

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РЕАКТИВАЦИИ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА – БАРР У ДЕТЕЙ С ВИРУСНЫМИ ЭНЦЕФАЛИТАМИ

О.В. Голева, Е.А. Мурина, З.А. Осипова

Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Serologic markers of Epstein-Barr virus reactivation in the conditions of viral encephalitis in young patients

O.V. Goleva, E.A. Murina, Z.A. Osipova

Scientific Research Institute of Children's Infections of FMBA of Russia, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

При развитии вирусных энцефалитов различной этиологии выявлена реактивация вируса Эпштейна – Барр на фоне основного заболевания, которая могла служить ко-фактором запуска процесса демиелинизации тканей центральной нервной системы.

Цель: уточнение роли персистирующей Эпштейна – Барр вирусной инфекции у детей с диагнозом вирусный энцефалит.

Материалы и методы: проведено исследование биологического материала (сыворотка крови) от 29 детей в возрасте от 1 года до 14 лет с диагнозом вирусный энцефалит в период с 2012 по 2013 г. В алгоритм обследования были включены серологические методы на основе иммуно-ферментного анализа производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на аппарате открытого типа «Lasurit» фирмы «Дупех Technologies Inc.» (США) и блот-технологии с использованием Вестерн-блота производства Euroimmun AG, Германия на аппарате «AUTOBLOTT 3000» фирмы «MedTec, Inc.» (США).

Результаты: установлено, что на фоне тестирования антител поздней фазы Эпштейна – Барр вирусной инфекции (IgG-NA и IgG-VCA) с показателями высокого индекса авидности были выявлены при использовании блот-технологии также антитела IgG класса к ранним антигенам вируса (EA-R, и EA-D), синтезирующиеся в период не более трех недель от начала заболевания. Это позволило предположить развитие у наблюдавшихся пациентов активной фазы хронической Эпштейна – Барр вирусной инфекции. Особенно часто антитела к раннему антигену отмечались при энцефалитах, вызванных вирусом ветряной оспы, что составило 62,5% от всех случаев развития энцефалита данной этиологии.

Заключение: при сочетанном инфицировании вирусами, один из которых является этиологически значимым в развитии энцефалита, вирус Эпштейна – Барр, инфицирование которым произошло в ранние сроки, может активироваться и влиять на развитие патологий, связанных с демиелинизацией тканей центральной нервной системы.

Ключевые слова: вирусный энцефалит, дети, иммуноблот, вирус Эпштейна – Барр, реактивация.

Abstract

The reactivation of Epstein-Barr virus on the background of some basic disease revealed during the development of encephalitis of various etiology could act as a co-factor to trigger the process of demyelination of central nervous system tissues.

Purpose: to clarify the role of persistent Epstein-Barr virus infection in children with the diagnosis of viral encephalitis.

Materials and methods: there was performed the study of biological material (blood serum) of 29 children aged from 1 to 14 years old with the diagnosis of viral encephalitis during the period of 2012–2013. The algorithm of the study included serological methods on the basis of the enzyme-linked immunosorbent assay manufactured by Joint-Stock Company «Vector-Best» (Novosibirsk) on the open-type apparatus «Lasurit» of «Dynex Technologies Inc.» company (USA) and blot-technologies with the use of Western-blotting manufactured by Euroimmun AG, Germany on the apparatus «AUTOBLOTT 3000» of «MedTec, Inc.» company (USA).

Results:

It was determined that during the testing of the late phase Epstein-Barr antibodies (IgG-NA and IgG-VCA) with the indicators of high avidity index, the blot-technology use also revealed IgG class antibodies to the early phase antigens of this virus (EA-R, and EA-D), synthesized within the period of not longer than three weeks beginning from the disease onset. This allowed to assume the development of an active phase of chronic Epstein-Barr virus infection in the observed patients. The antibodies to an early antigen were noticed particularly often in the case of encephalitis caused by varicella zoster virus that composed 62,5% of total number of cases with the development of encephalitis of given etiology.

