



УДК: 616–002. 6: 616. 323–007. 61]–035. 37

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ МОНИТОРИНГ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРРА ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМ СИНДРОМОМ

М. В. Дроздова, Е. В. Тырнова

ФГУ «Санкт-Петербургский НИИ уха, горла, носа и речи Росмедтехнологий»
(Директор – засл. врач РФ, проф. Ю. К. Янов)

Герпесвирусы располагают необычно разнообразными и эффективными механизмами взаимодействия с иммунной системой хозяина, которые позволяют им достигать максимального распространения и сохраняться в организме в течение всей жизни [1, 2]. Клинические формы герпесвирусных инфекций характеризуются выраженным полиморфизмом, постановка диагноза в некоторых случаях может представлять собой трудную задачу.

В ходе своей жизнедеятельности вирусная ДНК экспрессирует определенные группы генов и, соответственно, кодируемых ими белков, которые определяют жизненный цикл вируса в клетках, приводя к изменению их фенотипических свойств, т. е. трансформации. Трансформация клеток вызывает развитие определенных иммунопатологических реакций, направленных против собственного организма и приводящих к вирусиндуцированной иммуносупрессии. У лиц с иммунодефицитными состояниями, обусловленными другими причинами, а также у ВИЧ-инфицированных больных наблюдаются особо тяжелые формы герпесвирусных инфекций.

Существуют различные клинические формы проявления герпетических инфекций. В любом случае герпесвирусы остаются в инфицированном организме пожизненно. Длительная персистенция вируса в организме человека может иметь латентную форму, при которой нарушается полный репродуктивный цикл вируса, и он находится в клетках хозяина в виде субвирусных структур [4]. Вирус может периодически рецидивировать с характерными клиническими проявлениями или бессимптомно, или приобретать генерализованный характер с возможным летальным исходом. Все формы тесно связаны между собой и могут переходить одна в другую.

Вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ) относится к вирусу герпеса человека 4 типа. ВЭБ проявляет тропизм к эпителиальным клеткам носоглотки (инфицируемым преимущественно литически) и В-лимфоцитам (инфицируемым латентно). Латентная инфекция приводит к трансформации В-лимфоцитов, к их неограниченно долгой жизни [7]. ДНК вируса ВЭБ кодирует около 80 белков, способных поддерживать жизненный цикл вируса на всех его стадиях, от литической до латентной. Исследованию функций белков, экспрессируемых ВЭБ, посвящено большое число научных публикаций. Первичное инфицирование характеризуется литической репликацией вирусной ДНК, вирусным производством и лизисом инфицированной клетки. В раннем возрасте инфекция протекает бессимптомно, а в подростковом и юношеском возрасте протекает доброкачественно как заболевание – инфекционный мононуклеоз (ИМ), являющийся наиболее частой формой первичной ВЭБ-инфекции. После получения соответствующего стимула (на фоне стрессов, эндокринных нарушений, у больных с первичными и вторичными иммунодефицитами, а также проходящих иммуносупрессорную терапию) вирус реактивируется из латентного состояния [5; 9]. Активная пролиферация вируса во всех органах, имеющих лимфоидную ткань, приводит к структурным изменениям, затрагивающим все звенья иммунной системы. При реактивации возможно развитие ВЭБ-ассоциированного лимфопролиферативного синдрома [6; 8].

Клиническая диагностика ВЭБ может быть затруднена многообразием проявлений заболевания, в связи с чем, особое значение приобретает лабораторная диагностика, которая имеет методы, основанные на обнаружении возбудителя, и методы выявления антител к вирусу в сыворотке крови. Первая группа включает выделение возбудителя ВЭБ-инфекции в культу-



рах клеток (вирусологический метод), микроскопический цитологический метод, обнаружение вирусных антигенов (иммуноферментный метод – ИФА), обнаружение вирусного генома (полимеразная цепная реакция – ПЦР, молекулярная гибридизация), вторая – выявление вирусспецифических антител в сыворотке крови (реакция связывания комплемента – РСК, ИФА, реакция биологической нейтрализации).

