

И. В. Коктыш¹, Н. В. Нефагина², С. С. Технюк²

¹Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск Республика Беларусь

²Иностранное унитарное предприятие «Синлаб-ЕМЛ», г. Минск Республика Беларусь

ЗНАЧИМОСТЬ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИ ПОДТВЕРЖДЕННОМ УРОГЕНИТАЛЬНОМ ГЕРПЕСЕ

Исследовано содержание сывороточных антител к цитомегаловирусу и вирусу простого герпеса у пациентов с выявленной ДНК в урогенитальном тракте. Присутствие сывороточных антител к герпесвирусам является маркером иммунного ответа на инфекцию. Диагностическая специфичность метода иммуноферментного анализа определения антител класса М к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов составила 84,6%, что свидетельствует о возможном использовании данного метода в качестве скринингового теста при диагностике урогенитального герпеса.

➤ **Ключевые слова:** герпесвирусная инфекция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, антитела к простому герпесу, антитела к цитомегаловирусу, эпителиоциты урогенитального тракта, периферическая кровь, иммуноглобулин М, иммуноглобулин G.

Введение

Неблагоприятные экологические факторы и постоянно увеличивающаяся антропогенная нагрузка приводят к угнетению местного и общего иммунитета, в результате создаются условия для репродукции герпесвирусов. Герпетические вирусы широко распространены в человеческой популяции, они пантропны и способны поражать практически все органы и системы организма хозяина. Описано 8 антигенных типов вирусов, относящихся к данному семейству: вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов (HSV-1 и HSV-2), ветряной оспы (опоясывающего герпеса, herpes zoster), цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна–Барр, а также вирусы герпеса человека 6, 7 и 8-го типов [1]

Герпесвирусы, которыми к 50 годам инфицируется до 70% населения, являются причиной одной из самых распространенных в мире хронических инфекций [2]. При проникновении герпесвирусы уклоняются от механизмов врожденного иммунитета, а после заражения CD8+Т-лимфоциты имеют решающее значение в поддержании латентной инфекции, характеризующейся присутствием вирусной ДНК в инфицированных клетках и ограничением вирусной репликации. Для этой группы вирусов характерна пожизненная персистенция в организме хозяина [3, 4]

Вирусы герпеса передаются различными путями, однако половой путь передачи имеет наибольшее значения. Доказано неблагоприятное, а порой и фатальное влияние герпесвирусов на течение беременности и родов, патологию плода и новорожденных [5, 6]. Бессимптомный урогенитальный герпес имеется у 60% всех инфицированных, что увеличивает вероятность распространения вируса [7].

Хотя проблеме диагностики герпесвирусных инфекций человека посвящено множество научных публикаций, однако все еще не существует четкого алгоритма диагностического поиска при различных формах течения этой патологии. К сожалению, в практической медицине часто отмечаются случаи неправильного выбора лабораторного теста или биологической среды для верификации герпесвирусной этиологии заболевания, особенно полового герпеса. Кроме того нередки ситуации ошибочной интерпретации результатов проведенных исследований. Поэтому целью данной работы явилось установление особенностей содержания сывороточных антител к цитомегаловирусу и вирусу простого герпеса у пациентов с выявленным геномом возбудителя в урогенитальном тракте.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили периферическая кровь и соскоб эпителиальных клеток из уретрального и цервикального каналов с информированного согласия 91 пациента диагностической лаборатории «Синлаб – ЕМЛ» с подозрением на наличие HSV и CMV инфекции в урогенитальном тракте. 51 пациент группы I обследован на HSV: 21 мужчина (41%) и 30 женщин (59%). Группа II пациентов с подозрением на CMV инфекцию включала 40 взрослых лиц сопоставимого возраста: 6 мужчин (15%), 34 женщины (85%).

