

Клиническое значение молекулярно-генетических и серологических исследований в диагностике инфекционного мононуклеоза

Н.А.Проخورова¹, Е.В.Волчкова², Г.В.Михайловская³, Е.А.Богачёва¹, О.В.Дарвина², В.П.Чуланов³, С.Г.Пак²

¹Инфекционная клиническая больница №2, Москва;

²Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова;

³Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Обследовано 94 пациента, у 59 из которых подтвержден инфекционный мононуклеоз. Изучена динамика серологических маркеров ВЭБ-инфекции (anti-EBV VCA IgM, anti-EBV VCA IgG, anti-EBV EA IgG, anti-EBV EBNA IgG) у больных инфекционным мононуклеозом на различных этапах заболевания и сопоставлена с результатами исследования на наличие ДНК ВЭБ в крови больных методом полимеразной цепной реакции. В остром периоде инфекционного мононуклеоза выявление ДНК ВЭБ методом ПЦР в крови позволяет подтвердить диагноз у 100% больных, тогда как реакция Хофф-Бауэра дает положительный результат только в 80% случаев. У 1/3 пациентов, перенесших острый инфекционный мононуклеоз, активная репликация ВЭБ сохраняется в течение длительного времени (не менее 2 лет), что указывает на необходимость более продолжительного периода наблюдения этих больных у инфекциониста.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, ВЭБ-инфекция, диагностика, полимеразная цепная реакция

Clinical significance of molecular-genetic and serologic surveys for diagnosing infectious mononucleosis

N.A.Prokhorova¹, E.V.Volchkova², G.V.Mikhaylovskaya³,
E.A.Bogacheva¹, O.V.Darvina², V.P.Chulanov³, S.G.Pak²

¹Infectious Clinical Hospital No.2, Moscow;

²I.M.Sechenov Moscow Medical Academy;

³Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumers' Rights Protection and People's Welfare, Moscow

The study included 94 patients, of them in 59 infectious mononucleosis was confirmed. The dynamics of serologic markers of EBV infection was studied (anti-EBV VCA IgM, anti-EBV VCA IgG, anti-EBV EA IgG, anti-EBV EBNA IgG) in patients with infectious mononucleosis at various stages of disease and compared with the results of the EBV DNA test in blood of patients using the polymerase chain reaction technique. In the acute period of infectious mononucleosis, detection of EBV DNA in blood by PCR permits to confirm the diagnosis in 100% of patients, whereas the Hoff-Bauer reaction yields a positive result only in 80% of cases. In 1/3 of patients with a history of acute infectious mononucleosis active replication of EBV persists for a long time (not less than 2 years), which necessitates a more prolonged follow-up of such patients by infectionists.

Key words: infectious mononucleosis, EBV infection, diagnosis, polymerase chain reaction

Проблема специфической диагностики инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), несмотря на длительную историю изучения чрезвычайно актуальна из-за недостаточного использования в практическом здравоохранении современных лабораторных методов исследования. Хотя ВЭБ-инфекция имеет глобальное распространение (к 18 годам более 90% населения земного шара инфицировано ВЭБ [1, 4, 10]), в большинстве случаев она характеризуется латентным течением и не нуждается в противовирусном лечении. В то же время изменяющиеся условия окружа-

ющей среды, увеличение случаев приобретенного и врожденного иммунодефицита обуславливают нарастание числа тяжелых случаев инфекционного мононуклеоза, реактивации этой инфекции с формированием полиорганной патологии [10]. ВЭБ является ДНК-содержащим [1, 2], относится к семейству *Herpesviridae* подсемейству гамма-герпесвирусов (герпес вирус 4-го типа), обладает тропизмом к В-лимфоцитам и способен к длительной персистенции. До недавнего времени рутинная диагностика ВЭБ-инфекции была затруднена, так как отсутствовали методы, позволяющие дифференцировать острую инфекцию от реактивации, а также устанавливать фазы инфекционного процесса и проводить дифференциальную диагностику с клинически схожими заболеваниями. В настоящее время с помощью современных молекулярно-генетических и серологических методов исследований установлено, что мононуклеозоподобный синдром

Для корреспонденции:

Проخورова Наталья Александровна, заведующая приемным отделением Инфекционной клинической больницы №2

Адрес: 105275, Москва, 8-я улица Соколиной горы, 15

Телефон: (495) 365-1211

Статья поступила 20.02.2008 г., принята к печати 12.05.2008 г.