Вирусологический метод предполагает изоляцию вируса при заражении биологическим материалом чувствительных культур клеток или куриных эмбрионов с его последующей идентификацией. Окончательная идентификация проводится в реакции нейтрализации на мышах, куриных эмбрионах и в клеточных структурах с использованием стандартных противогерпетических иммунных сывороток животных.

Цитологический метод позволяет обнаружить морфологические изменения в клетках, инфицированных вирусом ВЭБ, – многоядерные гигантские клетки с внутриядерными включениями. Недостатком данного метода является невозможность дифференцирования первичной и рецидивирующей инфекции.

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) применяется для экспресс-диагностики антигенов вируса с помощью меченых антител к нему. Мазки-соскобы, мазки-отпечатки, высушенные и фиксированные ацетоном, после предварительной обработки флюоресцирующим препаратом просматриваются под люминесцентным микроскопом.

Прямой метод диагностики оппортунистической инфекции, направленным на детекцию ДНК ВЭБ, является метод ПЦР. Молекулярно-генетические методы основаны на способности одноцепочечных комплементарных цепей нуклеиновой кислоты формировать двунитчатые структуры. Для проведения ПЦР используют ДНК, выделенную из лимфоцитов крови, плазмы, биопсий лимфоузлов, парафиновых блоков лимфоузлов и тканей, соскобов с задней стенки глотки. Метод позволяет выявить вирус как активный, так и латентно присутствующий в материале на уровне чувствительности одного вирусного генома на миллион клеток. Высокая чувствительность ПЦР требует особого подхода к клинической интерпретации результатов. Метод ПЦР позволяет получать результаты в короткие сроки, проводить и завершать анализ без выделения культуры вируса, используя только нативный материал, получать достоверные результаты с учетом высокой чувствительности и специфичности метода. Положительный результат ПЦР в крови говорит об активной инфекции, что может предсказывать развитие соответствующего клинического синдрома, хотя и не всегда. На активную репликацию ВЭБ указывает только наличие генов ранней и поздней транскрипции. Возможности широкого использования ПЦР-диагностики в лабораторных исследованиях ВЭБ существенно ограничивает высокая стоимость соответствующих реактивов и необходимого для проведения исследования оборудования.

Иммунохимические (серологические) методы базируются на выявлении в исследуемых образцах вирусных антигенов или антител к ним и в настоящее время наиболее подходят для использования в клинической лабораторной диагностике ВЭБ, так как сочетают экспрессивность, высокую чувствительность и специфичность, простоту выполнения и относительную дешевизну анализа. Наиболее распространенными из них являются методы выявления специфических антител, в частности методом ИФА. Информативность ИФА зависит от формы инфекции (первичная, рецидивирующая), состояния иммунореактивности организма больного, длительности заболевания и т. д.

В процессе репликации ВЭБ экспрессируется более 70 различных вирус-специфических белков. Проведенными к настоящему времени исследованиями установлено, что наибольшую значимость для серодиагностики ВЭБ-инфекции имеет определение антител прежде всего к следующим вирусным белкам:

- EBV-EA – ранний антиген ВЭБ;
- EBV-NA-1 – нуклеарный или ядерный антиген ВЭБ;
- EBV-VCA – вирусный капсидный антиген ВЭБ.

Ранние антигены ВЭБ экспрессируются на первых стадиях вирусной репликации в клетках до начала синтеза вирусной ДНК. Ядерный антиген участвует в образовании нуклеопроте-



инового комплекса, включающего двухспиральную вирусную ДНК, а вирусный капсидный антиген формирует оболочку капсида вируса ВЭБ. Особенностью гуморального иммунитета к ВЭБ является дифференцированная во времени продукция иммуноглобулинов классов М и G к различным вирусным белкам. На рисунке 1 приведена в общем виде динамика наработки антител к различным группам иммуногенных белков ВЭБ при типичном развитии инфекционного процесса в организме человека.