Выявление HSV I и II типов и CMV в клиническом материале проводилось методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием тест-систем

«АмплиСенс HSVI,II-FL» и «АмплиСенс CMV-FL» (Россия). Определяемый фрагмент – участки последовательности гена рецепторного белка герпесвируса и гомологичные участки 4 экзона гена МПЕ Cytomegalovirus белка оболочки цитомегаловируса. Специфичность определения – 98%. Чувствительность определения – не менее 10 000 вирусных частиц в 1мл пробы (соскоб эпителиальных клеток).

Определение сывороточных антител класса IgM и IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов и к цитомегаловирусу осуществлялось с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью наборов «ВектоЦМВ – IEA – антитела», «ИФА – ВПГ-I/II-IgM» и «ИФА – ВПГ-I/II-IgG» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия). Иммуносорбент представлял собой разборный полистироловый планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов HSV-I/II или очищенного рекомбинантного предраннего белка (IE антигена) CMV. Обычно гликопротеины G (gG1 и gG2) оболочки вирусов используются в качестве антигенов для определения антител [8].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 20 и Statistica 8.0 под Windows с использованием непараметрических критериев: U-критерий Манна-Уитни, χ^2 с поправкой Йетса. Критический уровень значимости принимался равным 0,05. Оценка точности методов производилась по принципу «Золотого стандарта». Благодаря данному способу определена специфичность, чувствительность и эффективность метода ИФА при сопоставлении результатов с молекулярно-генетическим исследованием; также оценена прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата [9].

Результаты и их обсуждение

При исследовании генома HSV-1, 2 типов в эпителиальных клетках урогенитального тракта ДНК вируса простого герпеса обнаружена у 48% обследованных группы I. При этом в сыворотке антитела к HSV класса IgM выявлены у 45% пациентов (n = 23) при 94% положительных случаев IgG анти-HSV.

Установлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости анти-HSV IgM у пациентов с обнаруженной ДНК HSV по сравнению лицами, у которых не выявлен геном HSV-1, 2 типов в эпителиальных клетках урогенитального тракта (χ^2 с поправкой Йетса: p = 0,0001). Частота встречаемости анти-HSV IgG не зависела от наличия или отсутствия ДНК HSV-1, 2 типов (p > 0,05) (рис. 1).

Проведен сравнительный анализ концентрации анти-HSV-IgM у пациентов с наличием, а также отсутствием ДНК вируса простого герпеса. Концентрация анти-HSV-IgM была статистически значимо выше у пациентов с подтвержденным ПЦР наличием ДНК вируса по сравнению с аналогичным показателем у лиц с отсутствием ДНК HSV (рис. 2). Нами не установлено статистически значимых различий в уровне анти-HSV IgG у лиц с наличием или отсутствием ДНК вируса.

Несмотря на высокую чувствительность метода ПЦР при определении генома герпесвирусов, могут возникать ситуации, когда при наличии в крови исследуемого пациента анти-HSV не обнаруживается ДНК вируса простого герпеса. Связано это с жизненным циклом вируса. Наличие ДНК HSV-1, 2 в пробе соскоба с эпителия свидетельствует об активации инфекции [10]. При первичной герпесной инфекции вирус обнаруживается в пузырьках (или в трещинах при атипичном герпесе) максимум в течение 7-и дней после первых проявлений [7].

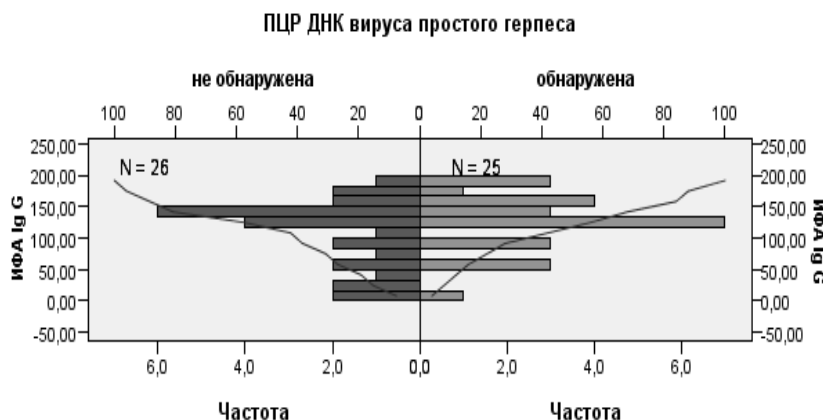


Рисунок 1 – Частота встречаемости сывороточных анти-HSV-IgG у пациентов с выявленным в урогенитальном тракте геномом возбудителя