Conclusion: in the case of associated infections by those viruses among which there are etiologically significant ones for encephalitis development, Epstein-Barr virus, the infection by which occurred earlier, can be activated and influence the development of the pathologies connected with demyelination of central nervous system tissue.

Key words: viral encephalitis, children, immunoblotting, Epstein-Barr virus, reactivation.

Введение

Широкое распространение герпес-вирусов в человеческой популяции в настоящее время приобретает все более выраженные масштабы. К 18 годам около 60–90% всего населения планеты инфицируются одним или несколькими штаммами герпес-вирусов [1, 2]. Кроме того, штаммы герпес-вирусов обладают неодинаковой способностью к персистенции и латенции и имеют свой темп в связи с особенностями их ферментных систем. Они поражают клеточные структуры различных органов и тканей, способствуют ослаблению иммунного ответа, вызывают иммунологический дисбаланс в организме [3]. Являясь нейротропными, вирусы герпетической группы как в моноварианте, так и в сочетаниях могут стать причиной развития такого опасного осложнения, как энцефалит, ведущего к грубой инвалидизации пациента. Опасность развития энцефалита возникает не только в остром периоде заболевания, во время первичного инфицирования герпес-вирусом, но и в период его реактивации в организме иммунокомпromетированных лиц, вызывая глубокие органические поражения.

Одним из часто встречающихся персистирующих вирусов, выявляемых при обследовании пациентов с вирусными энцефалитами, является вирус Эпштейна – Барр (ВЭБ). По данным ряда авторов, антитела к ВЭБ обнаруживаются в 60% случаев уже у детей первых двух лет жизни, а хроническая ВЭБ-инфекция развивается у 15–25% лиц, перенесших ее острую форму [4]. Существует риск перехода инфекции в активную фазу или фазу реактивации. Исследования показали, что диагностическим критерием этого процесса является детекция ранних белков (ЕА) ВЭБ на фоне выявления в крови IgG антител к капсидному (VCA) и/или ядерному белку (NA) [5].

В настоящее время нет достаточной информации о степени участия персистирующих герпес-вирусов в развитии демиелинизации тканей головного мозга на фоне острого инфекционного процесса, вызванного другими инфекционными агентами [6]. Однако в литературе описаны случаи поражения центральной нервной системы (ЦНС), непосредственно связанные с первичным инфицированием или реактивацией ВЭБ, а также с хроническим течением ВЭБ-инфекции [7]. С другой стороны, в работах по изучению этиологии и патогенеза демиелинизации, выполненных на животных моделях, получены достоверные данные, доказывающие связь вирусного инфицирования с развитием аутоиммунного процесса. Одним из предполагаемых механизмов развития аутоиммунной реакции называют молекулярную мимикрию или перекрестный иммунный ответ на анти-

гены вирусов и составляющие миелина, а в качестве таких «провоцирующих» антигенов указывают на предшествующие инфекции, среди которых может быть вирус Эпштейна – Барр [8].

До сих пор не отработан однозначный диагностический подход для определения значимости ВЭБ-инфекции в развитии энцефалитов, особенно при сочетанном инфицировании, поэтому применение комплекса инновационных диагностических приемов позволило бы приблизиться к решению этой проблемы.

Цель исследования — уточнить роль персистирующей ВЭБ-инфекции у детей с диагнозом вирусный энцефалит.

Материалы и методы

Проведено обследование биологического материала (сывороток крови) 29 детей в возрасте от 1 года до 14 лет с диагнозом вирусный энцефалит, госпитализированных в отделения реанимации и нейроинфекций и органической патологии клиники НИИ детских инфекций ФМБА России в 2012–2013 гг. Средний возраст пациентов и этиология вирусных энцефалитов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Этиологическая и возрастная структура детей с вирусными энцефалитами

Этиология вирусного энцефалита	Количество пациентов, n	Средний возраст пациентов, годы
Virus varicella zoster	16	7,4 + 3,9
ВПГ 1, ВГЧ-6	3	3,6 + 1,1
Энтеровирусы	4	4,9 + 2,3
Неуточненная этиология	6	2,1 + 1,3

Этиология энцефалитов подтверждалась выявлением в крови специфических антител острой фазы заболевания или антигенов возбудителей в различных биологических пробах. Наиболее многочисленной группой были энцефалиты, вызванные вирусом ветряной оспы (Varicella zoster, VZV), в остальных группах этиологически значимыми явились вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ1), вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) и энтеровирусы (ЕСНО 6). У 6 человек этиология вирусного энцефалита не была уточнена.