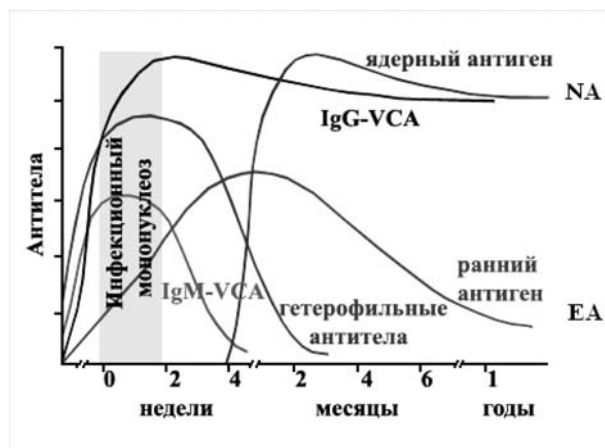


Рис. 1. Профили антител к различным антигенам вируса Эпштейна-Барра.

Антитела к вирусному капсидному антигену IgM и IgG классов появляются в острой стадии заболевания: IgM-антитела – свидетельство начальной фазы инфекции, синтез специфических IgM начинается после проникновения вируса в организм человека, достигает максимума к 15–20 суткам, снижается через 1–3 месяца. С 10–14 суток инфицирования начинается продукция специфических IgG. Повышение титра IgG-антител – свидетельство первичной инфекции или ее рецидива, IgG может персистировать на низком уровне всю жизнь. По данным литературы, антитела к ВЭБ обнаруживаются у 80% взрослого населения. Выявление специфических IgG к ядерному антигену ВЭБ говорит о высокой распространенности этого возбудителя у всех групп населения, о встрече с данным вирусом на протяжении жизни. Высокие титры IgG к вирусному капсидному антигену ВЭБ отмечены при лимфоме Беркитта и носоглоточной карциноме и у пациентов с иммуносупрессией. Позитивные титры IgM и IgG анти-EBV-VCA являются диагностическими признаками острой ВЭБ-инфекции.

Целью настоящего исследования явилось уточнение этиологической роли ВЭБ-инфекции в формировании хронического лимфопролиферативного синдрома у детей.

Материал и методы. Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 40 детей в возрасте от 3 до 16 лет без острых клинических проявлений на момент обследования. Отбор данной категории больных осуществлялся из числа поступивших в НИИ ЛОР на консультацию и обследование для решения вопроса о необходимости проведения хирургической санации в области лимфоглоточного кольца (аденотомии, тонзиллотомии, тонзиллэктомии). Верификация диагноза осуществлялась молекулярно-генетическими методами путем определения ДНК ВЭБ в соскобах со слизистой оболочки ротоглотки и в лимфоцитах крови, а также методом ИФА с определением антител IgM и IgG к раннему, ядерному, вирусному капсидному антигенам ВЭБ.

Результаты. При клиническом обследовании у всех детей выявлен хронический лимфопролиферативный синдром продолжительностью 3–6 месяцев, симптомы астено-вегетативного синдрома. У всех больных наблюдалась шейная лимфаденопатия (не менее 3 месяцев) с увеличением лимфатических узлов шейной группы, расположенных по заднему краю грудино-ключично-сосцевидной мышцы. Припухлость подчелюстных лимфатических узлов сохранялась несколько недель и даже месяцев. Гипертрофия лимфоидной ткани носоглотки и глотки



проявлялась заложенностью носа, резким нарушением функции носового дыхания, появлением храпа во время сна. В ротоглотке наблюдалась распространенная гиперемия слизистой оболочки, гнойные наложения по лакунам миндалин.

Отмечены признаки интоксикационного, инфекционно-воспалительного синдромов. В анамнезе у обследуемых больных имелись указания на обострения хронического воспалительного процесса в области лимфоглоточного кольца 4 и более раз в год и повторные бактериальные инфекции (отит, гайморит и т. д.), но отсутствовали сведения о ранее перенесенном инфекционном мононуклеозе. У трети больных выявлены признаки кардиального и артралгического синдромов.

