

Zakażenie wirusem opryszczki pospolitej u kobiet ciężarnych z uwzględnieniem możliwości diagnostycznych w Polsce

Infection with herpes simplex virus of pregnant women taking the diagnostic possibilities in Poland into account

© GinPolMedProject 1 (35) 2015

Artykuł oryginalny/Original article

URSZULA JURKOWSKA, EWA DMOCH-GAJZLERSKA, AGNIESZKA WYROŻĘBSKA

Zakład Dydaktyki Ginekologiczno-Położniczej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ewa Dmoch-Gajzlerska

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Urszula Jurkowska

Zakład Dydaktyki Ginekologiczno-Położniczej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Żwirki i Wigury 81, 02-092 Warszawa

Tel./fax +48 22 5720702; e-mail: ujurkowska@interia.pl

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 2347/2852

Tabele/Tables 4

Ryciny/Figures 2

Piśmiennictwo/References 24

Received: 02.06.2014

Accepted: 26.09.2014

Published: 20.03.2015

Streszczenie

Wstęp. Ludzki Herpes Wirus typu 1 i 2 (HHV-1 i HHV-2), - wirus opryszczki pospolitej, jest najpowszechniej występującym czynnikiem etiologicznym opryszczki wargowej i płciowej. Ryzyko wystąpienia poważnych konsekwencji zakażenia HHV-1 i HHV-2 występuje szczególnie w grupie osób z obniżoną odpornością, a także u kobiet w ciąży i u noworodków. Około 2/3 seronegatywnych kobiet w ciąży, nabywa infekcję nie mając żadnych objawów sugerujących opryszczkę. Decydującą rolę w rokowaniu odgrywa odpowiednia diagnostyka i możliwość wdrożenia wczesnego leczenia.

Cel pracy. Określenie metod diagnostycznych wykorzystywanych w diagnostyce zakażeń HHV 1 i/lub 2 u kobiet w ciąży w Polsce oraz stworzenie algorytmu postępowania z kobietą ciężarną w kierunku zakażenia *Human Herpes Virus 1 i/lub 2* w zależności od jej statusu immunologicznego.

Material i metody. Dane gromadzone były w latach 2009-2011. Zarejestrowano 2625 laboratoriów na terenie całego kraju. Źródłem pozyskiwania danych był rejestr Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Pierwszy etap badań polegał na wyselekcjonowaniu spośród wszystkich placówek w Polsce tylko tych, które bezpośrednio wykonują badanie w kierunku zakażenia wirusem opryszczki pospolitej. Pozyskiwanie danych odbywało się poprzez autorski kwestionariusz ankietowy. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 6.1 PL i programu SISA tables. Przyjęto stopień istotności $p < 0,05$.

Wyniki. Wyselekcjonowano 30. instytucji wykonujących badanie w kierunku zakażenia, co stanowi 1,14% wszystkich laboratoriów. Laboratoria przyszpitalne stanowiły blisko 27% badanych jednostek, tyle samo laboratoria prywatne. Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne – nieznacznie powyżej 46%. Najwięcej laboratoriów znajduje się w województwie mazowieckim i śląskim (8,5), w małopolskim i łódzkim – 3, w lubelskim i zachodniopomorskim – 2. Jedną placówkę posiadają województwa: dolnośląskie, kujawsko-pomorskie, lubuskie, opolskie, pomorskie, warmińsko-mazurskie i wielkopolskie. Trzy województwa: podkarpackie, podlaskie i świętokrzyskie nie posiadają laboratoriów, w których była by możliwość wykonania badania.

Wnioski. Diagnostyka zakażenia kobiet ciężarnych wirusem *Human Herpes Virus 1 i/lub 2* najczęściej odbywa się przy wykorzystaniu metody ELISA. Metody diagnostyczne oparte na PCR i jego wariantach są wykorzystywane w Polsce tylko w nielicznych laboratoriach. Brak lub mała liczba laboratoriów wykonujących diagnostykę zakażenia wirusem *Human Herpes* utrudnia rozpoznanie infekcji u kobiet ciężarnych.

Słowa kluczowe: wirus opryszczki pospolitej typ1; wirus opryszczki pospolitej typ 2; ciąża; opieka okołoporodowa

Summary

Introduction. The human herpesvirus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2) – that is the virus of common herpes is the most common etiological factor for mouth and genital scabs. The risk of more serious consequences of HHV-1 and HHV-2 infection occurs especially in the group of people with lowered immune system capabilities, and also in case of pregnant women and newborn children. Around 2/3 of seronegative women acquires this infection without any symptoms that would suggest herpes. Decisive role for the outcome of the disease is thus played by proper diagnostics and the possibility to introduce early therapy.

The aim of the work. The ascertaining of the diagnostic methods used in detection of HHV 1 and 2 infections of pregnant women in Poland and creation of an algorithm for further treatment of a pregnant woman for *Human Herpes Virus* 1 and/or 2, depending on the state of her immune system.

Material and methods. The data was collected in the years 2009-2011. 2625 diagnostic laboratories in the whole country were registered. The source of data was the register of the National Chamber of Laboratory Diagnosticians [Pol. "Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych"]. The first stage of research was concerned with selecting those laboratories, from their total number in Poland, that directly perform tests detecting infections with common herpes viruses. The results gathered were subjected to statistical analysis with use of the Statistica 6.1 PL software suite and the SISA tables application. Significance level was adopted at $p < 0.05$.

Results. 30 institutions performing tests detecting infections were selected, that is the 1.14% of the total number of laboratories. Hospital laboratories accounted for almost 27% of the investigated institutions, similar was also the number of privately held labs. Sanitary and Epidemiological Service Stations – slightly above 46%. The largest numbers of labs are located in the following provinces: Masovian and Silesian (8,5), Lesser Poland and Łódź – 3 each, Lublin and Western Pomerania – 2 each. One lab each was recorded in: Lower Silesia; Kujawy-Pomerania, Lubusz, Opole, Pomerania, Warmia-Masurian, Greater Poland Provinces. Three provinces: Subcarpathian, Podlasie and the Holy Cross have no labs that would enable performing of such tests.

Conclusions. The diagnostics of pregnant women infections with *Human Herpes Virus* 1 and/or 2 is most often performed with use of ELISA method. The methods based on PCR and their variations are only used in few labs in Poland. The lack or the small number of laboratories performing *Human Herpes* virus infections makes the detection of infections of pregnant women difficult.

Key words: the human herpesvirus 1; the human herpesvirus 2; pregnancy; obstetric care

WSTĘP

Ludzki Herpes Wirus typu 1 i 2 (HHV-1 i HHV-2), zwyczajowo określane jako *Herpes Simplex Virus* typu 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2) – wirus opryszczki pospolitej, jest najpowszechniej występującym czynnikiem etiologicznym opryszczki wargowej i płciowej [1]. Wirus posiada zdolność zakażenia i namnażania się w centralnym układzie nerwowym. Miejscem docelowym dla typu 1. jest zwój nerwu trójdzielnego, a dla typu 2. jest najczęściej nerw lędźwiowo-krzyżowy. Zakażenie HHV-1 powoduje chorobę zlokalizowaną w obrębie twarzy lub jamy ustnej, natomiast typ 2 (HHV-2) w obrębie narządów płciowych [2]. Lokalizacja zmian opryszczkowych jedynie sugeruje, jaki typ prawdopodobnie jest czynnikiem sprawczym występującego zakażenia. W latach 2002-2004 badania prowadzone w USA, Kanadzie, Izraelu, Australii i Irlandii wykazały globalny wzrost udziału HHV-1 w zakażeniu narządów płciowych [3-7].

Powszechność występowania zakażeń wirusem opryszczki czyni go najczęściej występującą chorobą przenoszoną drogą płciową na świecie. Szacuje się, że od 1970 roku nosicielstwo w Stanach Zjednoczonych wzrosło o 30%. W Afryce częstość występowania waha się od 30% do 80% dorosłych kobiet i 10-50% doro-

INTRODUCTION

The human herpesvirus 1 and 2 (HHV-1 i HHV-2), usually referred to as the *Herpes Simplex Virus* 1 and 2 (HSV-1 i HSV-2) – is the most common etiological factor for mouth and genital scabs [1]. The virus is capable of infecting and multiplication in the central nervous system. The affected area for type 1 is the trigeminal nerve axon, and for type 2, most common area is the lumbosacral nerves. The HHV-1 infection causes a disease located in the facial area or mouth cavity, HHV-2 infection within the region of reproductive organs. The research conducted in the years 2002-2004 in the USA, Canada, Israel, Australia and the Republic of Ireland have shown the global increase of HHV-1 share in the infections of reproductive organs [3-7].