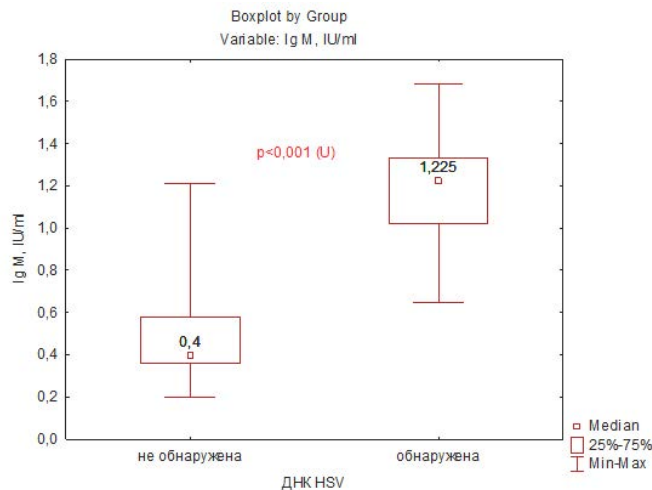


Рисунок 2 – Концентрация анти-HSV-IgM в сыворотке у пациентов с наличием или отсутствием ДНК HSV в урогенитальном тракте

Срок активности вирусов в эпителиальных клетках (частота и длительность рецидивов) зависит от иммунной системы организма. Во время латентной фазы (ремиссии) HSV-1, 2 типов персистируют в нервных ганглиях и, как правило, отсутствуют в эпителиальных клетках. Клинических проявлений инфекции при этом нет или наблюдаются остаточные проявления [11]. Отсутствие герпес-вирусов в пробе у инфицированного, взятой со слизистой, означает завершение острой фазы инфекции, наступление ремиссии [4].

В ответ на проникновение HSV-1, 2 типов в организм образуются антитела к самому вирусу класса IgM, а затем и IgG. IgM является как маркером первичного инфицирования HSV-1, 2 типов, так и может быть также обнаружен у 10–30% людей при реактивации инфекции [8]. Вероятно это и объясняет более высокий уровень анти-HSV IgM у лиц с выявленным ДНК вируса в эпителиоцитах урогенитального тракта.

При исследовании генома CMV в эпителиальных клетках урогенитального тракта ДНК цитомегаловируса выявлена только у 8% обследованных на CMV группы II. Сывороточные анти-CMV IgM выявлены у 7 % пациентов (n = 23) при 53% положительных случаях анти-CMV IgG (рис. 3–4).

CMV реже обнаруживается в урогенитальном тракте по сравнению с HSV-2 типом [12]. Несмотря стимуляцию иммунного ответа, вирус способен персистировать в латентной фазе в моноцитах, дендритных клетках, лейкоцитах периферической крови, периодически реактивируясь. Иммунитет, развивающийся по отношению к цитомегаловирусу после инфицирования в виде синтеза анти-CMV IgG, не обеспечивает полной защиты от возврата инфекции [13].

Исходя из совпадений результатов ПЦР диагностики и определения антител классов IgG к возбудителям были рассчитаны чувствительность, специфичность и эффективность ИФА метода. Диагностическая специфичность теста определения анти-HSV-IgM составила 84,6%, что свидетельствует о возможном использовании ИФА диагностики антител к HSV в качестве скринингового теста. Определение сывороточных анти-HSV-IgG методом ИФА можно использовать для подтверждения диагноза, поскольку диагностическая чувствительность теста составила 96%.