В клиническом анализе крови увеличение числа одноядерных элементов и появление атипичных одноядерных элементов не наблюдалось. Однако гематологическое исследование имеет определенное значение, прежде всего, для дифференциальной диагностики лимфаденопатий невоспалительного характера (неопластические процессы, заболевания системы крови и др.). При скрининговом лабораторном обследовании детей в сыворотке крови отсутствовали гетерофильные антитела, ассоциированные с инфекционным мононуклеозом; маркеры активности воспалительного процесса (С-реактивный белок (СРБ), ревматоидный фактор (РФ)) и стрептококковой инфекции (антистрептолизин-О (АСЛ-О)) были отрицательными.

Результаты комплексного тестирования антител к ВЭБ в крови с применением ИФА приведены в таблице 1.

Таблица 1

Интерпретация серологических маркеров ВЭБ-инфекции при обследовании детей с хроническим лимфопролиферативным синдромом

Вирус	Клиническая форма	
	При первичной инфекции	При реактивации
EBV (ВЭБ)	Инфекционный мононуклеоз Саркома мышц Энцефалит у новорожденных Лимфоидная интерстициальная пневмония	EBV-ассоциированный лимфопролиферативный синдром EBV-обусловленная лимфома ЦНС

Отсутствие инфицирования ВЭБ отмечено только у 25% детей с хроническим лимфопролиферативным синдромом.

Активная фаза инфекционного мононуклеоза, характеризующаяся продукцией у больного IgM и IgG к вирусному капсидному антигену и, в большинстве случаев, наличием IgG и IgM, специфичных к комплексу ранних антигенов, не обнаружена ни у одного ребенка, что согласуется с данными клинического обследования.

В 75% случаев хронического лимфопролиферативного синдрома определялись серологические маркеры острой и хронической ВЭБ-инфекции. Среди этих пациентов активная фаза инфекции (поздняя первичная или реактивация) определялась у 12 детей (40% случаев). IgM к вирусному капсидному антигену появляются в крови больных в первые недели заболевания и определяются в течение 1–3 месяцев. IgG к вирусному капсидному антигену появляются немного позднее. Их концентрация достигает максимального значения также на первых стадиях заболевания, а затем снижается, но остается на стабильно детектируемом уровне всю жизнь. Поэтому определение только IgG к вирусному капсидному антигену не позволяет надежно диагностировать острую стадию инфекции и требует определения профилей антител к ВЭБ с использованием тест-систем с различными вирусными белками-антигенами. Антитела к комплексу ранних антигенов могут обнаруживаться у больных в сроки от нескольких месяцев до года.

Поздняя первичная инфекция у обследованных детей (22% случаев) характеризовалась продукцией IgG к вирусному капсидному антигену и наличием IgG, специфичных к комплексу ранних антигенов. Антитела к ядерному антигену начинают детектироваться в крови инфи-



цированных только через 3–6 месяцев; их концентрация сохраняется на достаточно высоком уровне длительное время, почти всю жизнь. При реактивации инфекции (18% случаев) отмечалась сероконверсия антител (как IgG, так и IgM) к вирусному капсидному антигену и комплексу ранних антигенов. Концентрация антител в крови достигала высоких значений. Как правило, у больных одновременно отмечались высокие титры IgG к ядерному антигену.

У 18 больных (60% случаев) диагностирована ранняя (30%) и поздняя паст-инфекция (30%). Паст-инфекция обычно характеризуется, прежде всего, появлением иммуноглобулинов класса G к ядерному антигену NA-1 (IgG-NA-1), а также наличием IgG к вирусному капсидному антигену. Ранняя паст-инфекция у обследованных детей сопровождалась отсутствием антител класса IgM на фоне детекции IgG к ядерному, вирусному капсидному и комплексу ранних антигенов. В образцах сыворотки крови пациентов, отнесенных к стадии поздней паст-инфекции, т. е. латентной инфекции у клинически здоровых лиц, обнаруживались только IgG к ядерному и вирусному капсидному антигенам.