The common character of herpes virus infections makes it the most popular sexually transmitted disease in the world. It is estimated that the share of HHV-positive people in general population rose by 30% in United States, when compared to 1970. In Africa the frequency of occurrence ranges from 30 to 80% of adult women and 10 to 50% of adult men. The occurrence rate of HHV-2 in case of women of South America ranges from 20 to 40%. In Europe the infections are

słych mężczyzn. W Ameryce Południowej występowanie HHV-2 wśród kobiet waha się od 20-40%. W Europie infekcje występują częściej na północy kontynentu. W krajach skandynawskich problem dotyczy 15-33% kobiet w wieku 25-35 lat. We Włoszech 17% pacjentów klinik *Sexually Transmitted Disease* zgłasza się z objawami opryszczki, a w Australii 40%, w tym 14% stanowią kobiety w ciąży [1,8].

W Polsce w 2006 roku zarejestrowano 296 przypadków opryszczki płciowej, w 2007r. – 193, a w 2008r. – 198 przypadki. W roku 2009 nastąpił znaczny wzrost zakażeń - liczba zarejestrowanych przypadków wyniosła 620 [9,10]. Dane są znacznie zaniżone z powodu braku standardów epidemiologicznych. Problemem jest również nie zgłaszanie zakażenia przez lekarzy prowadzących i specjalistów pionu skórno-wenerologicznego.

Z danych epidemiologicznych wynika, że kobiety są zdecydowanie częściej nosicielami wirusa *Herpes* typu 2 niż mężczyźni, bez względu na populację lub położenie geograficzne. Do innych czynników predysponujących do zakażenia należą: pochodzenie etniczne, status społeczno-ekonomiczny, wykształcenie, zachowania seksualne, jakość i dostępność opieki medycznej oraz palenie tytoniu. Ryzyko wystąpienia poważnych konsekwencji zakażenia HHV-1 i HHV-2 występuje szczególnie w grupie osób z obniżoną odpornością (osoby zakażone HIV, biorcy, pacjenci przyjmujący leki cytostyczne), u kobiet w ciąży i u noworodków [11,12].

Wyróżnia się dwa różne stany kliniczne u kobiet w ciąży, które mają decydujący wpływ na sposób prowadzenia ciąży. Pierwszy odnosi się do sytuacji, gdy kobieta ciężarna miała kontakt w przeszłości z infekcją HHV-1 i/lub HHV-2. Świadczą o tym przeciwciała przeciwko wirusowi, które stanowią swoistą ochronę przed reaktywacją infekcji lub ponownym kontaktem z zakażoną osobą. Nie zabezpieczają one w pełni przed wrodzoną infekcją u noworodka. W takim przypadku istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia nawrotów, często bezobjawowych. Ryzyko przeniesienia wirusa na płód jest 10-30. razy mniejsze niż w zakażeniu pierwotnym, odpowiednio: ok.1% i 30-50%. Dodatkowo, tłumienie układu odpornościowego w okresie ciąży, przyczynia się do zwiększenia częstości występowania nawrotów zakażenia opryszczką, oraz wydłużenia czasu trwania i nasilenia objawów [13,14]. Druga możliwość odnosi się do sytuacji, gdy kobieta w ciąży nie posiada przeciwciał odpornościowych przeciwko HHV-1 i/lub HHV-2. Zakażenie w tym przypadku skutkuje wzrostem ryzyka wystąpienia nieprawidłowości w przebiegu ciąży. W I trymestrze ciąży zakłócenie procesu organogenezy może skutkować poronieniem lub obumarciem płodu. W 5% zakażeń może dojść do wystąpienia typowych cech zakażenia wirusami *Herpes*: zwągnięcia wewnątrzczaszkowe, małopłowie, wzmożone napięcie mięśniowe, drgawki, opóźnienie umysłowe, dysplazja siatkówki. Pierwotne zakażenie w II i III trymestrze ciąży może również prowadzić do poważnego uszkodzenia płodu, uniemożliwiając samodzielne

more frequent in the north of the continent. In Scandinavian countries the problem affects 15 to 33% women aged 25 to 35. In Italy 17% of patients reporting to Sexually Transmitted Diseases clinic have symptoms of herpes. In Australia it is 40%, 14% of which are pregnant women [1,8].

There were 296 cases of genital herpes registered in Poland in 2006, 193 in 2007 and 198 in 2009. 2009 saw a major increase in the number of infections with the number of registered infections totaling 620 [9,10]. This data is largely underrepresentative, as there are no epidemiological standards in place. What is also problematic is that the general practitioners and the dermatology and STD specialists are not bound to report such cases.

The epidemiological data suggests that women are significantly more often Herpes Virus 2-positive than men, regardless of the population or the geographical location. Other factors that predestine for infection include: ethnic origin, social and economical status, education level, sexual practices and the availability of medical care and tobacco smoking. The risk of serious HHV-1 and HHV-2 consequences occurs for all in the group of persons with lowered immunity (HIV-positive persons, transplant patients, patients treated with cytotoxic medicines), and also in case of pregnant women and newborn children [11,12].

There are two clinical states of pregnant women, that largely determine the way the pregnancy is cared after. The first one relates to a situation in which the pregnant woman had contact with HHV-1 and/or HHV-2 infection in the past. This is confirmed by the presence of virus antibodies that form an internal protection from reactivation of the infection or renewed contact with the infected person. These do not protect the newborn from inborn infection. In such a case a risk of recurrence, frequently without symptoms, is present. The risk of transferring the virus to the fetus is 10 to 30 times smaller than for initial infection, that is: around 1% and 30 to 50% respectively. Additionally the lowered activity of immune system in pregnancy contributes to the increase in frequency of recurrences and the lengthening of the duration period and intensity of symptoms [13,14]. The other possibility relates to situation in which the pregnant woman has no HHV-1 and/or HHV-2 antibodies. An infection in such a case results in increased risk of pregnancy complications. The disturbance of organ creation process in the first trimester can lead to stillbirth or dying of the fetus. In 5% of the cases the typical features of *Herpes* virus infections may occur: intercranial calcification, microcephaly, increased muscle tension, spasms, mental retardation, retinal dysplasia. An initial infection in 2nd and 3rd trimester may also lead to serious fetus malformations, that can make the unsupported functioning after birth problematic. Around 2/3 of the seronegative pregnant women acquires this infection without any symptoms that would suggest herpes. In the remaining cases the

funkcjonowanie po porodzie. Około 2/3 seronegatywnych kobiet w ciąży, nabywa infekcję nie mając żadnych objawów sugerujących opryszczkę. W pozostałych przypadkach, przebieg ciąży może być zakłócony przez objawy towarzyszące infekcji [15]. Decydującą rolę w rokowaniu odgrywa odpowiednia diagnostyka i możliwość wdrożenia wczesnego leczenia.

CEL PRACY

Celem pracy było określenie metod diagnostycznych wykorzystywanych w diagnostyce zakażeń HHV 1 i/lub 2 u kobiet w ciąży w Polsce oraz stworzenie algorytmu postępowania z kobietą ciężarną w kierunku zakażenia *Human Herpes Virus* 1 i/lub 2 w zależności od jej statusu immunologicznego.