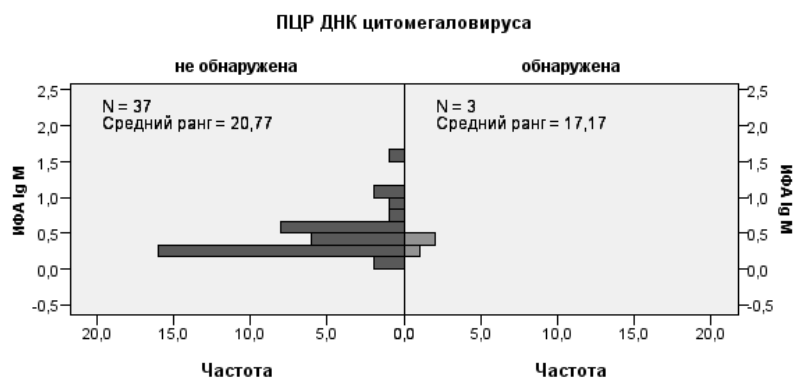


Рисунок 3 – Частота встречаемости сывороточных анти-CMV IgM у пациентов с наличием ДНК цитомегаловируса в урогенитальном тракте

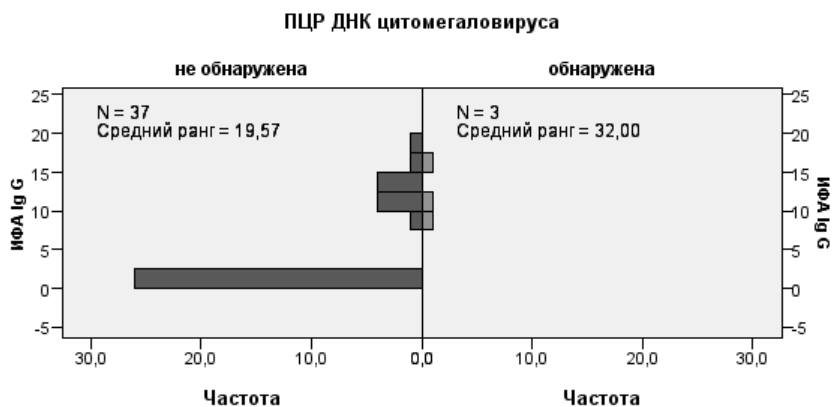


Рисунок 4 – Частота встречаемости сывороточных анти-СМВ IgG у пациентов с наличием ДНК цитомегаловируса в урогенитальном тракте

Не смотря на то, что эффективность метода ИФА определения сывороточных антител к герпесвирусам варьирует в зависимости от выявляемого класса антител к возбудителям, такой подход оправдан и может использоваться в дополнение к ПЦР диагностике. Определение генома вирусов герпеса эффективно в острую фазу первичной инфекции или при обострении, когда имеются явные клинические проявления. Серологические тесты становятся информативными в случае диагностики генитального герпеса у пациентов с реинфекцией с атипичными или заживающими повреждениями слизистой [8]. Остается перспективным разработка алгоритма серологического скрининга, основанного на подходах доказательной медицины, у пациентов с отсутствием типичной картины генитального герпеса (бессимптомных носителях).

Выводы

В рамках настоящего исследования проведена оценка эффективности метода иммуноферментного анализа для определения иммунного ответа (сывороточных антител) к цитомегаловирусу и вирусу простого герпеса у пациентов с выявленным в урогенитальном тракте геномом возбудителя.

Выявлено увеличение частоты встречаемости ($p < 0,001$) и концентрации ($p < 0,001$) анти-HSV-IgM у пациентов с обнаруженным в урогенитальном тракте геномом возбудителя по сравнению с HSV⁻ лицами. Диагностическая специфичность теста определения анти-HSV-IgM составила 84,6%, что свидетельствует о возможном использовании ИФА диагностики антител к HSV в качестве скринингового теста. Уровень и частота встречаемости антител к герпесвирусам класса IgG не зависит от наличия или отсутствия ДНК вируса простого герпеса 1/2 типов и цитомегаловируса ($p > 0,05$).