может быть вызван не только ВЭБ, но и другими возбудителями: вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ), цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусами гриппа А и В, вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ6), токсоплазмами [4]. Помимо инфекционного мононуклеоза есть ряд заболеваний, связанных с ВЭБ-инфекцией: Х-связанные лимфопролиферативные синдромы, В-лимфопролиферативные болезни, включая посттрансплантационные и ВИЧ-лимфомы (связь с ВЭБ до 90%); лимфома Беркитта (связь с ВЭБ до 97–100%, у ВИЧ до 25%); Ходжкинская болезнь (связь у детей до 65%, у молодых пациентов до 80%); Т-клеточная лимфома (у ВИЧ-инфицированных больных связана в 10–100% случаев с хронической активной ВЭБ-инфекцией) [5, 7]. В настоящее время установлена роль ВЭБ-инфекции в инициации острых, хронических и аутоиммунных гепатитов [8].

Особое место отводится связи персистенции ВЭБ с развитием различных опухолей, поражающих эпителий: волосатой лейкоплакии языка (до 100% у больных с ВИЧ-инфекцией), назофарингеальной карциномы, карциномы желудка [5].

После перенесенного инфекционного мононуклеоза вирус полностью не элиминируется из организма хозяина, а остается в латентном состоянии в В-лимфоцитах [7, 9, 10], причем во время острой фазы инфекционного процесса поражены тысячи клеток крови, тогда как в латентную стадию определяется от 1 до 50 ДНК ВЭБ копий на 1 млн лейкоцитов [6]. В связи с незавершенным иммунным ответом вирус получает возможность персистировать в организме, приводя к развитию хронических форм заболевания. Недавно установлено, что ВЭБ нарушает механизмы иммунного ответа, подавляет продукцию интерферонов, блокирует механизмы клеточного апоптоза, вызывает при присоединении к мембране В-лимфоцита экспрессию особого антигена, распознающегося CD8-клетками как чужеродный. На основе этих иммунологических нарушений формируется вторичный иммунодефицит, способствующий формированию аутоиммунных и опухолевых процессов у генетически предрасположенных лиц [9, 10]. Косвенным подтверждением роли и места иммунодефицита в формировании процессов новообразования на фоне активной ВЭБ-инфекции являются данные о развитии различных лимфопролиферативных заболеваний у больных СПИДом, а также у пациентов на фоне иммуносупрессивной терапии: В-клеточные лимфомы, лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, Т-клеточная лимфома, Ходжкинская лимфома [5]. Учитывая разнообразие клинических форм проявления ВЭБ-инфекции, острые и хронические формы, наличие опухолевых заболеваний, в генезе которых вирус ВЭБ играет ключевую роль, диагностика активной инфекции имеет особую значимость. Поэтому изучение и сопоставление серологических и молекулярно-генетических методов исследования больных с ВЭБ-инфекцией в различные сроки заболевания является актуальным для практического здравоохранения.

Целью нашего исследования стало изучение динамики обнаружения ДНК ВЭБ в крови больных инфекционным мононуклеозом на разных стадиях заболевания в сопоставлении с серологическими методами исследования активной и латентной ВЭБ-инфекции (anti-EBV VCA IgM, anti-EBV VCA IgG, anti-EBV EA IgG, anti-EBV EBNA IgG, реакцией Хофф–Бауэра).

