

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОЙ ВЕЛИЧИНЫ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ EBV В КРОВИ МЕТОДОМ ПЦР

Ростовский областной консультативно-диагностический центр, авторы:  
Ж.А. Жищенко, М.С. Игнатенко, Т.О. Лаптева, Т.О. Холодная, Г.И. Луговская.

В последние годы наблюдается рост числа больных, страдающих хроническими рецидивирующими герпесвирусными инфекциями, которые во многих случаях сопровождаются выраженным нарушением общего самочувствия и целым рядом терапевтических жалоб. В клинической практике достаточно часто встречается лабиальный герпес (*Herpes Simplex I*), опоясывающий лишай (*Herpes zoster*) и генитальный герпес (*Herpes simplex II*). В трансплантологии и гинекологии распространены заболевания и синдромы, вызванные цитомегаловирусом (*Cytomegalovirus*). При заболеваниях лор-органов и иммунодефицитах различной этиологии более чем у половины пациентов в соскобах носоглотки обнаружен вирус Эпштейна – Барр (EBV). Очевидно, что вирусы группы-г сопровождают человека на протяжении всей жизни, находясь в латентном состоянии или активируясь вследствие иммуносупрессии.

В связи с развитием наукоемких технологий и появлением высокочувствительных тест-систем, позволяющих определять единичные копии вирусных частиц в пробе, возникает закономерный вопрос: какую величину вирусной нагрузки считать клинически значимой и каковы диагностические критерии, позволяющие различать бессимптомное вирусносительство (латентную инфекцию) и рецидив хронической инфекции?

Цель работы – выявить корреляцию между величиной вирусной нагрузки EBV в клетках крови и уровнем антител (АТ) к вирус-капсидному антигену (VCA), раннему антигену (early antigen – EA) и нуклеарному антигену (NA) вируса Эпштейна – Барр для определения клинически значимой величины вирусной нагрузки EBV.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ результатов количественного определения ДНК EBV, полученных при исследовании образцов венозной крови 606 пациентов, проживающих на территории г. Ростова-на-Дону и Ростовской области, обратившихся в ОКДЦ в период с января 2008 г. по январь 2009 г. с жалобами на заболевания лор-органов, лихорадку неясного генеза, герпетические высыпания на коже и слизистых, частые простудные заболевания.

Забор крови производили в вакутейнеры, содержащие ЭДТА (BD), выделение вирусной

ДНК осуществляли набором для выделения ДНК «ДНК-сорб-В» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва). Реакцию амплификации полученного материала с последующей детекцией в режиме реального времени (RT-PCR) проводили с применением тест-системы «АмплиСенс EBV-скрин-титр-FL» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва), на приборе «iCycler iQ» («Bio-Rad») по двум каналам флуоресценции FAM и HEX.

Исследование уровня антител VCA, EA и NA к EBV определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе EVOLIS («Bio-Rad») с применением тест-систем «BCM Diagnostics».

Результаты исследования. Анализ полученных результатов показал следующее.

С целью количественного определения ДНК EBV методом RT-PCR было обследовано 606 образцов венозной крови пациентов с различными диагнозами (герпесвирусная инфекция, лихорадка неясного генеза, иммунодефицитные состояния и др.).

Полученные данные приведены в табл. 1.

Таким образом, нами было установлено, что в клетках крови пациентов обследованной группы вирус Эпштейна – Барр обнаружен в 35,0% исследованных образцов. Для дальнейшего анализа из 212 EBV-положительных пациентов были отобраны 140 человек, которым помимо определения ДНК EBV в крови определялись также и АТ к EBV.