MATERIAŁ I METODY

Dane gromadzone były w okresie od 2009 do 2011 roku. Zarejestrowano 2625 laboratoriów na terenie całego kraju. Źródłem pozyskiwania danych był rejestr Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Pierwszy etap badań polegał na wyselekcjonowaniu spośród wszystkich placówek w Polsce tylko tych, które bezpośrednio wykonują badanie w kierunku zakażenia wirusem opryszczki pospolitej. Pozyskiwanie danych odbywało się poprzez autorski kwestionariusz ankietowy mający na celu określenie jakimi metodami w Polsce diagnozuje się zakażenie *Human Herpes Virus* 1 i/lub 2 u kobiet w ciąży. Wyselekcjonowano 30. instytucji wykonujących badanie w kierunku zakażenia, tworzących zamkniętą grupę badawczą, co stanowi 1,14% wszystkich laboratoriów. Ankieta była adresowana do kierowników laboratoriów i rozsyłana drogą pocztową. Tą samą drogą otrzymywano zwrot wypełnionych ankiet. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 6.1 PL i programu SISA tables do przeprowadzenia testów dokładnych. Przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$. Zastosowano dokładny test Fishera.

WYNIKI

Kwestionariusz ankietowy skierowany został do 30. laboratoriów w Polsce, które wykonują diagnostykę w kierunku obecności zakażenia HHV 1 i HHV 2. Spośród laboratoriów wykonujących badanie w kierunku zakażenia wirusem opryszczki płciowej wyodrębniono 3 grupy: placówki prywatne, państwowe – Stacje Sanitarne - Epidemiologiczne i przyszpitalne (tab.1.).

Laboratoria przyszpitalne stanowiły blisko 27% badanych jednostek, tyle samo laboratoria prywatne. Stacje Sanitarne-Epidemiologiczne stanowiły najliczniejszą grupę, nieznacznie powyżej 46%. Stwierdzono przewagę laboratoriów państwowych. Jednak z analizy statystycznej wynika, że laboratoria prywatne częściej wykonują badania w kierunku zakażenia HHV-1 i HHV-2 w porównaniu z państwowymi mimo, że liczbowo jest ich mniej (tab.2.).

course of the pregnancy may be disturbed by the symptoms accompanying the infection [15]. The decisive role for the outcome is played by proper diagnostic and the possibility to introduce treatment early.

AIM OF THE WORK

The work aims at ascertaining the diagnostic methods used in detection of HHV 1 and 2 infections of pregnant women in Poland and creation of an algorithm for further treatment of a pregnant woman for *Human Herpes Virus* 1 and/or 2, depending on the state of her immune system status.

MATERIAL AND METHODS

The data was collected in the years 2009-2011. 2625 diagnostic laboratories in the whole country were registered. The source of data was the register of the National Chamber of Laboratory Diagnosticians. The first stage of research was concerned with selecting those laboratories, from their total number in Poland, that directly perform tests detecting infections with common herpes viruses. A custom-designed questionnaire form was used to gather data, aiming at ascertaining the methods for diagnosing Human Herpes Virus 1 and/or 2 infections of pregnant women in Poland. 30. Institutions were selected, creating a closed research group and accounting for 1.14% of the total number of laboratories. The questionnaire form was addressed to the laboratory managers and sent by mail. The same communication method was used to receive the forms. The results were subjected to statistical analysis with use of the Statistica 6.1 PL software suite and, for more precise tests, the SISA tables application. Significance level of $p < 0.05$ was adopted. The Fisher's exact test was utilized.

RESULTS

The questionnaire form was addressed to 30 laboratories in Poland testing for presence of HHV 1 and HHV 2. 3 groups were selected among those laboratories: private, state owned Sanitary and Epidemiological Stations and hospital labs (tab. 1).

Hospital laboratories accounted for almost 27% of researched units, similarly to the private labs. The Sanitary and Epidemiological Stations formed the most numerous group with slightly over 46%. The state-owned laboratories were in numerical majority. But the statistical analysis results have shown, that the private labs performed the HHV 1 and HHV 2 infection tests more often, when compared with the state-owned labs, even taking their lower number into account (tab. 2).

Statystyczną ocenę częstości wykonywanych badań przez laboratoria państwowe i laboratoria prywatne przeprowadzono wykorzystując dokładny test Fishera. Z analizy wynika, że istnieją istotne różnice w liczbie wykonywanych badań pomiędzy laboratoriami prywatnymi i państwowymi ($p=0,0491$). Laboratoria prywatne wykonują częściej i więcej badań w porównaniu z państwowymi. Najwięcej laboratoriów znajduje się w województwie mazowieckim i śląskim - odpowiednio: 8 i 5. W województwie małopolskim i łódzkim są 3 placówki. Po 2 laboratoria znajduje się w województwie lubelskim i zachodniopomorskim. Województwa: dolnośląskie, kujawsko-pomorskie, lubuskie, opolskie, pomorskie, warmińsko-mazurskie i wielkopolskie posiadają po jednej placówce wykonującej badania w kierunku zakażenia HHV 1 i/lub 2. W województwach podkarpackim, podlaskim i świętokrzyskim nie ma laboratoriów, w których była by możliwość wykonania badania (tab.3.). W Polsce, w przypadku infekcji wi-

The statistical analysis of frequency of tests performed by state-owned and private labs was made with use of the Fisher's exact test. The analysis proves, that there are significant differences between the number of performed tests between the privately- and state-owned laboratories ($p=0.0491$). The private labs perform the tests more frequently and in larger numbers than the state-owned ones. The largest numbers of laboratories are located in Masovian and Silesian Provinces – 8 and 5 respectively. 3 labs each are located in Lesser Poland and Łódź provinces. 2 labs each in Lublin and Western Pomerania provinces. The provinces of: Lower Silesia; Kujawy-Pomerania, Lubusz, Opole, Pomerania, Warmia-Masurian, Greater Poland; had one lab each. The Subcarpathian, Podlasie and the Holy Cross provinces have no labs that would enable performing of such tests (tab. 3). The most commonly used method for detection of human herpesvirus 1 and 2 in Poland is the ELISA method (tab. 4).

Tab. 1. Rodzaj placówki w statystycznej ocenie liczności

Rodzaj placówki	Liczność	Skumulowana liczność	Procent	Skumulowany procent
Laboratorium przyszpitalne	8	8	26,66667	26,6667
Laboratorium prywatne	8	16	26,66667	53,3333
Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne	14	30	46,66667	100,0000
Braki	0	30	0,00000	100,0000

Tab. 1. Type of laboratory in the statistical evaluation

Type of laboratory	Count	Accumulative count	Per-cent	Accumulative percent
Laboratories at hospitals	8	8	26,66667	26,6667
Private laboratories	8	16	26,66667	53,3333
Sanitary-Epidemiological Facilities	14	30	46,66667	100,0000
Deficiencies	0	30	0,00000	100,0000

Tab. 2. Statystyczna ocena liczności odpowiedzi dotyczących średniej liczby badań w kierunku zakażenia HHV 1i/lub 2 w ciągu miesiąca

Rodzaj placówki i zastosowane testy statystyczne	do 50. badań	51 i więcej	wiersz
Laboratoria prywatne	5	3	8
Procent całości	25,000%	15,000%	40,000%
Laboratoria państwowe + Stacje Sanitarno – Epidemiologiczne	12	0	12
Procent całości	60,000%	0,000%	60,000%
Razem w kolumnie	17	3	20
Procent całości	85,000%	15,000%	
Dokładny test Fishera, jednostronny/dwustronny		$p=,0491$	

Tab. 2. Average number of laboratory tests for HHV 1 and/or HHV 2 infection in a month

Type of institution and used statistical tests	to 50 examinations	51 and more	line
Private laboratories	5	3	8
Percent of the total	25,000%	15,000%	40,000%
National laboratories and Facilities of Sanitary Epidemiological	12	0	12
Percent of the total	60,000%	0,000%	60,000%
Total kolumn	17	3	20
Percent of the total	85,000%	15,000%	
Fisher's exact test		$p=,0491$	

rusem opryszczki typu 1 i/lub 2 u kobiet w ciąży, najczęściej stosowaną metodą jest ELISA (tab. 4.).