Задачи исследования: изучить динамику серологических маркеров ВЭБ-инфекции (anti-EBV VCA IgM, anti-EBV VCA IgG, anti-EBV EA IgG, anti-EBV EBNA IgG) у больных инфекционным мононуклеозом на различных этапах заболевания и сопоставить их с результатами исследования на наличие ДНК ВЭБ в крови больных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Пациенты и методы

В обследовании участвовали 94 пациента. Всем пациентам проводились лабораторные исследования на базе клинической, биохимической и серологической лабораторий Инфекционной клинической больницы №2 г. Москвы по общепринятым методикам: развернутый клинический анализ крови (гемоглобин, эритроциты, тромбоциты, лейкоциты, лейкоцитарная формула и СОЭ), клинический анализ мочи, биохимические исследования (билирубин, АСТ, АЛТ), реакция Хофф–Бауэра. Для исключения инфицированности вирусными гепатитами А, В, С сыворотка крови исследовалась на маркеры гепатитов (HBsAg, anti-HAV IgM, anti-HCV (суммарные), anti-HBcor IgM), а также антитела к ВИЧ. При необходимости больным проводилось рентгеновское исследование легких, УЗИ брюшной полости. Всем больным в остром периоде проводилось исследование крови методом ПЦР для выявления ДНК следующих вирусов: ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ6, ВПГ типа 1 и 2. Молекулярная диагностика проводилась с использованием коммерческих наборов реагентов «АмплиСенс» производства ФГУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия: «АмплиСенс» ВЭБ-EPH», «АмплиСенс» CMV-EPH», «АмплиСенс» HHVVI-EPH», «АмплиСенс» HSVI,II-EPH» (чувствительность вышеперечисленных методов 5×10^3 ГЭ/мл). Помимо этого образцы крови всех больных тестировались в динамике инфекционного процесса на наличие антител к ВЭБ и ЦМВ: anti-EBV VCA IgM и IgG, anti-EBV EA IgG, anti-EBV EBNA IgG, anti-CMV IgM и IgG, – с использованием коммерческих тест-систем производства Diagnostic Systems Laboratories Inc, США: EPSHTEIN BARR VCA IgM, EPSHTEIN BARR VCA IgG, EPSHTEIN BARR EA IgG, EPSHTEIN BARR EBNA IgG, CYTOMEGALOVIRUS IgM, CYTOMEGALOVIRUS IgG.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами было обследовано 77 пациентов, из которых 60 поступали с направительным диагнозом инфекционного мононуклеоза, в последующем в этой группе диагноз инфекционного мононуклеоза был подтвержден у 42 больных, а у 18-при углубленном лабораторном исследовании были подтверждены другие заболевания: острый гепатит С – 2 пациента, гепатит А – 1, аденовирусная инфекция – 1, острая цитомегаловирусная инфекция – 2, ВИЧ – 4, краснуха – 1, шейный лимфаденит – 1, синдром Жильбера – 1, фолликулярная ангина – 1, лимфома печени – 1, болезнь Стилла – 1. Нами также обследованы 17 пациентов, госпитализированных в стационар с направительными диагнозами других инфекционных болезней (корь – 4, краснуха – 3, скарлатина – 6, ОРВИ – 1, ангина – 1, малярия – 1, паротит – 1), у которых при поступлении на основании клинико-anamnestических

Таблица 1. Клинические проявления инфекционного мононуклеоза в периоде разгара заболевания

Симптом	Частота встречаемости (n = 59)	Абсолютное число, %
Увеличение лимфоузлов	59	100
Увеличение печени	53	90
Увеличение миндалин	49	83
Лихорадка	45	76
Боль в горле	43	73
Налеты в ротоглотке	43	73
Сыпь	34	58
Увеличение селезенки	28	47
Заложенность носа	19	32

Таблица 2. Частота выявления маркеров вируса Эпштейна–Барр в различные периоды инфекционного мононуклеоза

Маркер	Период разгара, % (n = 59)	Период ранней реконвалесценции, % (n = 59)	Период поздней реконвалесценции, %		
			6 мес (n = 45)	12 мес (n = 32)	24 мес (n = 19)
ДНК ВЭБ	100	100	67	34	32
Anti-EBV VCA IgM	85	90	0	0	0
Anti-EBV VCA IgG	53	61	60	88	84
Anti-EBV EBNA IgG	10	7	82	97	95
Anti-EBV EA IgG	68	70	0	0	0
Реакция Хофф-Бауэра	80	-	-	-	-