Известно, что на разных этапах инфицирования на поверхности зараженной клетки

Таблица 1

## Частота регистрации ДНК EBV в клетках крови у пациентов ОКДЦ за период с 01.01.2008 по 01.01.2009

Вид биоматериала	Количество обследованных пациентов	ДНК EBV +	ДНК EBV –
Венозная кровь	606	212 (35,0%)	394 (65,0%)

Таблица 2

## Интерпретация серологических данных комплексного тестирования с применением ИФА (ЗАО «Вектор-Бест», 2008)

Стадия инфекции	VCA IgM	EA IgG	EBNA IgG
Инкубационный период или отсутствие инфицирования	–	–	–
Очень ранняя первичная инфекция	+	–	–
Ранняя первичная инфекция	+	+	–
Поздняя первичная инфекция	±	+	+
Хроническая инфекция	±	+	–
Латентная инфекция у клинически здоровых лиц	–	–	+
Реактивация	+	+	+

экспрессируются определенные антигены, а именно: вирускапсидный антиген (VCA), ранний антиген (early antigen-EA) и нуклеарный антиген вируса Эпштейна – Барр (EBNA). Определение АТ к этим антигенам методом ИФА позволяет дифференцировать стадию инфекционного процесса (табл. 2).

Однако ИФА имеет определенные ограничения, а именно: методом ИФА невозможно определить количество вирусных частиц в исследуемом образце, и, применяя только метод ИФА, сложно контролировать эффективность проводимой терапии, т. к. вирусные АТ продолжают циркулировать в крови достаточно долго и после элиминации вируса. Величину вирусной нагрузки определяют и затем контролируют ее последующие изменения методом количественной ПЦР.

С целью определения клинически значимой величины вирусной нагрузки EBV были обработаны результаты 140 образцов крови пациентов, которым одновременно выполнялось количественное определение ДНК EBV и АТ к EBV. В результате проведенного исследования пациенты были распределены по группам в зависимости от величины вирусной нагрузки и наличия АТ к EBV для каждого из них.

Данные анализа приведены в табл. 3.

Анализ полученных результатов показал, что при вирусной нагрузке до 103 копий ДНК EBV/105 клеток в пробе АТ к EBV, определяемые в сыворотке крови обследуемой группы пациентов, соответствуют стадии латентной инфекции. Соответственно пациентов этой группы можно отнести к бессимптомным вирусносителям. Тогда как при вирусной нагрузке более 103 копий ДНК EBV/105 клеток в пробе определяемые АТ к EBV соответствуют стадии поздней первичной инфекции или стадии реактивации, сопровождающейся активной репликацией вируса, в результате которой происходит разрушение вирусосодержащих клеток и

Таблица 3

**Корреляция вирусной нагрузки ДНК EBV и АТ к EBV в крови пациентов**

Вирусная нагрузка (копии ДНК EBV / 105 клеток)	Стадия инфекционного процесса	VCA IgM		EA IgG		NA IgG	
		+	-	+	-	+	-
101	Латентная инфекция	-	42	-	42	42	-
102		-	57	-	57	57	-
103	Поздняя первичная инфекция или реактивация (процесс с активной репликацией вируса)	6	21	12	15	27	-
104		6	6	2	10	9	3
105		2	-	2	-	2	-

выброс вирионов в окружающее пространство, следствием чего является диссеминация EBV в другие органы и ткани.

Выводы. В клетках крови пациентов с различными клиническими диагнозами (герпесвирусная инфекция, лихорадка неясного генеза, иммунодефицитные состояния и др.) вирус Эпштейна – Барр обнаружен в 35,0% случаев. Определено, что при вирусной нагрузке до 103 копий ДНК EBV/105 клеток в пробе определяемые АТ к EBV соответствуют латентной инфекции при которой вирус персистирует в клетках без репликации. При вирусной нагрузке более 103 копий ДНК EBV/105 клеток в пробе определяемые АТ к EBV соответствуют стадии поздней первичной инфекции или стадии реактивации, сопровождающейся активной репликацией вирусных частиц, что позволяет считать вирусную нагрузку более 103 копий ДНК EBV/105 клеток в пробе клинически значимой.

Таким образом, мы можем рекомендовать применение полученных нами результатов вирусной нагрузки EBV в крови в качестве референтных границ в диагностике вирусной инфекции Эпштейна – Барр для пациентов, проживающих на территории г. Ростова-на-Дону и Ростовской области.

Необходимо отметить при этом, что для адекватной диагностики EBV-инфекции полученные результаты необходимо использовать и интерпретировать только в совокупности с общей клинической картиной заболевания пациента.

*Diama.ru*