W zakażeniu HHV 1/2 u kobiet w ciąży 17. placówek (56,5%) wykorzystuje metodę ELISA. Dwa laboratoria (6,6%) wykorzystują do tego celu Real Time PCR z materiału bezpośredniego i tyle samo Real Time PCR z materiału bezpośredniego i metodę ELISA. Dwie placówki (6,6%) diagnozują zakażenia HHV 1/2 u kobiet ciężarnych używając metody ELISPOT i tyle samo metody „inne”. PCR z materiału bezpośredniego

17 institutions (56.5%) used the ELISA method for detection of HHV 1/2 in tests of pregnant women. Two laboratories (6.6%) use the Time Real PCR from the direct material and the same number both the Time Real PCR from the direct material and the ELISA method. Two institutions (6.6%) diagnose HHV 1/2 infection of pregnant women with use of ELISPOT method, and another two with “other”. PCR from direct material and immunochemistry (IEA, ChLIA) methods are used by just one laboratory (3.3%) and also one lab resorts to

Tab. 3. Liczebność laboratoriów wykonujących diagnostykę w kierunku infekcji HHV 1 i/lub 2 w poszczególnych województwach w latach 2009-2011

Województwo	Liczba placówek
Dolnośląskie	1
Kujawsko-Pomorskie	1
Lubelskie	2
Lubuskie	1
Łódzkie	3
Małopolskie	3
Mazowieckie	8
Opolskie	1
Podkarpackie	brak
Podlaskie	brak
Pomorskie	1
Śląskie	5
Świętokrzyskie	brak
Warmińsko-Mazurskie	1
Wielkopolskie	1
Zachodniopomorskie	2

Tab. 3. The number of laboratories performing HHV 1 and / or 2 diagnostics in particular provinces in 2009-2011

Province of Poland	Number of laborat.
Lower Silesia	1
Kuyavian - Pomeranian	1
Lublin	2
Lubusz	1
Łódź	3
Lesser Poland	3
Mazovian	8
Opolskie	1
Subcarpathian	none
Podlachian	none
Pomeranian	1
Silesian	5
Świętokrzyskie	none
Warmin and Mazury	1
Greater Poland	1
West Pomeranian	2

Tab. 4. Statystyczna ocena liczebności odpowiedzi na pytanie dotyczące rodzaju stosowanej metody w przypadku podejrzenia zakażenia HHV 1i/lub 2 u kobiet w ciąży

Metody diagnostyczne	Liczność	Skumulowana liczebność	Procent	Skumulowany procent
Immunofluorescencja z materiału bezpośredniego	1	1	3,33333	3,3333
PCR z materiału bezpośredniego	1	2	3,33333	6,6667
Real Time PCR z materiału bezpośredniego	2	4	6,66667	13,3333
Hodowla komórkowa + Real Time PCR z hodowli komórkowej + Real Time PCR z materiału bezpośredniego	1	5	3,33333	16,6667
ELISA	17	22	56,66667	73,3333
Real Time PCR z materiału bezpośredniego + ELISA	2	24	6,66667	80,0000
ELISPOT	2	26	6,66667	86,6667
EIA, ChLIA	1	27	3,33333	90,0000
PCR z materiału bezpośredniego + EIA, ChLIA	1	28	3,33333	93,3333
Inne	2	30	6,66667	100,0000

Tab. 4. Type of laboratory tests used for HHV detection in pregnant women

Diagnostic methods	Count	Accumulative count	Percent	Accumulative percent
Immunofluorescence	1	1	3,33333	3,3333
Direct PCR	1	2	3,33333	6,6667
Direct Real Time PCR	2	4	6,66667	13,3333
Cell Culture + Real Time PCR from the cell culture + direct Real Time PCR	1	5	3,33333	16,6667
ELISA	17	22	56,66667	73,3333
Real Time PCR + direct ELISA	2	24	6,66667	80,0000
ELISPOT	2	26	6,66667	86,6667
EIA, ChLIA	1	27	3,33333	90,0000
Direct PCR + EIA, ChLIA	1	28	3,33333	93,3333
Other methods	2	30	6,66667	100,0000

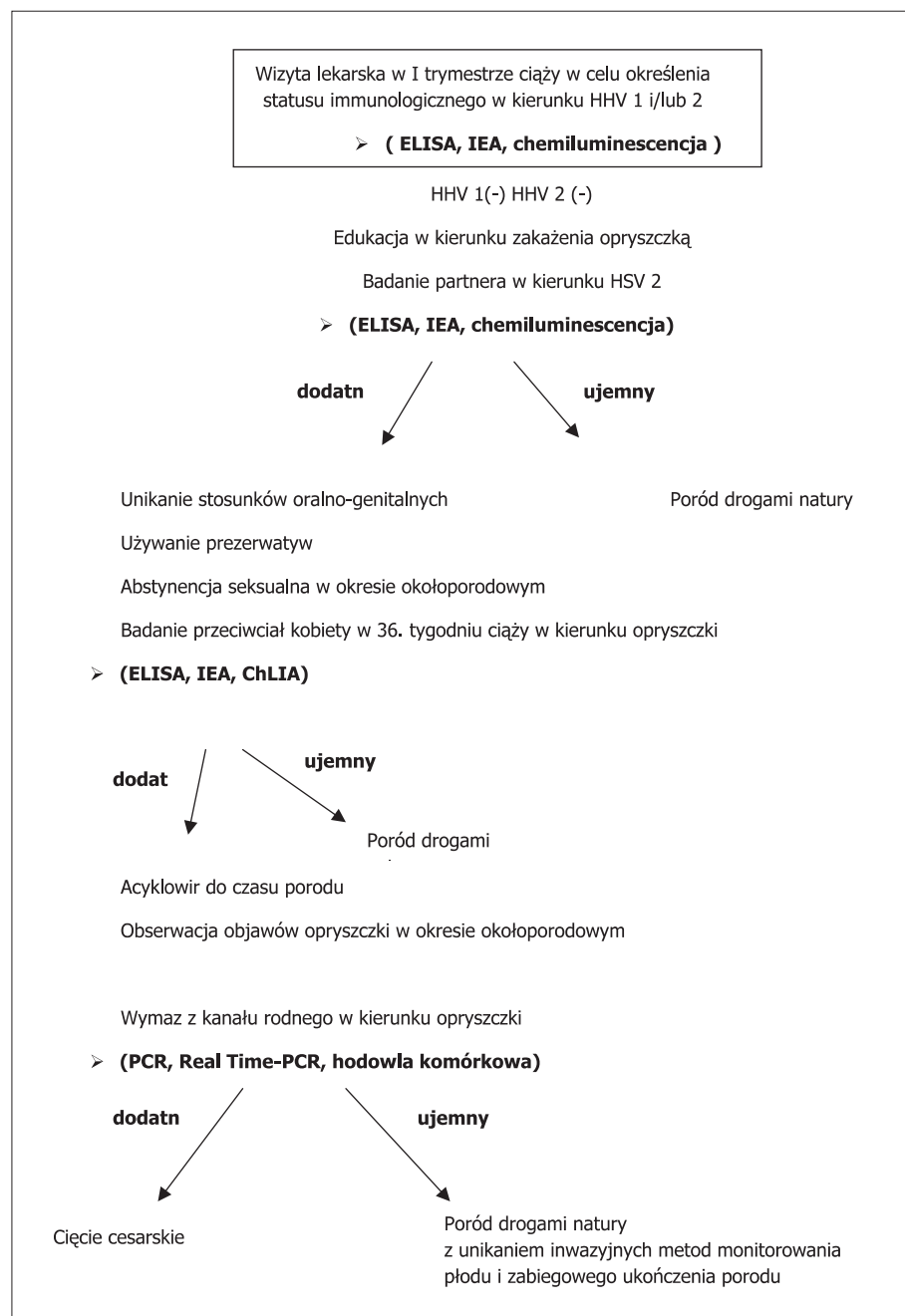
i metody immunochemiczne (IEA, ChLIA) stosuje jedna placówka (3,3%) i tyle samo tylko metody immunochemiczne. Immunofluorescencję z materiału bezpośredniego stosuje jedno laboratorium (3,3%) i tyle samo hodowlę komórkową, Real Time PCR z hodowli komórkowej i Real Time PCR z materiału bezpośredniego. Metodę PCR z materiału bezpośredniego również wykorzystuje jedno laboratorium (3,3%).