Сыворотки крови тестировали на базе лаборатории вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования. Выявление антител IgM класса к рекомбинантному VCA и IgG класса к ЕА, NA и VCA антигенам ВЭБ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использо-

ванием коммерческих наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на аппарате открытого типа «Lasurit» фирмы «Dunex Technologies Inc.» (США). Серопозитивными считались лица, в сыворотке крови которых определялись специфические IgM и IgG антитела, оптическая плотность которых превышала критическую оптическую плотность. Для определения степени avidности IgG антител также использовался метод ИФА с использованием коммерческих наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Результат выражали расчетным значением индекса avidности антител (ИА) согласно инструкции фирмы-изготовителя тест-системы. Определение периода инфекционного процесса устанавливалось с учетом расчетного ИА, который указывал на первичную инфекцию или позднюю стадию первичной инфекции, перенесенной в прошлом [9]. Иммуноблот (ИБ) проводился на основе метода Вестерн-блот на автоматическом аппарате «AUTOBLOTT 3000» фирмы «MedTec, Inc.» (США). Выявляли специфические IgM и IgG антитела к электрофоретически разделенным антигенам полного экстракта ВЭБ в сыворотке крови («anti-EBV Westernblot IgM, IgG», Euroimmun AG, Германия).

Обработку и анализ данных осуществляли с использованием прикладных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Анализ данных частоты выявления IgM и IgG антител в крови к различным антигенам ВЭБ с использованием ИФА показал, что антитела IgG класса к VCA и NA антигенам тестировались в высоком проценте случаев (от 67% до 100%) (табл. 2). Они присутствовали практически у всех пациентов с вирусными энцефалитами различной этиологии, находившимися под наблюдением. При ветряночных энцефалитах, энцефалитах, вызванных энтеровирусами, и энцефалитах с неуточненной этиологией в крови больных выявлялись также антитела IgM класса в пределах от 25% до 56% случаев. Антитела IgG (EA) были выявлены лишь в 25% случаев только при энцефалитах энтеровирусной этиологии.

Таким образом, при развитии вирусного энцефалита, даже при обнаружении в некоторых случаях в крови IgM (VCA) и IgG (EA) на фоне присутствия серологических маркеров поздней фазы заболевания (IgG (NA), IgG (VCA)) с высокой достоверностью можно исключить первичную острую инфекцию ВЭБ у обследованных пациентов.

Далее, анализ уровней выявляемых антител к антигенам ВЭБ в крови обследуемых пациентов показал, что высокие концентрации IgG антител тестировались лишь к ядерному и капсидному антигенам. Концентрации антител, соответствующие острой фазе инфекционного процесса (IgM (VCA), IgG (EA)), напротив, были снижены и носили следовой характер (рис.). Индекс avidности, определяемый дополнительно для IgG (VCA), варьировался в пределах от 70% до 97% и относился к показателям высокой avidности антител.

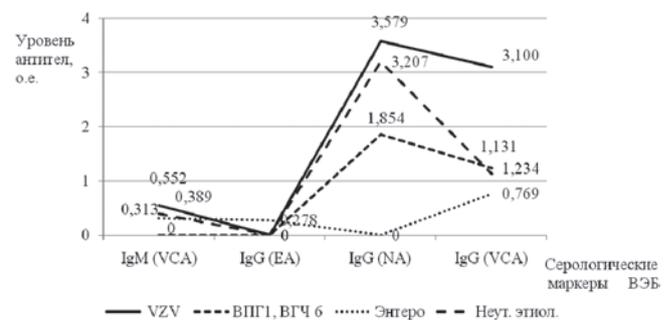


Рис. Уровни IgM и IgG антител к антигенам ВЭБ в крови при вирусных энцефалитах различной этиологии в ИФА

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что все обследуемые пациенты с вирусными энцефалитами имели позднюю фазу ВЭБ-инфекции.