Молекулярно-генетическое исследование обнаружило высокую частоту индикации ДНК ВЭБ у детей с хроническим лимфопролиферативным синдромом. На рисунках 2, 3 представлены результаты ПЦР диагностики у больных хроническим лимфопролиферативным синдромом в зависимости от стадии ВЭБ-инфекции.

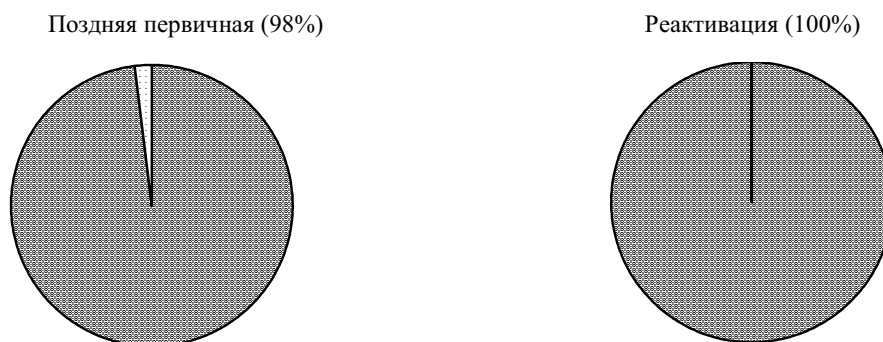


Рис. 2. Результаты ПЦР-диагностики у больных в активной стадии ВЭБ-инфекции.

Примечание: положительная ПЦР в крови и соскобе ротоглотки.

У подавляющего большинства (98–100%) больных в активной стадии процесса (поздняя первичная инфекция, реактивация) в исследованных биоматериалах методом ПЦР выявлялась ДНК ВЭБ. Положительные тесты определялись как в лимфоцитах крови, так в соскобах из ротоглотки. Диагностическое значение выделения микроорганизма из крови (биологической среды, не имеющей собственной микрофлоры) во много раз выше, чем из носоглотки, т. к. многие возможные возбудители встречаются в носоглотке здоровых людей; кроме того, необходимо учитывать тот факт, что попадание возбудителя в организм человека может не вызывать развитие инфекционного процесса [2, 3].

Положительная ПЦР с обнаружением ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови у 10% детей с хроническим лимфопролиферативным синдромом при наличии серологических маркеров активной фазы ВЭБ-инфекции расценена как рецидив основного заболевания.

В стадии ранней паст-инфекции в 80% случаев положительные тесты определялись в соскобах из ротоглотки. В стадии поздней паст-инфекции чувствительность метода ПЦР при выявлении ДНК ВЭБ составила 50%, при этом частота обнаружения ДНК ВЭБ в соскобах из ротоглотки и в лимфоцитах была одинакова.

Известно, что диагностическая ценность изолированного выявления ДНК вируса в материале из верхних дыхательных путей невысока. Ротовая полость в силу своих анатомических и физиологических особенностей постоянно встречается с различными микроорганизмами. Абсолютное большинство из них никогда не становится частью микрофлоры, которая сама по себе весьма разнообразна и представлена более чем 500 неродственными видами [3].

ПЦР не может использоваться в качестве единственного метода в массовых скрининговых исследованиях [2]. Использование метода ПЦР для анализа материала из носоглотки (с задней стенки глотки, из зева) может вводить в заблуждение относительно природы, количества и локализации микроорганизма, поскольку дает значительное количество ложноположительных ответов и, кроме того, ряд микроорганизмов присутствуют в ротовой полости в составе биопленок, но могут быть не вовлечены в патологический процесс [3]. По-видимому, повышение частоты выявления ДНК ВЭБ в соскобах с задней стенки глотки у детей с хроническим лимфопролиферативным синдромом свидетельствует о рецидивировании вируса и утяжеляет клиническое течение хронической ВЭБ-инфекции.