W oparciu o zebrane dane stworzony został projekt opieki nad kobietą ciężarną w kierunku zakażenia HHV 1 i/lub 2. W planie uwzględniono najnowsze wyniki badań dotyczące zakażenia narządów płciowych typem 1 opryszczki (HHV-1), zwanej opryszczką wargową.

just immunochemistry methods. Immunofluorescence of the direct material is used by one laboratory (3.3%), same number of labs uses cellular cultures, Real Time PCR from cellular cultures and Real Time PCR from direct material. The PCR method of the direct material is also used by one lab (3.3%).

Based upon the gathered data the program of care over the pregnant women directed at the HHV 1 and/or HHV 2 infection was designed. The program included the newest research results concerning the infection of genitals with type 1 herpes (HHV-1), that is also called the mouth herpes. A division into two groups, differing in the immune system status, was used. The

Ryc. 1. Plan opieki okołoporodowej nad kobietą ciężarną w kierunku zakażenia HHV 1 i/lub 2 w przypadku ujemnego wyniku HHV 1 i/lub 2



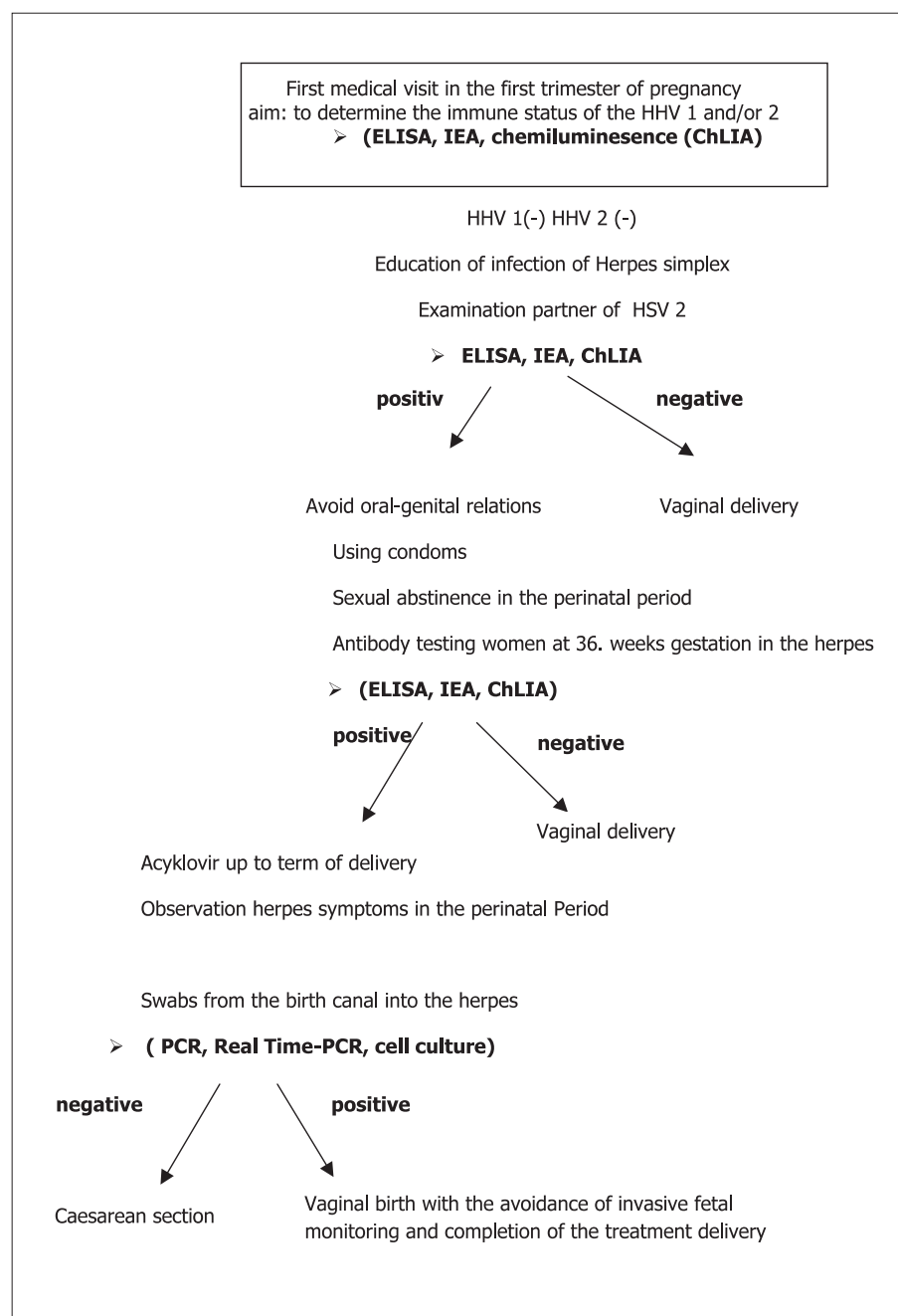
Zastosowano podział na dwie grupy różniące się statusem immunologicznym. Pierwsza obejmuje kobiety seronegatywne w kierunku HHV-1 i HHV-2 (ryc.1), a druga seropozytywne w kierunku HHV1 i/lub HHV-2 (ryc.2).

Projekt opieki rozpoczyna się wizytą kobiety w I trymestrze ciąży, na której proponowane jest badanie celem określenia statusu immunologicznego w kierunku HHV-1 i HHV-2 w przypadku, gdy taki status jest nieznan. Wiedza ta powinna być potwierdzona wynikami laboratoryjnymi z określeniem typu wirusa. Określenie statusu immunologicznego w Polsce można wykonać za pomocą testu ELISA i innych metod immunologicznych z zastosowaniem znaczników, takich

first one encompasses the women that are HHV-1 and HHV-2 seronegative (fig. 1) and the other one the HHV-1 and/or HHV-2 positive ones (fig. 2).

The care project starts with the visit of the woman in her 1st pregnancy trimester, during which a test is proposed that will ascertain her HHV-1 and HHV-2 immunology status, shall this be unknown to her. Such knowledge should be confirmed by test results skating the type of the virus. The ascertaining of the immunological status in Poland can be performed with use of ELISA test and other immunological methods with use of markers, such as the immunochemoluminescency (ChLIA). Further steps depend on the test result. Negative HHV-1 and HHV-2 test results indicates no prior

Fig. 1. Plan natal care of pregnant women of infection with HHV 1 and / or 2 in the case of a negative HHV 1 and / or 2



Ryc. 2. Plan opieki okołoporodowej nad kobietą ciężarną w kierunku zakażenia HHV 1 i/lub 2 w przypadku dodatniego wyniku HHV 1 i/lub 2

