., Погорелов М. В., Корнієнко В. В. Біобезпека та біозахист у біологічних лабораторіях 1-го та 2-го рівнів біобезпеки : монографія. Суми: Сумський державний університет, 2016. 123 с.

52. ДСТУ 8828:2019. Пожежна безпека. Загальні положення. Київ: ДП «УкрНДНЦ», 2020. 84 с.

53. ДСТУ 2293-99. Охорона праці. Терміни та визначення основних понять.

54. ДСП 9.9.5.-080-2002 Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю. Видання офіційне. Київ, 2002, 48с.

55. ДСТУ 6051:2008. ПЛР-лабораторія для молекулярної діагностики. Загальні вимоги. 17 с.

56. Державні санітарні норми та правила «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я» Офіційний вісник України від 30.09.2014 - 2014 р., № 76, стор. 74, стаття 2163, код акту 73989/2014.

57. Зленко В.В., Пірягінська Н. Є., Литвиненко М. І. Організація роботи та забезпечення санітарно-протиепідемічного режиму в лабораторно-діагностичних установах різного профілю: навч. посібник. Харків: ХНМУ, 2015. 58 с.

58. Ковальова О.М., Лісний В.М, Амбросова Т.М., Смирнова В.І. Основи біоетики та біобезпеки. К.: ВСВ Медицина, 2016., 392 с.

59. Наказ Державний комітет України з нагляду за охороною праці № 255 від 15.11.2004 «Про затвердження Типового положення про службу охорони праці».

60. Наказ МОЗ України від 23.07.2002р. № 280 (із змінами МОЗ України № 2591 від 11.11.2020) «Щодо організації проведення обов'язкових

профілактичних медичних оглядів працівників окремих професій, виробництв і організацій, діяльність яких пов'язана з обслуговуванням населення і може призвести до поширення інфекційних хвороб»

URL : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0639-02#Text>.