Определение сывороточных анти-HSV-IgG методом ИФА можно использовать для подтверждения диагноза, но не для скрининга инфекции, поскольку диагностическая специфичность не превышает 8%, а диагностическая чувствительность теста составила 96%.

Метод ИФА определения антител к герпесвирусам обладает высокой эффективностью (в случае определения анти-HSV-IgM – 80%, анти-HSV-IgG – 51%, анти-СМВ-IgM – 46% и анти-СМВ-IgG – 76%) и может использоваться наравне с методом ПЦР, если будет учтена специфичность и чувствительность метода по отношению к IgG и IgM.

Список литературы

1. Бархатова, Т. В. Маркеры герпетических инфекций при заболеваниях почек у детей / Т. В. Бархатова, В. В. Краснов // Современные технологии в медицине. – 2011. – С. 110–113.
2. Herpes Simplex / P. Chayavichitsilp, [et al.] // Pediatr. Rev. – 2009. – Vol. 30, № 4. – Pp. 119–130.
3. Evans, C. M. Management of herpesvirus infections / C.M. Evans, G.Kudesia, and M. McKendrick // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2013. – Vol. 42, № 2. – Pp. 119–128,
4. Latency Strategies of Herpesviruses. – Eds. J. Minarovits, E. Gonczol and T. Valyi-Nagy. – Springer Science, 2007. – 300 p.
5. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. – Eds. A. Arvin [et al.]. – Cambridge University Press, 2007. – 1408 p.
6. Исаков, В. А. Герпесвирусная инфекция: Рекомендации для врачей / В. А. Исаков, С. Б. Рыбалкин, М. Г. Романцов. – СПб, 2006. – 96 с.
7. Покровская, М. С. Герпесвирусные инфекции / М. С. Покровская. [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: http://lages-lab.ru/article_4.htm. – Дата доступа: 15.11.2015

8. Glinšek Biškup, U. Laboratory diagnosis and epidemiology of herpes simplex 1 and 2 genital infections / U. Glinšek Biškup, T. Uršič and M. Petrovec// Acta Dermatovenerologica Alp. Pannonica Adriat.– 2015.– Vol. 24, № 2. – Pp. 31–35.
9. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных : применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
10. Garland, S. M. Genital herpes / S. M. Garland and M. Steben // Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.– 2014. – Vol. 28, № 7. – Pp. 1098–1110.
11. Fatahzadeh, M. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management / M. Fatahzadeh and R. A. Schwartz, // J. Am. Acad. Dermatol. – 2007. – Vol. 57, № 5. – Pp.737–763.
12. Sewell, C. A. Cytomegalovirus Disease in the Lower Female Genital Tract / C. A. Sewell and J. R. Anderson // AIDS Patient Care STDS. - 2001. – Vol. 15, №. 9. – Pp. 459–462.
13. Miller, L. E. Serology and Molecular Detection of Viral Infections / L.E. Miller // Clinical immunology and serology : a laboratory perspective / C. D. Stevens. – 3rd ed. – Philadelphia: F.A. Davis Company, 2010. – 476 p.

I. V. Koktysh, N. V. Nefagina, S. S. Tekhnyuk

THE SIGNIFICANCE OF SEROLOGICAL MARKERS IN UROGENITAL HERPES CONFIRMED BY MOLECULAR GENETIC METHOD

It was investigated the immunoglobulin presence to cytomegalovirus and herpes simplex virus (HSV) in serum of individuals with positive tests for viral genome in the genitourinary system. ELISA detection of antibodies to herpes viruses has high efficiency. It may be used together with the polymerase chain reaction, if it will be taken into account the specificity and sensitivity of IgG and IgM detection to herpes viruses. The diagnostic specificity of the anti-HSV-IgM determining by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was 84.6%, which is indicated to the possible using of HSV antibodies diagnostic as a screening test.