данных был заподозрен инфекционный мононуклеоз, в дальнейшем подтвержденный клинико-лабораторными методами. В анализ динамики серологических маркеров ВЭБ-инфекции в сопоставлении их с результатами исследования методом ПЦР вошли 59 пациентов. Больные наблюдались в периоде разгара заболевания, ранней реконвалесценции и последовательно через 6, 12, 24 месяцев с момента заболевания. Все наблюдаемые пациенты (30 мужчин и 29 женщин) были в возрасте до 30 лет и не имели сопутствующей патологии. Госпитализация больных осуществлялась с 4-го по 32-й день болезни, но в большинстве случаев (62% или 37 пациентов) с 4-й по 10-й день заболевания. Сводные данные по клиническим симптомам в периоде разгара заболевания представлены в табл. 1.

В общем анализе крови в периоде разгара заболевания наблюдались следующие изменения: лейкоцитоз у 44 (75%) больных, лимфоцитоз у 51 (86%), моноцитоз у 10 (17%), атипичные мононуклеарные клетки у 35 (59%), тромбоцитопения у 22 (37%) и эозинофилия у 3 (5%) больных. В биохимическом анализе крови в периоде разгара заболевания повышение АСТ (3-6 кратное превышение нормальных показателей) выявлено у 55 (93%) больных, АЛТ – у 52 (88%) больных. У 3 больных было выявлено повышение билирубина свыше 65 ммоль/л и трансаминаз свыше 600 МЕ/л, что было расценено как развитие острого гепатита, вызванного ВЭБ.

Результаты серологических и молекулярно-генетических исследований на маркеры ВЭБ в периоде разгара инфекционного мононуклеоза представлены в таблице 2. Из обследованных больных ДНК ВЭБ выявлялась у 59 (100%), реакция Хофф-Бауэра была положительна у 47 (80%), антитела к капсидному антигену ВЭБ класса IgM (anti-EBV VCA IgM) обнаруживались у 50 (85%).

При выписке больных из стационара, которая осуществлялась на 23 ± 5,9 день болезни, в периоде ранней реконвалесценции у 59 (100%) больных сохранялась лимфаденопатия, гепатомегалия у 53 (90%), спленомегалия у 25 (42%), лимфоцитоз у 53 (90%), атипичные мононуклеары у 7 (12%), эозинофилия у 5 (8%). В биохимическом анализе крови повышение АЛТ (5–6-кратное превышение нормальных показателей) сохранялось у 47 (80%) больных, АСТ (5–6-кратное превышение нормальных показателей) у 39 (66%) пациентов. ДНК ВЭБ выявлялась у 59 (100%) пациентов, реакция Хофф-Бауэра была положительна у 53 (90%), anti-EBV VCA IgM – у 53 (90%) (табл. 2).

Через 6 месяцев от начала заболевания под наблюдением оставалось 45 пациентов. У 17 (38%) сохранялось увеличение шейной группы лимфоузлов, гепатомегалия у

11 (24%), лимфоцитоз – у 18 (40%). ДНК ВЭБ обнаруживалась у 30 (67%) пациентов, ни у одного из пациентов не были выявлены anti-EBV VCA IgM и anti-EBV EA IgG. У 37 (82%) пациентов были обнаружены антитела к нуклеарному антигену ВЭБ класса IgG (anti-EBV EBNA IgG) и у 27 (60%) – anti-EBV VCA IgG (табл. 2).

Через 12 мес от начала заболевания было обследовано 32 пациента. У 10 (31%) сохранялась выраженная лимфаденопатия, у 8 (25%) – лимфоцитоз. У 11 (34%) пациентов подтверждена активная репликация ДНК ВЭБ, у 31 (97%) были выявлены anti-EBV EBNA IgG, а у 28 (88%) – anti-EBV VCA IgG.