При применении блот-технологии были получены аналогичные иммуно-ферментному анализу данные выявления антител IgG (NA) и IgG (VCA). Тестирование иммуноглобулинов к специфическим капсидному (p22) и ядерному (p79) белкам ВЭБ дополнительно подтвердило поздний срок инфекционного процесса. Однако в иммуноблор-

Таблица 2

Частота выявления антител IgM и IgG классов к антигенам ВЭБ у больных вирусными энцефалитами различной этиологии в ИФА

Этиология энцефалита	IgM (VCA), %	IgG(EA), %	IgG (NA), %	IgG (VCA), %
VZV (n = 16)	56	0	69	100
ВПГ 1, ВГЧ 6 (n = 3)	0	0	67	100
Энтеровирусы (n = 4)	25	25	0	100
Неуточненная этиология (n = 6)	33	0	67	83

те у пациентов с диагнозом вирусный энцефалит были выявлены также антитела класса IgG к ранним антигенам EA-R, EA-D (диффузный компонент) (вирусные белки p93, p45, p43), которые в ИФА не выявлялись (табл. 3).

Данные тестирования антител поздней фазы IgG-VCA- p22 и NA- p79 на фоне выявления антител IgG класса к ранним антигенам ВЭБ (EA-R, и EA-D), синтезирующимся в период не более трех недель от начала заболевания, позволили предположить развитие у наблюдавшихся пациентов активной фазы ВЭБ-инфекции. Особенно часто антитела к раннему антигену отмечались при энцефалитах, вызванных вирусом ветряной оспы (n = 10), что составило 62,5% от всех случаев развития энцефалита данной этиологии.

Метод иммуноблота применялся также для подтверждения IgM антител к вирусу Эпштейна – Барр, выявленных в ИФА. Результаты проведенного анализа показали отсутствие или очень слабый сигнал антител острой фазы в области всех специфических белков ВЭБ, нанесенных на блотинговый стрип, что расценивалось как отрицательный или сомнительный результат. То есть невысокие концентрации IgM антител, выявленные в ИФА, можно было объяснить ложноположительной реакцией или несовпадением профилей вирусных белков, используемых в ИФА и ИБ.

Таким образом, отсутствие IgM антител острой фазы, наличие высокоавидных IgG антител, особенно IgG-VCA-p22 и NA-p79, характеризующих позднюю фазу инфекции и наличие антител к раннему антигену, свидетельствует о реактивации возможной хронической ВЭБ-инфекции у пациентов с вирусными энцефалитами, особенно часто проявляющейся при энцефалитах, вызванных вирусом Varicella zoster.

Выводы

1. Реактивация ВЭБ чаще отмечалась при вирусных энцефалитах, вызванных вирусом ветряной оспы (в 62,5% случаев). Единичные случаи реактивации ВЭБ отмечались также при энцефалитах энтеровирусной и неуточненной этиологии.

2. Реактивация ВЭБ подтверждена в иммуноблоте выявлением антител IgG (EA), которые синтезируются на сроках не менее трех недель от начала заболевания, при параллельном выявлении IgG (VCA) и IgG (NA), указывающих на наличие поздней фазы этой инфекции. Дополнительно установлен высокий индекс авидности антител IgG (VCA) (70 – 97%), что также доказывает позднюю стадию ВЭБ-инфекции.

3. При сочетанном инфицировании вирусами, один из которых является этиологически значимым в развитии энцефалита, второй вирус, инфицирование которым произошло в более ранние сроки, может активироваться и служить кофактором запуска иммунных реакций, связанных с демиелинизацией тканей ЦНС.