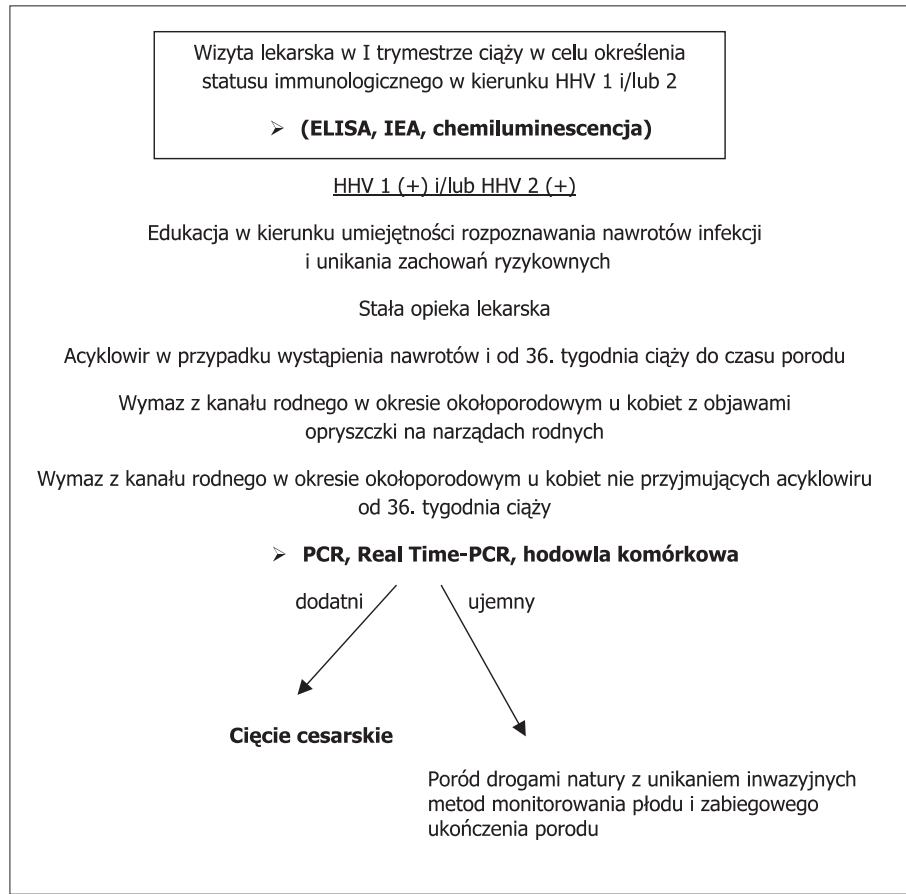
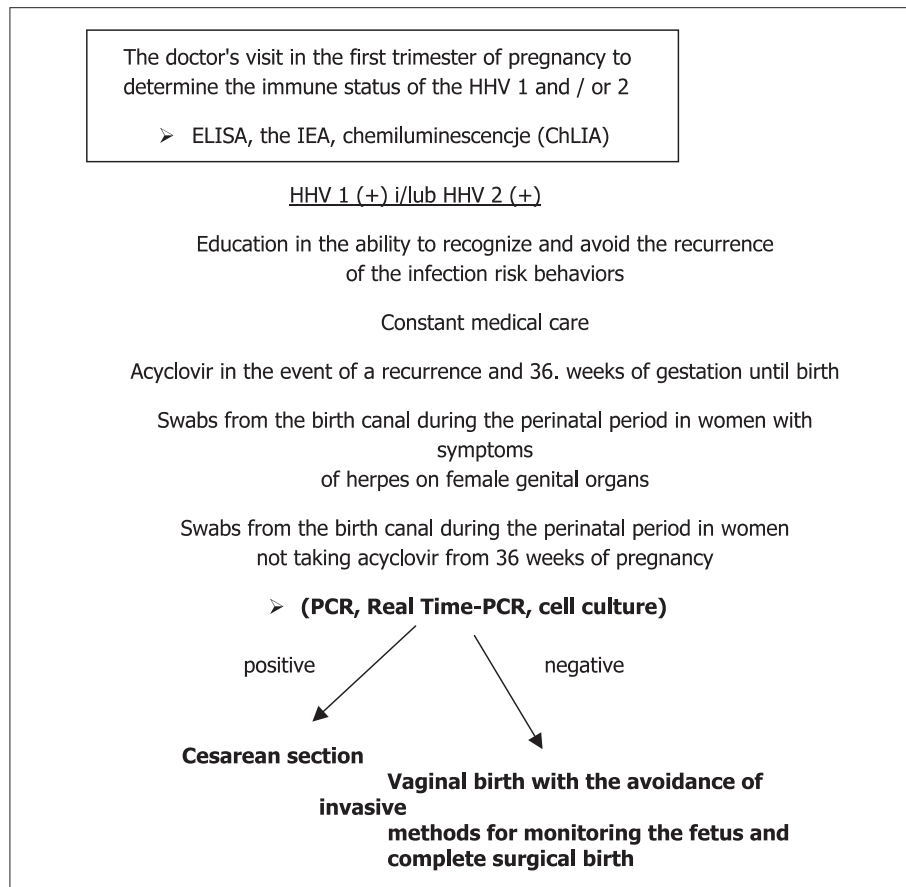


Fig. 2. Plan natal care of pregnant women of infection with HHV 1 and / or 2 in the case of a positive result HHV 1 and / or 2



jak immunochemiluminescencja (ChLIA). Dalsze postępowanie zależy od wyniku testu. Wynik ujemny w kierunku HHV-1 i HHV-2 wskazuje na nieprzebyte zakażenie wirusem opryszczki. Wskazane jest przebadanie partnera. W przypadku wyniku pozytywnego w kierunku wirusa opryszczki uzyskanego z użyciem metod immunochemicznych, konieczna jest edukacja obojga partnerów. Uwzględnić należy poradnictwo w zakresie unikania stosunków oralno-genitalnych, używania prezerwatyw i abstynencję seksualną w okresie okołoporodowym. W 36. tygodniu ciąży należy wykonać u kobiety badanie przeciwciał w kierunku opryszczki. Wynik ujemny umożliwia poród drogami natury, dodatni - kwalifikuje do podania acyklowiru doustnie w profilaktycznych dawkach zalecanych przez PTG do czasu porodu. Taka sytuacja jest wskazaniem do stałej obserwacji w kierunku objawów opryszczki w okresie okołoporodowym. Zaleca się również pobranie i zbadanie wymazu z kanału rodnego w okresie spodziewanego terminu porodu z wykorzystaniem nowoczesnych metod diagnostycznych. Najlepszym rozwiązaniem jest użycie PCR lub Real Time PCR ze względu na możliwość otrzymania wyniku w krótkim czasie. Dodatni wynik jest wskazaniem do wykonania cięcia cesarskiego, a ujemny nie jest przeciwwskazaniem do porodu drogami natury.

W przypadku, gdy na wizycie w I trymestrze ciąży, status immunologiczny kobiety wskazuje na seropozytywność w kierunku HHV-1 i/lub HHV-2 pomocne mogą się okazać poziomy Immunoglobulin G i M sugerujące czy dane zakażenie jest zakażeniem pierwotnym, przebyłym, czy infekcją nawrotową. Do stwierdzenia tych odmiennych stanów klinicznych konieczne jest uzyskanie poziomu przeciwciał z kilku pomiarów w różnych odstępach czasowych. W przypadku stwierdzenia infekcji pierwotnej zaleca się rozpoczęcie leczenia przeciwwirusowego.

Badania potwierdzające obecność wirusa opryszczki, rozpoczynają działania, które mają na celu zminimalizować ryzyko zakażenia płodu i noworodka. Kobieta ciężarna powinna uzyskać fachową i rzetelną informację na temat ryzyka, jakie stwarza infekcja nawrotowa oraz objawów. Stała opieka lekarska jest jednym z warunków ograniczenia ryzyka zakażenia. W przypadku stwierdzenia u siebie objawów prodromalnych, kobieta powinna zgłosić się do lekarza celem rozpoczęcia leczenia przeciwwirusowego. U każdej kobiety seropoztywnej należy zlecić od 36. tygodnia ciąży do czasu porodu zgodne z rekomendacjami dawki profilaktyczne acyklowiru. Działanie takie ma na celu zmniejszenie ryzyka nawrotu w trakcie porodu i ograniczenie wysiewu wirusa w wydzielinie kanału rodnego. W sytuacji, gdy objawów opryszczki na narządach płciowych nie stwierdza się, możliwy jest poród drogami natury z unikaniem inwazyjnych metod monitorowania płodu i zabiegowego ukończenia porodu.

U kobiet seropozytywnych nie przyjmujących acyklowiru od 36. tygodnia ciąży, wskazane jest wykona-

nie infekcji z herpes. This is an indication for testing the partner too. In case of a positive result of a herpesvirus test with immunochemical methods, education of both partners will be necessary. What should be included in that should be the recommendation to avoid oral-genital intercourse, to use condoms and abstain from intercourse in the period directly preceding birth. In 36th week of pregnancy the woman should undergo another test for presence of herpesvirus antibodies. Negative result of this test allows for natural birth, positive qualifies for oral administration of acyclovir in the prophylactic doses, as recommended by the PTG, till the date of delivery. Such a situation is also an indication for constant observation for symptoms of herpes in the near-delivery period. The collection of a smear sample from the reproductive tract is also advised in the period preceding childbirth. The sample is to be tested with use of modern diagnostic methods – the best solution is the use of PCR or Real Time PCR, as it allows a result to be produced in a very short time. A positive test result is an indication for a c-section, and negative forms no contraindication for a natural birth.