Через 24 мес от начала заболевания из 19 находившихся под наблюдением пациентов у 3 (16%) было выявлено увеличение шейных лимфатических узлов на фоне лимфоцитоза. У 6 (32%) сохранялись признаки активной инфекции вирусом Эпштейна–Барр (обнаруживалась ДНК ВЭБ), включая 3 пациентов с лимфоцитозом и лимфаденопатией. У 18 (95%) в сыворотке были обнаружены anti-EBV EBNA IgG и у 16 (84%) – anti-EBV VCA IgG.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в остром периоде инфекционного мононуклеоза у больных выявляются капсидные антитела класса IgM (anti-EBV VCA IgM) и ранние антитела класса IgG (anti-EBV EA IgG) к ВЭБ, которые сохраняются в периоде ранней реконвалесценции, однако к 6-му месяцу наблюдения они полностью исчезают (рисунок). По данным зарубежной литературы антитела этих типов могут вновь появляться при реактивации хронической ВЭБ-инфекции [4]. Самостоятельного значения в диагностике ВЭБ-инфекции anti-EBV EA IgG не имеют, а оцениваются в совокупности с другими специфическими маркерами [3, 4, 9]. Совершенно другая динамика наблюдается при исследовании на нуклеарные антитела к ВЭБ (anti-EBV EBNA IgG), которые появляются только в периоде реконвалесценции и сохраняются пожизненно [4]; капсидные антитела класса IgG уже в остром периоде заболевания обнаруживаются более чем у 50% больных. В периоде поздней реконвалесценции частота их обнаружения возрастает до 80% (рисунок). В остром периоде инфекционного мононуклеоза и в периоде ранней реконвалесценции (до трех месяцев) у 100% больных в крови методом ПЦР обнаруживается ДНК ВЭБ, что позволяет проводить дифференциальную диагностику этого заболевания от других клинически сходных нозологий. Факт персистенции ВЭБ у 1/3 больных через 12 и 24 мес от начала заболевания указывает на необходимость увеличения длительности наблюдения за такими пациентами (в настоящее время

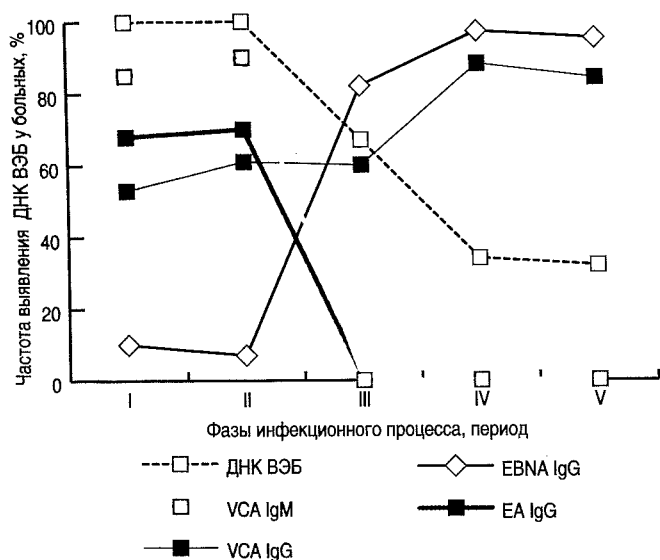


Рисунок. Динамика маркеров вируса Эпштейна-Барр в различные периоды инфекционного процесса.

I – острый период, II – период ранней реконвалесценции, периоды поздней реконвалесценции: III – через 6 мес от начала болезни, IV – через 12 мес от начала заболевания, V – через 24 мес от начала заболевания.

6 мес), так как именно эта группа больных, согласно литературным данным [7, 9], имеет повышенный риск развития лимфопролиферативных заболеваний. При диагностике инфекционного мононуклеоза необходимо использовать как методы серологической, так и молекулярно-генетической диагностики в динамике инфекционного процесса. Сводные результаты, полученные по данным нашей работы о роли молекулярно-генетических и серологических методов исследования в верификации диагноза Эпштейна-Барр вирусной инфекции, представлены на рисунке.