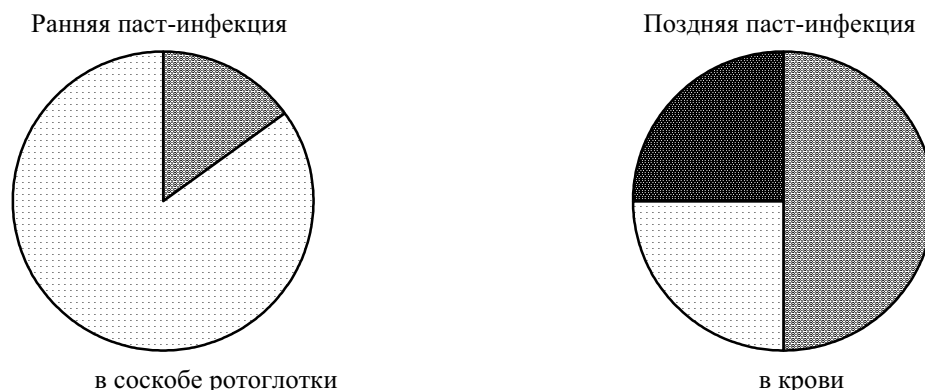


Рис. 3. Частота выявления ДНК ВЭБ методом ПЦР у больных в стадии пост-инфекции.

Проведенное исследование позволило сделать следующие **выводы**:

1. При хроническом лимфопролиферативном синдроме у 75% детей выявлены серологические и молекулярно-генетические маркеры инфицирования вирусом Эпштейна-Барра.
2. Хронический лимфопролиферативный синдром у 30% детей обусловлен активной фазой ВЭБ-инфекции (поздняя первичная инфекция или реактивация), являющейся противопоказанием к оперативному лечению.
3. Алгоритм диагностики хронического лимфопролиферативного синдрома у детей должен включать детекцию в крови ДНК вируса и антител классов IgM и IgG к вирусному капсидному комплексу ранних и ядерному антигенам вируса Эпштейна-Барра.
4. Верификация ВЭБ-инфекции при лимфопролиферативном синдроме у детей требует проведения этиотропного лечения хронической персистирующей инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герпесвирусные инфекции: особенности патогенеза, диагностика, лечение. / С. Г. Марданлы, Г. И. Кирпичникова, В. А. Неверов и др. // Лабораторная диагностика. – 2006. – №4. – С. 20–22.
2. Исаков В. А. Герпесвирусные инфекции человека. / В. А. Исаков, Е. И. Архипова, Д. В. Исаков. – СПб: Спецлит, 2006. – 304 с.
3. Тец В. В. Микробы ротовой полости и соматическая патология. / В. В. Тец // Клинико-лабораторный консилиум. – 2007. – №14. – С. 6–11.
4. Cohen J. I. Epstein-Barr virus infection / J. I. Cohen. // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 343. – P. 481–492.
5. Davis T. A. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression / T. A. Davis, D. K. Czerwinski, R. Levy // Clin. Cancer Res. – 1999. – №5 (3). – P. 611–615.
6. Jones J. F. Chronic Epstein-Barr virus infection / J. F. Jones, S. E. Straus. // Annu. Rev. Med. – 1987. – №38. – P. 195–209.
7. Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state / N. S. Prang, M. W. Hornef, M. Jaeger et al. // Blood. – 1997. – Vol. 49. – P. 897–902.
8. Stress-related activation of Epstein-Barr virus/ R. Glaser, G. R. Pearson, J. F. Jones, et al. // Brain Behav. Immun. – 1991. – №5. – P. 219–232.
9. Young L. S. Epstein-Barr virus and oncogenesis from latent genes to tumours. / L. S. Young, P. G. Murray // Oncogene. – 2003. – №22. – P. 5108–5121.