In case the immunological status of the woman during her 1st trimester visit indicated the HHV-1 and/or HHV-2 seropositivity the levels of G and M immunoglobulin may be of assistance, suggesting whether the infection is the primary infection, past infection or recurring infection. Measurement of antibody levels from several samples taken at different time intervals will be necessary for diagnosing of those different states. In case a primary infection is detected, the antiviral treatment is recommended.

The tests confirming the presence of herpesvirus start the actions leading at minimization of risk of fetus and newborn infection. The pregnant woman should be provided with professional and reliable information on risk that the recurring infection bears and its symptoms. Constant medical care is one of the conditions for risk minimization. In case of observation of prodromal symptoms the woman should report to the doctor in order to start antiviral treatment. Each seropositive woman should be ordered to take acyclovir, starting from the 36th week of pregnancy and till the birth date, in recommended prophylactic doses. This aims at limiting the recurrence risk during birth and the limitation of virus spreading in the excretions of the reproductive tract. When there are no symptoms of herpes on the genitals a natural birth is possible, with the exclusion of invasive fetus supervision methods and surgical end of the birth.

In case of seropositive women that are not administered acyclovir from the 36th week of pregnancy onwards it is recommended to take a culture smear sample of the reproductive tract excretions with use of viral nucleic acids amplification: that is PCR or Real Time PCR. Such a test is also ordered when changes are observed that could indicate the recurrence of the

nie wymazu z kanału rodniego metodami hodowlanymi lub z użyciem amplifikacji kwasów nukleinowych wirusa: PCR lub Real Time PCR. Badanie takie zaleca się również w przypadkach, gdy obserwuje się zmiany mogące świadczyć o nawrocie choroby. Wynik pozytywny jest wskazaniem do cięcia cesarskiego. Wynik ujemny umożliwia poród drogami natury z unikaniem inwazyjnych metod monitorowania płodu i porodu zabiegowego.

DYSKUSJA

Zakażenie HHV typu 1 i 2 stanowi problem ogólnoswiatowy. Zakażenia są w większości bezobjawowe, co dodatkowo utrudnia diagnozę. Pacjenci nieświadomi zakażenia często przenoszą wirusa na inne osoby. Stan układu odpornościowego gospodarza warunkuje przebieg zakażenia, ciężkość choroby i czas jej trwania. Pacjenci z upośledzeniem pracy układu immunologicznego dotkliwiej odczuwają chorobę. Zmiany są długoterminowe, niepoddające się leczeniu i mogą ograniczać się nie tylko do zmian miejscowych, ale i wielonarządowych. U zdrowych osób zmiany zazwyczaj są krótkoterminowe i ograniczają się do miejsca wtargnięcia wirusa do organizmu gospodarza. Aspekt ten ma szczególnie znaczenie w przypadku pacjentów zakażonych wirusem HIV, biorców narządów i pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne. U kobiet w ciąży i noworodków występuje obniżenie sprawności układu odpornościowego, co przyczynia się do cięższego przebiegu zakażenia [16].

Badania prowadzone między innymi w Kenii i Tajlandii potwierdzają istotnie większe ryzyko zakażenia wirusem HIV w przypadku seropozytywności HHV-2. Udowodniono również, że ryzyko transmisji od matki zakażonej wirusem HIV do płodu wzrasta trzykrotnie, jeżeli kobieta jest seropozytywna w kierunku HHV-2 [16-18]. Zwiększający się odsetek seropozytywności zainicjował powstanie licznych wytycznych i rekomendacji mających na celu ujednoczenie sprawowanej przez lekarzy opieki nad pacjentami zakażonymi wirusem opryszczki. Wytyczne międzynarodowe obejmują: edukację kobiety i jej partnera, działania prewencyjne, leczenie w przypadku infekcji pierwotnej lub nawrotowej, rozpoznawanie cech zakażenia lub objawów prodromalnych, ryzyko zakażenia płodu/novorodka, bezpieczeństwo leczenia czy unikania ryzykownych zachowań w okresie okołoporodowym. Edukacja kobiety seropoztywnej dotyczy w głównej mierze rozpoznawania objawów nawrotów, a u kobiety seronegatywnej, unikania działań zwiększających ryzyko zakażenia [19-24].

W Polsce problem opryszczki jest niedoceniany. Brak jest badań w kierunku poprawy jakości życia kobiet ciężarnych zakażonych wirusem opryszczki, brak standardów zarówno epidemiologicznych, jak i diagnostycznych, które jasno precyzują, jakie metody diagnostyczne należy stosować w danej sytuacji klinicznej.

disease. A positive test result is an indication for c-section. Negative test result allows for natural birth, with the exclusion of invasive fetus supervision methods and surgical procedure ending the birth.

DISCUSSION

HHV 1 and 2 infections are a worldwide problem. Those infections are mostly symptomless, which makes the diagnostic process even more difficult. The patients who are unaware of their infection frequently pass the virus to others. The condition of the immune system of the host conditions the course of infection, severity of the disease and its duration. The changes are long-term in their character and non-treatable, they can also be not limited to local changes but concern multiple organs. The healthy individuals usually experience short-term changes limited to the place the infection entered the body of the host. This aspect is of special importance in case of patients infected with HIV, organ recipients and patients treated with immunosuppressant drugs. Pregnant women and newborn children have lower levels of immune system efficiency, that contributes to the worse course of their infections [16].

The research conducted, inter alia, in Kenya and Thailand confirms the significantly higher risk of HIV-infection in case of previous HHV-2 seropositivity. It was also proven, that the risk of HIV transmission from infected mother to the fetus increases threefold in case of HHV-2 seropositive women [16-18]. The increased seropositivity rate initiated the construction of numerous guidelines and recommendations that aimed at the standardization of doctor's care of patients infected with herpesvirus. The international guidelines include: education of the woman and her partner, preventive actions, treatment in case of primary infection or recurrence, detection of infection features or prodromal symptoms, risk of fetus/newborn infection, safety of treatment or the omission of risky behavior in near-birth period. The education of the seropositive women concerns mostly the detection of symptoms of recurrence, and in case of seronegative women – the avoiding of actions that may lead to infection [19-24].

The problem of herpes is underestimated in Poland. There are no research efforts related with bettering the quality of life of pregnant women infected with the human herpesvirus, there are no epidemiological nor diagnostic standards in place, that would clearly precise which diagnostic methods are to be applied in the respective clinical situation. The small interest in tests may also be result of the lack of access to a lab that would perform a herpesvirus infection test. The Podlasie, Holy Cross or the Subcarpathian provinces have no test possibilities for HHV-1 and/or HHV-2 infections.

Małe zainteresowanie badaniem może być również spowodowane niedostępnością laboratorium wykonującego badanie w kierunku zakażenia wirusem opryszczki. Województwo podlaskie, świętokrzyskie lub podkarpackie, nie posiada możliwości wykonania badania z powodu braku na tych terenach laboratoriów wykonujących badanie w kierunku zakażenia HHV-1 i/lub HHV-2. Rozmieszczenie laboratoriów w poszczególnych województwach pokazuje, że dostępność badań w kierunku zakażenia opryszczką jest ograniczona. O ile w największych miastach Polski istnieje możliwość wykonania badania, to w mniejszych miejscowościach usługa ta jest niedostępna. Stanowi to problem nie tylko dla pacjentów, ale również dla szpitali, w których hospitalizowane są osoby, u których może wystąpić konieczność wykonania takiego badania. Rozwiązaniem tego problemu może być udostępnienie lekarzom i szpitalom wykazu najbliższych laboratoriów w województwie, z uwzględnieniem metod, jakimi posługują się dane laboratoria. Badania immunoenzymatyczne, takie jak ELISA lub immunochemiluminescencja są w Polsce stosowane najczęściej. Wartość tych badań zależna jest od stosowanej metody, jakości materiału, zdolności laboratoriów i interpretacji wyników. Metody serologiczne powinny być stosowane, gdy nie można zastosować hodowli komórkowej lub dała wynik ujemny [19]. Dodatkowo, u pacjentów stosujących ACV miano przeciwciał jest na tyle niskie, że metody określające przeciwciała ilościowo mogą dać wynik ujemny, pomimo istniejącego zakażenia [20]. Z tego powodu metody te są uznawane za mniej wrażliwe narzędzie diagnostyczne w porównaniu z PCR (lub wariantami) czy hodowlą komórkową.