Выводы

1. В остром периоде инфекционного мононуклеоза выявление ДНК ВЭБ методом ПЦР в крови позволяет подтвердить диагноз у 100% больных, тогда как наиболее широко используемая реакция Ховф-Бауэра дает положительный результат только в 80% случаев.

2. Капсидные антитела класса IgM к ВЭБ (anti-EBV VCA IgM) в остром периоде инфекционного мононуклеоза и в периоде ранней реконвалесценции выявляются соответственно у 85 и 90% больных. Следовательно, их выявление незна-

чительно превосходит по диагностической чувствительности реакцию Ховф-Бауэра и уступает выявлению ДНК ВЭБ в крови методом ПЦР.

3. Ранние антитела к ВЭБ класса IgG (anti-EBV EA IgG) в остром периоде инфекционного мононуклеоза и в периоде ранней реконвалесценции обнаруживаются соответственно у 68 и 70% пациентов. Использование данного маркера для диагностики инфекционного мононуклеоза нецелесообразно ввиду низкой диагностической чувствительности.

4. Нуклеарные антитела к ВЭБ класса IgG (anti-EBV EBNA IgG) обнаруживаются только у 10% больных в остром периоде инфекционного мононуклеоза, тогда как к 12-му месяцу наблюдения они выявлялись у 95–97% пациентов, что позволяет рассматривать эти антитела как маркер перенесенного заболевания.

5. У 1/3 пациентов, перенесших острый инфекционный мононуклеоз, активная репликация ВЭБ сохраняется в течение длительного времени (не менее 2 лет). Возможно, для таких пациентов целесообразным является более продолжительный период наблюдения у инфекциониста.

Литература

- Краснов В.В., Шиленок А.И., Кузенкова Л.А., Кубышева Н.И. Инфекционный мононуклеоз. Клиника, диагностика, современные принципы лечения. Санкт-Петербург – Нижний Новгород; 2003; 1–44.
- Марданлы С.Г., Амелина Е.А., Федотова И.Э. и др. Герпес-вирусные инфекции, особенности патогенеза, лабораторная диагностика. Справочник зав. КДЛ №4, апрель 2007; 37–42.
- Феклисова Л.В., Галкина Л.А., Казакова С.П. Дифференциальная лабораторная диагностика инфекционного мононуклеоза. VI Российский съезд инфекционистов, октябрь 2003, 400.
- Hess R.D. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J of Clinical Microbiology 2004; 3381–7.
- Macswen K.F., Crawford D.H. Epstein-Barr virus – recent advances. Journal the Lancet Infectious Diseases March 2003, 3256–65.
- McGraw-Hill Companies. Part 6. Infection Diseases, Epstein-Barr virus infections, including infectious mononucleosis, 2004–2005; 3465–9.
- Murray P.G., Young L.S. The role the Epstein-Barr virus in human disease. Journal Frontiers in Bioscience 2002; 7: 519–40.
- Negro F. The paradox of Epstein-Barr virus-associated hepatitis. J of Hepatology 2006; 44: 839–41.
- Pathmanathan R., Prasad U., Sadler R., et al. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. N Engl J Med 1995; 333: 693–8.
- Schooley R.T. Epstein-Barr virus infection. Goldman: Cecil Medicine, 2007; 23rd ed, 360–6.

НАУЧНАЯ ЖИЗНЬ

6-я научно-практическая конференция
Инфекционные болезни
и антимикробные средства
2–3 октября 2008 г.
Москва
Оргкомитет: (495) 797-6292

Научно-практическая конференция
Актуальные проблемы
менингококковой инфекции
и гнойных бактериальных
менингитов
20–21 октября 2008 г.
Москва
Оргкомитет: (495) 745-3962/63

Российская научно-практическая
конференция Инфекционные
болезни: современные проблемы
диагностики и лечения
3–4 декабря 2008 г.
Санкт-Петербург
Оргкомитет: (812) 329-7165
E-mail: infectology_vma@mail.ru