Литература

1. Котлова, В.Б. Перинатальная Эпштейна – Барр вирусная инфекция / В.Б. Котлова // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 95 – 98.
2. Филатова, Е.Н. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции / Е.Н. Филатова, О.В. Уткин // Журнал МедиАль. – 2014. – № 2 (12). – С. 172 – 197.
3. Исаков, В.А. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика : руководство для врачей / В.А. Исаков, В.В. Борисова, Д.В. Исаков – СПб.: Изд-во «Лань», 1999. – 192 с.
4. Орлова, С.Н. Современные аспекты диагностики острой вирусной инфекции Эпштейна – Барр / С.Н. Орлова [и др.] // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2009. – Т.14, № 4. – С. 40 – 44.
5. Долгих, Т.И. Особенности течения герпесвирусных инфекций у детей / Т.И. Долгих, Е.Ю. Минакова // Детские инфекции. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 56 – 58.
6. Adenot, M. Clinical presentation of severe viral encephalitis with known causative agents in children / M. Adenot [et al.] // J. Child Neurol. – 2014. – V. 29. – P. 1508 – 1518.
7. Fujimoto H. Epshtein-Barr virus infections of the central nervous system / H. Fujimoto [et al.] // Intern. Med. – 2003. – V. 42 (1). – P. 33 – 40.
8. Спирин, Н.Н. Диагностика, дифференциальная диагностика и принципы терапии острого рассеянного энцефаломиелита / Н.Н. Спирин [и др.] // Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2008. – № 2. – С. 23 – 28.
9. Обрядина, А.П. Использование метода определения авидности IgG в лабораторной диагностике инфекционных

Таблица 3

Сравнение результатов выявления антител к антигенам ВЭБ методами ИФА и ИБ

Этиология энцефалита	ИФА				ИБ		
	IgM (VCA), n	IgG (EA),n	IgG (NA), n	IgG (VCA), n	CA (p22) Поздняя фаза, n	EA (EA-R, p93 EA-D, p45, p43), n	NA (p79) Поздняя фаза, n
VZV	9	0	11	16	16	10	11
ВПГ 1, ВГЧ 6	0	0	2	3	3	0	2
Энтеровирусы	1	1	0	4	4	1	0
Неуточненная этиология	2	0	4	5	5	1	4

заболеваний / А.П. Обрядина Е.О. Копнина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2006. — № 9. — С. 98 — 99.

References

1. Kotlova V.B. Vestnik novikh meditsinskikh tehnologiy. 2013; 20 (2): 95-8 (in Russian).
2. Filatova E.N., Utkin O.V. Zhurnal Medial. 2014; 2 (12): 172-97 (in Russian).
3. Isakov V.A., Borisova V.V., Isakov D.V. Herpes: pathogenesis and laboratory diagnostics. Guidelines for Physicians. Saint-Petersburg; 1999. (in Russian)
4. Orlova S.N., Mashin S.A., Varnikova O.P. et al. Vestnik Ivanovskoy meditsinskoj akademii. 2009; 14 (4): 40-4 (in Russian).
5. Dolgikh T.I., Minakova E.Yu. Detskie infektsii. 2012; 11(3): 56-8 (in Russian).
6. Adenot M., Frobert E., Blanchard G. et al. Clinical presentation of severe viral encephalitis with known causative agents in children. J.Child Neurol. 2014 Nov; 29:1508-18
7. Fujimoto H., Asaoka K., Imaizumi T. et. al. Epshtein-Barr virus infections of the central nervous system. Intern.Med. 2003 Jan; 42(1): 33-40.
8. Spirin N.N., Stepanov I.O., Kasatkin D.S. et al. Nevrologiya i revmatologiya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum 2008; 2: 23-8 (in Russian).
9. Obryadina A.P., Koptina E.O. Dalnevostochniy zhurnal infekcionnoy patologii. 2006; 9: 98-9 (in Russian).

Авторский коллектив:

Голева Ольга Владимировна — старший научный сотрудник лаборатории вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, к.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: golev.ao@mail.ru

Мурин Елена Александровна — ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, д.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: lemur@niidi.ru

Осипова Зинаида Алексеевна — научный сотрудник лаборатории вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, к.б.н.; тел.: 8(812)234-07-40.