W Polsce diagnostyka HHV-1 i HHV-2 z wykorzystaniem metody PCR i/lub Real Time PCR dostępna jest w 10. placówkach. PCR określany jest jako „Złoty Standard” w zakażeniach ośrodkowego układu nerwowego, a także zalecaną metodą w zakażeniach *neonatal herpes*. Dostępność tej metody w Polsce jest znacznie ograniczona, a to oznacza trudności w diagnozowaniu tych jednostek chorobowych.

Kobieta ciężarna powinna zostać objęta szczególną opieką i troską. Stworzone na całym świecie rekomendacje, plany opieki, wytyczne i zalecenia usprawniają system opieki, a także ukierunkowują lekarzy na konkretny plan działania poparty dowodami i badaniami. Plan opieki nad kobietą ciężarną w kierunku zakażenia wirusem opryszczki w Polsce nie istnieje. Przedstawiona w pracy propozycja planu obejmuje okres ciąży z uwzględnieniem możliwości diagnostycznych w Polsce. Warto podjąć dyskusję na temat diagnostyki i leczenia infekcji HHV-1 i HHV-2 u kobiet ciężarnych na terenie naszego kraju.

The geographic distribution of laboratories in the respective provinces indicates that the availability of tests for herpes infections is limited. Should the tests be possible to perform in the largest cities of Poland, the smaller localities saw no such service available. This is a problem not just for patients, but also for the hospitals that treat individuals who may be in need of such a test. The solution is to grant the doctors and hospitals access to a list of the least distant laboratories in their province, with the inclusion on data which methods are used by a given laboratory. The immunoenzymatic assay, such as ELISA, or the immunochemiluminescence are the most frequently used methods in Poland. The value of such tests depends on the method used, the quality of sample, skills of the laboratories and interpretation of results. The serological methods shall be used whenever the cellular culture methods are not applicable or its results were negative [19]. Furthermore the patients taking ACV have so low numbers of antibodies, that quantitative antibody assay may prove negative, although there is an infection present [20]. Due to that these methods are deemed less sensitive a diagnostic tool, when compared with PCR (or its variants) and cellular cultures.

In Poland the HHV-1 and HHV-2 diagnostics with use of PCR and/or Real Time PCR methods is available in 10 institutions. PCR is described as the “gold standard” in infection of the central nervous system and also the recommended method in case of *neonatal herpes* infections. The availability of this method in Poland is largely limited, which means these ailment units are hard to diagnose.

The pregnant woman should experience special care and attention. The recommendations created throughout the world, the care plans, the guidelines and instructions do make the care system function more efficiently and also direct the doctors onto a set plan of action that is supported by research and evidence. There is no existing plan for herpes infection care for pregnant women in Poland. The plan proposed in this work encompasses the pregnancy period and includes the available diagnostics of Poland. It is well worth to start a discussion on diagnosing and treating HHV-1 and HHV-2 infections of pregnant women of our country.

WNIOSKI

1. Diagnostyka zakażenia kobiet ciężarnych wirusem *Human Herpes Virus 1* i/lub 2 najczęściej odbywa się przy wykorzystaniu metody ELISA.
2. Metody diagnostyczne oparte na PCR i jego wariantach są wykorzystywane w Polsce tylko w nielicznych laboratoriach.
3. Brak lub mała liczba laboratoriów wykonujących diagnostykę zakażenia wirusem *Human Herpes* utrudnia rozpoznanie infekcji u kobiet ciężarnych.

CONCLUSIONS

1. The diagnostics of Human Herpes Virus 1 and/or 2 infections of pregnant women is mostly done with use of ELISA method.
2. The diagnostic methods based upon PCR and its variants are only used in few laboratories in Poland.
3. Lack or the small number of laboratories performing infection tests for Human Herpes Virus makes the detection of infections of pregnant women difficult.

Piśmiennictwo / References:

1. **Walkowiak B, Namysł J, Prokop J, Żaba R.** Opryszczka narządów płciowych – klinika i epidemiologia, *Post Dermatol Alergol* 2007;XXIV,4:194–201.
2. **Simmons A.** Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 2002;15,186 Suppl 1:71-7.
3. **Samra Z, Scherf E, Dan M.** Herpes simplex virus type 1 is the prevailing cause of genital herpes in the Tel Aviv area, Israel. *Sex Transm Dis* 2003;30(10):794-6.
4. **Manavi K, McMillan A, Ogilvie M.** Herpes Simplex Virus Type 1 Remains the Principal Cause of Initial Anogenital Herpes in Edinburgh, Scotland. *Sex Transm Dis*. 2004;31(5):322-4.
5. **Scoular A, Norrie J, Gillespie G et al.** Longitudinal study of genital infection by herpes simplex virus type 1 in western Scotland over 15 years. *BMJ*. 2002; 8,324(7350):1366-7.
6. **Coyle PV, O'Neill HJ, Wyatt DE et al.** Emergence of herpes simplex type 1 as the main cause of recurrent genital ulcerative disease in women in Northern Ireland. *J Clin Virol*. 2003;27(1):22-9.
7. **Tran T, Druce JD, Catton MC et al.** Changing epidemiology of genital herpes simplex virus infection in Melbourne, Australia, between 1980 and 2003. *Sex Transm Infect*. 2004;80(4):277-9.
8. **Kimberlin DW, Whitley RJ.** Neonatal herpes: what have we learned. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16(1):7-16.
9. **Majewski S, Rudnicka I.** Choroby przenoszone drogą płciową w Polsce w 2009 roku. *Przegl Epidemiol* 2011;65:307-11.
10. **Majewski S, Rudnicka I.** Choroby przenoszone drogą płciową w Polsce w 2008 roku. *Przegl Epidemiol* 2010; 64:281-85.
11. **Weinberg A, Leary J, Sarisky RT, Levin MJ.** Factors that affect in vitro measurement of the susceptibility of herpes simplex virus to nucleoside analogues. *J Clin Virol*. 2007;38(2):139-45. Epub 2006 Dec 13.
12. **Berrington WR, Jerome KR, Cook L et al.** Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clin Infect Dis*. 2009;1,49(9):1295-301.
13. **Avgil M, Ornoy A.** Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy: consequences of neonatal or intrauterine infection. *Reprod Toxicol*. 2006;21(4):436-45.
14. **Mertz GJ.** Asymptomatic shedding of herpes simplex virus 1 and 2: implications for prevention of transmission. *J Infect Dis*. 2008;15,198(8):1098-100.
15. **Brown ZA, Wald A, Morrow RA et al.** Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA*. 2003;8,289(2):203-9.
16. **Roxby AC, Drake AL, John-Stewart G et al.** Herpes simplex virus type 2, genital ulcers and HIV-1 disease progression in postpartum women. *PLoS One*. 2011; 6(5):19947.
17. **Bollen LJ, Whitehead SJ, Mock PA et al.** Maternal herpes simplex virus type 2 coinfection increases the risk of perinatal HIV transmission: possibility to further decrease transmission? *AIDS*. 2008; 19,22(10):1169-76.
18. **Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M et al.** The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis*. 2006; 15,194 Suppl 1:11-8.
19. **Domeika M, Bashmakova M, Savicheva A et al.** Eastern European Network for Sexual and Reproductive Health, Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern european countries *Euro Surveill*. 2010;4,15(44). pii: 19703.
20. **Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B.** The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(2):92–98.
21. **Clinical Effectiveness Group.** 2007 national guideline for the management of genital herpes. London (UK): British Association for Sexual Health and HIV (BASHH) 2007;72.
22. **California Guidelines for STD Screening and Treatment in Pregnancy** 2008; <http://www.cdph.ca.gov/publications/Guidelines/Documents/STD-Screening-and-Treatment-in-Pregnancy.pdf>.
23. **AHMF Australian Herpes Management Forum**, 2011 Re-edited e-publication, http://ahmf.squarespace.com/storage/guidelines/Managing%20Genital%20Herpes_final.pdf.
24. **American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).** Management of herpes in pregnancy. Washington (DC): American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG); 2007 Jun. 10 p. (ACOG practice bulletin; no. 82).